

PROJET DE FIN D'ÉTUDES

PRESENTE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME DE

MASTER SCIENCES ET TECHNIQUES

GESTION ET CONSERVATION DE LA BIODIVERSITE

Caractérisation moléculaire de *Thymus Satureioides* assistée par des marqueurs moléculaires ISSR

Présenté par : ERRAJI Bahija

Encadré par : Dr. DIRIA Ghizlane (INRA Rabat)
Pr. MIKOU Karima (FST FES)

Mme BELMAHI Zoubida (INRA Rabat)


Soutenu le : 18/07/2022



Devant le jury composé de :

- Pr. LAZRAQ Abderrahim (FST FES)**
- Pr. BOUCHAMA El Ouazna (FST FES)**
- Pr. MIKOU Karima (FST FES)**
- Dr. DIRIA Ghizlane (INRA Rabat)**

Année Universitaire : 2021/2022

Faculté des Sciences et Techniques Fès

 B.P. 2202, Route d'Imouzzer FES

 +212(0)535608014 /+ 212(0)535609635/+212(0)535602953 -  212(0)535608214

www.fst-usmba.ac.ma

"Je veux pouvoir expliquer mes erreurs. C'est pourquoi je ne fais que des choses que je comprends."

Warren Buffet

Résumé

La filière nationale des plantes aromatiques et médicinales a beaucoup souffert de dysfonctionnement qui entrave son développement. Il revient ainsi aux professionnels de fédérer leurs forces pour le structurer et l'optimiser. Cependant, sa multiplication par bouturage engendre des problèmes de confusion variétale et intra variétale. Plusieurs études de caractérisation, d'identification variétale et de conservation des ressources phyto-génétiques du *Thymus satureioides* ont été effectuées au Maroc. Dans cette optique, la présente étude consiste en l'identification moléculaire de 60 génotypes locaux de *Thymus satureioides* récupérés de l'essai installé dans la commune Houderrane, province de Khmésat.

La diversité génétique des accessions, analysée à l'aide de quatre amorces ISSR, a généré des profils polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme variable et significatif (100%). En effet, les résultats engendrés par l'indice de diversité de Shannon (I) et le calcul des distances de similarité, ont montré une large diversité moléculaire des différentes accessions étudiées. La similarité minimale est de 19% et la similarité maximale est de 81%. Le dendrogramme phylogénétique a révélé 6 groupes principaux dont 2 regroupent des accessions qui appartiennent à quatre régions.

Mots clés : *Thymus satureioides*, Diversité génétique, Caractérisation moléculaire, ISSR, Polymorphisme.

Abstract

The national sector of the aromatic and medicinal plants suffered a lot of dysfunctions which hinders its development. It is thus up to the professionals to federate their forces to structure and optimize it. However, its multiplication by cuttings generates problems of varietal and intra-varietal confusion. Several studies of characterization, varietal identification and conservation of phylogenetic resources of *Thymus satureioides* have been carried out in Morocco. In this perspective, the present study consists in the molecular identification of 60 local genotypes of *Thymus satureioides* recovered from the trial installed in the commune of Houderrane, Khmésat province.

The genetic diversity of the accessions, analyzed using four ISSR primers, generated polymorphic profiles with a variable and significant percentage of polymorphism (100%). Indeed, the results generated by the Shannon diversity index (I) and the calculation of similarity distances, showed a large molecular diversity of the different accessions studied. The minimum similarity is 19% and the maximum similarity is 81%. The phylogenetic dendrogram revealed 6 main groups, 2 of which group accessions that belong to four regions.

Key words: *Thymus satureioides*, Genetic diversity, Molecular characterization, ISSR, Polymorphism.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ALLAH, le tout puissant de m'avoir donné la foi, la santé et le courage qui m'ont permis d'accomplir cette étude.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à **Dr DIRIA Ghizlane**. Je la remercie de m'avoir assuré un encadrement rigoureux tout au long de stage, pour les précieux conseils dont elle m'a fait profiter. Qu'elle soit aussi remerciée pour sa gentillesse, sa disponibilité permanente et pour les nombreux encouragements qu'elle m'a prodigués.

Toute mon estime et ma respectueuse gratitude vont à **Mme BELMAHI Zoubida**, pour avoir encadré ce travail, Je tiens à vous remercier pour votre accueil, votre disponibilité, vos précieux conseils, votre rigueur scientifique ainsi que pour le temps que vous m'avez accordé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Je tiens à présenter mes sincères reconnaissances au Professeur **MIKOU Karima**, enseignante à la Faculté des Sciences et techniques de Fès, pour encadrer ce projet de fin d'étude, ainsi que pour votre aide précieuse, votre objectivité et vos conseils qui ont fait progresser ce travail.

J'adresse aussi ma plus grande reconnaissance et mes plus sincères remerciements aux membres du jury Professeur **LAZRAQ Abderrahim**, Professeur **BOUCHAMA El ouazna** à la Faculté des Sciences et techniques de Fès, je suis très honorée que vous ayez accepté d'être membres du jury de ce mémoire. Trouvez ici l'expression de mes sincères remerciements.

Mes sincères remerciements sont également adressés à Mme **LEBKIRI Nezha**, doctorante dans l'unité d'accueil pour son encouragement, sa disponibilité, ainsi que les précieuses informations qu'ils m'ont données afin de faciliter la compréhension du sujet.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du Laboratoire de Biotechnologie Moléculaire, pour leur accueil. Mes sentiments de reconnaissance vont aussi à toute personne qui a participé de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Listes des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 1: Régions et sites de prélèvements des 54 accessions de <i>Thymus satureioides</i>	18
Tableau 2: Composition du mélange réactionnel pour PCR.....	21
Tableau 3: Amorces ISSR utilisées, leurs séquences et températures d'hybridation.	22
Tableau 4: Nombre des différentes bandes (NbT), Nombre des bandes uniques (NbU), moyenne d'indice de Shannon, d'He, d'Na, d'Ne et le pourcentage de polymorphisme des 54 accessions révélé par les 4 marqueurs ISSR.....	25
Tableau 5: Tableau de 6 groupes avec leurs accessions	27

Liste des figures

Figure 1: Principe de l'ISSR Si les bases arbitraires de l'amorce sont du coté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du coté 3' le produit B. (Tagu, 1999)	14
Figure 2: Organigramme recommandé pour les expériences de génotypage ISSR.....	15
Figure 3: Profils électrophorétiques d'ADN génomique de 54 accessions de <i>Thymus satureioides</i> sur gel d'agarose 3%, TBE 5x. M III : Marqueur Lambda DNA/Hind III – promega.....	24
Figure 4: Exemple du résultat donné par le NanoDrop pour 8 individus de <i>Thymus Satureioides</i>	25
Figure 5: Exemple de la similarité entre 9 accessions basées sur les marqueurs ISSR	26
Figure 6: Dendrogramme global montrant la relation génétique entre 54 individus, Révélé par la méthode Neighbour-joining (NJ).....	28
Figure 7: pourcentage de la variance moléculaire	29
Figure 8: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce I1.....	29
Figure 9: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC825.	29
Figure 10: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC834.	30
Figure 11: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC841.	30

Liste des annexes

Annexe 1 : Solutions nécessaires pour l'extraction

Annexe 2 : Solutions stock pour les gels

Annexe 3 : Solution pour la coloration des gels

Annexe 4 : Produits nécessaires pour PCR

Liste des abréviations

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism

APS: Ammonium Persulfate

CTAB : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

ISSR : Inter Simple Sequence Repeat

PCR : Réaction en Chaîne par Polymérisation

RAPD : Random amplified polymorphic DNA

RFLP : Restriction Fragment Length polymorphisme

rpm : Rotation Par Minute

SSR : Microsatellites ou Séquences Simples Répétées

Taq: Thermusaquaticus

TBE : Tris acide Borique Edta

Sommaire

Introduction Générale	1
Revue bibliographique	3
I. Biodiversité des plantes aromatiques et médicinales au Maroc	4
I.1 Définition et historique.....	4
I.2 Importance socioéconomique de la filière des PAM au Maroc	5
I.2.1 Production des PAM au Maroc	5
I.2.1.1 Exportations des PAM au Maroc	6
I.2.1.2 Importations des PAM au Maroc	6
I.3 Utilisation des PAM dans la tradition marocaine	6
II. Généralités sur la plante <i>Thymus satureioides</i>	7
II.1 Position systématique de <i>Thymus satureioides</i>	7
II.2 Description botanique et habitat naturel de <i>Thymus satureioides</i>	8
II.3 Usage traditionnel	9
II.4 Propriétés pharmacologiques	9
II.5 Etat de conservation de <i>Thymus satureioides</i>	10
III. Techniques de marquage moléculaire.....	10
III.1 Aperçu sur l'évolution des marqueurs	10
III.2 Marqueurs moléculaires codominants	12
III.3 Marqueurs moléculaires dominants	12
Matériel et méthodes	17
Matériel végétal et techniques expérimentales	18
I. Matériel végétal	18
II. Techniques expérimentales.....	18
II.1 Extraction d'ADN.....	18
II.1.1 Protocole d'extraction.....	19
II.2 Evaluation de la qualité et de la quantité d'ADN	19
II.2.1 Analyse de la qualité de l'ADN	19
II.2.2 Evaluation de la quantité d'ADN	20
III. Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide des marqueurs ISSR	21
III.1 Mise au point du mixte réactionnel	21

III.2	Electrophorèse sur gel d'acrylamide	22
III.3	Analyses statistiques	22
Résultats et discussion		23
I.	Résultats	24
I.1	Qualité de l'ADN extrait	24
I.2	Caractérisation moléculaire de la diversité génétique par les marqueurs ISSR	25
II.	Discussion	31
Conclusion et perspectives		35
Références bibliographiques		38

Introduction Générale

Introduction générale

Depuis des milliers d'années, l'humanité a utilisé diverses plantes trouvées dans son environnement, afin de traiter et soigner toutes sortes de maladies. Ces plantes représentent un immense réservoir de composés potentiels accordés aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et possèdent de nombreuses activités biologiques (Bassaid et al., 2020).

Actuellement, les plantes aromatiques possèdent un atout considérable grâce à la découverte progressive des applications de leurs essences dans les soins de santé ainsi que leurs utilisations dans d'autres domaines d'intérêt économique. Leurs divers usages font qu'elles connaissent une demande de plus en plus forte sur les marchés mondiaux (Bassaid et al., 2020).

La flore marocaine est constituée de près de 4200 espèces et sous-espèces appartenant à la quasi-totalité des grandes familles végétales connues (130 familles et 940 genres). Ce nombre élevé reflète la richesse et la diversité de la flore marocaine. De manière générale, selon Emberger (1971), la composition générale de la flore marocaine est de prédominance méditerranéenne (30% des genres) ; mais de nombreux genres Internationaux, existe, nordiques et africains existent également ; d'où l'ingéniosité de la flore marocaine.

Au Maroc, il existe plus de 800 espèces et sous-espèces de flore vasculaire endémique. C'est presque 20%. Si l'on considère aussi les espèces endémiques Moins sévères (espèces endémiques Bético-Rifan, Maroco-Canariennes ou Maroco-Algériennes), les taux d'endémismes deviennent relativement très élevés. C'est le Grand Atlas, qui abrite la grande majorité des espèces Endémiques, ces taxons endémiques sont répartis dans plus de 52 familles (Benabid, 2000).

Dans les dernières années il y a eu un intérêt pour l'étude des plantes médicinales et leur utilisation traditionnelle dans différentes régions du monde (Muthu et al. 2006 ; Lev, 2006).

Certains genres et espèces de plantes médicinales comme le *Thymus* sont plus importants que d'autres en raison de la qualité de leurs métabolites secondaires et des composés phytochimiques. Le genre *Thymus* comprend environ 300 espèces de plantes médicinales. Herbacées, vivaces et d'arbustes ou de sous-arbrisseaux distribuées principalement dans les pays méditerranéens, la partie nord de l'Afrique et le sud du Groenland (Sunar et al., 2009). Ce genre est généralement utilisé pour les agents aromatiques, les tisanes et les médicaments. Les parties aériennes et les

volatiles du thym sont utilisées comme matière médicinale (Stahl-Biskup et Saez, 2002). Les espèces sauvages apparentées aux cultures sont généralement utilisées comme principale ressource de variation génétique pour les nouveaux programmes de sélection, alors que les plantes médicinales sauvages sont en danger d'extinction. Par conséquent, la relation génétique de ces plantes est un sujet crucial (Fracaro et Echeverrigaray, 2006 ; Rahimmalek et al., 2009). De nombreux défenseurs de l'environnement discuteraient que la conservation de la diversité génétique est la base fondamentale de tous les efforts de conservation car la diversité génétique est nécessaire à l'adaptation évolutive, et une telle adaptation est la clé de la survie à long terme de toute espèce (Dyke, 2008).

Il est évident que la sélection végétale, l'amélioration des cultures et les programmes de conservation dépendent de la disponibilité de la diversité génétique. Les marqueurs moléculaires peuvent être utilisés afin d'étudier la diversité génétique et les relations génétiques entre les écotypes de *Thymus* au niveau de l'ADN. L'étude de la diversité génétique de la population au moyen de divers systèmes de marqueurs moléculaires peut être utile pour la caractérisation et la protection des ressources génétiques de plantes médicinales importantes (Narasimhan et al., 2006 ; Padmesh et al., 2006).

C'est dans ce cadre que s'inscrit la présente étude dont le principal objectif vise à étudier la diversité génétique d'une plante endémique du Maroc à l'aide des marqueurs moléculaire de type (ISSR) dans le but de réunir la biodiversité disponible et d'assurer la conservation et la gestion des ressources génétiques de cette espèce.

Le présent document est constitué de quatre parties :

-La première partie dresse une synthèse bibliographique assez détaillée sur *Thymus satureioides* et les techniques de marquage moléculaire.

-Dans la deuxième partie, nous décrirons le matériel végétal ainsi que les différentes techniques d'analyse utilisées.

-La troisième partie sera consacrée à la présentation des résultats acquis.

-A l'issue d'une discussion des résultats obtenus ainsi que de leur comparaison avec ceux de nos prédécesseurs, nous suggérerons des recommandations ainsi que des perspectives qui découlent de l'ensemble de nos travaux réalisés.

Revue bibliographique

I. Biodiversité des plantes aromatiques et médicinales au Maroc

Les plantes médicinales sont les plantes que l'on cultive ou que l'on cueille dans leur milieu naturel pour leurs propriétés médicinales. Depuis des milliers d'années l'être humain utilise les plantes pour traiter divers maux, le monde végétal est à l'origine d'un grand nombre de médicaments. Des chercheurs ont estimé récemment qu'il existe environ 400 000 espèces de plantes dans le monde, dont la majorité ont été utilisées par les sociétés à des fins médicinales (Melero et al., 2000).

La quasi-totalité de la population fait confiance à des médecins traditionnels et à leurs collections de plantes médicinales afin de se soigner. Les PAM ont eu une diversité d'emplois, à signaler le domaine thérapeutique, alimentaire, cosmétique, industriel, etc.

Le Maroc jouit d'une position privilégiée avec une façade de 3446 Km de long s'ouvrant sur la méditerranée et l'océan atlantique. Situé à l'angle Nord-ouest du continent Africain entre 21° et 36° de latitude de Nord et entre le 1er et le 17ème degré de longitude Ouest, Cette position géographique particulière confère au Maroc une exception gamme de bioclimat très varié allant de l'humide et de sub-humide au saharien et désertique en passant par l'aride, le semi-aride et le climat de haute montagne dans le Riff, le moyen et le haut atlas où les altitudes dépassent 2500, 3000 et 4000 m (Newman et al., 2007). Tous ces facteurs accordent au Maroc une bande de végétation très variée notamment les PAM dont plusieurs dizaines d'espèces existant à l'état spontané (Armoise, Romarin, Menthe Pouliot, Thym, Origan, etc.) ou en culture (Rosier, Verveine, Jasmin, Lavande, Menthe Verte, etc. (Zhang et al., 2006).

I.1 Définition et historique

Les PAM jouent un rôle essentiel dans la santé et le bien-être des personnes en fournissant de nombreux produits à base de plantes. Les PAM peuvent être définies comme suit (Saha et Basak, 2020) :

Les plantes médicinales : sont des plantes qui jouent un rôle spécifique dans la prévention ou la guérison des maladies et dans le maintien ou l'amélioration de la santé des personnes.

Les plantes aromatiques : Est une classe spéciale de plantes utilisées pour leur arôme et leur saveur. L'arôme est dû à la présence d'HE riche en composés terpéniques. Beaucoup d'entre elles sont utilisées exclusivement à des fins médicinales en aromathérapie.

L'histoire et l'évolution des plantes aromatiques et médicinales sont dues à la civilisation. Dans toutes les régions du monde, l'histoire des peuples montre que ces plantes ont toujours occupé une place importante en médecine, en Ingrédients pour parfums et préparations culinaires. La Chine, berceau de la phytothérapie, l'Inde, le Moyen-Orient, notamment en L'ère arabo-musulmane, composée de l'Égypte, de la Grèce et de Rome Les grandes civilisations des plantes aromatiques et médicinales jouissent d'une place de choix.

I.2 Importance socioéconomique de la filière des PAM au Maroc

Les plantes médicinales jouent un rôle important dans l'économie marocaine. En effet, la filière des PAM joue un rôle socio-économique très important (Bouiamrine et al., 2017). Le secteur marocain des PAM offre des opportunités d'emploi aux communautés locales et rurales, générant environ 500 000 jours de travail par an (Bachiri, 2017). Au Maroc, les herbes et les extraits sont produits à partir d'espèces sauvages et cultivées. Près de 100 plantes sont exportées sous forme d'herbes séchées pour le commerce des herbes. Plus de 20 sont utilisées dans la production d'HE ou d'autres extraits aromatiques principalement utilisés dans les industries de la parfumerie et de la cosmétique, pour la préparation de produits d'hygiène... (Zrira, 2017).

La valeur de la filière PAM au Maroc est l'une des activités les plus riches en raison de son potentiel de croissance, notamment à l'exportation. Aujourd'hui, le pays se classe au 12e rang des exportateurs internationaux de PAM, tant sous forme de matière sèche que de produits extraits comme l'HE, avec près de 87 millions de dollars provenant d'espèces cultivées et indigènes. Le Maroc a encore un énorme potentiel, avec un marché international en croissance d'une valeur estimée à 15 milliards de dollars (Lamrani-Alaoui et Hassikou, 2018).

I.2.1 Production des PAM au Maroc

La production de PAM utilise des repousses et des plantes cultivées, fraîches ou séchées elle est généralement assurée par des PAM spontanées, alors que la part des PAM cultivées reste faible (2 %) (Jaidani, 2018). La cueillette spontanée représente plus de 98 % de la production nationale. Cette catégorie comprend un large éventail de plantes dont les plus importantes sont le thym, le romarin, la caroube, la goyave, l'origan, l'arganier et le laurier. Parmi les principales PAM cultivées au Maroc, on peut citer : le géranium, la lavande, la rose, le jasmin, la verveine, la menthe et le safran. La culture des plantes aromatiques et médicinales est courante dans plusieurs régions du

pays tel que Marrakech. Ouarzazate, Khemisset, Taliouine, Sidi Kacem, chichaoua, El Hajeb (Neffati et al., 2014).

I.2.1.1 Exportations des PAM au Maroc

Actuellement, le Maroc est le 12e exportateur de PAM au monde. La principale destination des exportations marocaines de plantes aromatiques et médicinales est le marché de l'Union Européenne. Cependant, l'ouverture d'autres destinations comme le Japon, le Canada, la Suisse, l'Espagne et l'Allemagne permet d'augmenter les ventes. Plus de 50% de ces exportations sont liées à l'industrie alimentaire (caroube, épices, parfums, etc.), 35% sont utilisées dans les parfums et cosmétiques, et 5% sont utilisées à des fins médicinales. Depuis 2005, les exportations marocaines du PAM ont connu une croissance significative. En conséquence, la valeur des exportations de PAM est passée de 67 MDH en 2002 à 233 MDH en 2014 (Lamrani-Alaoui et Hassikou, 2018).

I.2.1.2 Importations des PAM au Maroc

Les principaux produits importés par le Maroc sont les essences de menthe, d'orange et de divers agrumes, de lavande, d'Eucalyptus. Les principaux épices importés par le Maroc sont les condiments, qui ne peuvent être remplacés par la production locale. Le poivre représentait 43 % des importations totales, suivi du gingembre (16 %), du cumin (12 %), du curcuma (9 %), de la cannelle (9 %) et des clous de girofle (5 %) Les principaux fournisseurs du Maroc sont : les Etats-Unis (menthes, agrumes) et la France (niaouli, myrte, lavande et géranium) (Neffati et al., 2014).

I.3 Utilisation des PAM dans la tradition marocaine

Les PAM ont été largement utilisées par les populations dans le monde entier (Ait-Sidi-Brahim et al., 2019), leur utilisation est très ancienne en médecine traditionnelle au Maroc (Midaoui et al., 2011), de nombreuses plantes sont utilisées par la population locale, en particulier dans les zones rurales (Ait-Sidi-Brahim et al., 2019).

Les propriétés antioxydantes et antimicrobiennes des espèces de *Thymus* sont à l'origine de nombreuses applications dans la conservation des aliments en médecine populaire (El Bouzidiet al., 2013). Le romarin est également utilisé dans les traditions populaires marocaines pour préserver les aliments contre la dégradation par les micro-organismes et surtout contre l'oxydation des graisses animales et végétales (Zrira, 2017).

II. Généralités sur la plante *Thymus satureioides*

Le nom thymus peut provenir du latin "thymus" qui signifie "parfum" ou du grec "thymos", qui signifie "courage" ou "force" (Stahl-Biskup et Saez 2002). Le nombre d'espèces de ce genre est encore controversé, il comprend 250 à 350 espèces, Sous-espèces et variétés de plantes sauvages (Morales 2002 ; Lawrence et Tucker 2002 ; Napoli et al. 2010). Il représente un taxon polymorphe, à la fois chimiquement et morphologiquement (Morales 2002 ; Saez et Stahl-Biskup 2002 ; Marin et al. 2005). Selon Jalas (1971), Thymus est divisé en huit sections : Micantes, mastichina, Piperella, Teucrioides, Pseudothymbra, Thymus, serpyllum et Hyphodromi.

Les feuilles et les parties florales des espèces Thymus sont largement utilisées comme thé tonique, antiseptique, antitussif, expectorant et carminative, ainsi que pour le traitement des rhumes en médecine traditionnelle (Ghasemi 2009 ; Rasooli et Mirmostafa 2002). Il a été rapporté que le thym bénéficie de nombreuses activités biologiques, antispasmodiques, antimicrobiennes, antioxydantes, antiplaquettaires, analgésiques et anti-inflammatoires (El Bouzidi et al. 2013 ; Jamali et al. 2012 ; Dandlen et al. 2010 ; Soliman et Badeaa 2002 ; Marino et al. 1999 ; Okazaki et al. 2002 ; Faleiro et al. 2003 ; Dob et al. 2006 ; Hazzit et al. 2009 ; Meister et al. 1999 ; Grosso et al. 2010 ; Tepe et al. 2005 ; Elhabazi et al. 2008 ; Ismaili et al. 2004 ; Ismaili et al. 2002 ; Miura et al. 2002 ; Van Den Broucke et Lemli 1983).

Le thym est l'une des herbes les plus populaires au Maroc en médecine traditionnelle en raison de ses nombreuses propriétés médicinales. Il est largement répandu Dans plusieurs régions du Maroc, elle est utilisée fraîche ou séchée comme plante culinaire. La disponibilité et le coût relativement faible sont un atout précieux. Il est divisé en cinq Sections : Micantes, Pseudothymbra, Thymus, Serpyllum et Hyphodromi (Tahiri et al. 1998), Elle est représentée par 15 espèces, dont 7 espèces endémiques *Thymus capitatus*, *Thymus bleicherianus*, *Thymus algeriensis*. *Thymus ciliates* (Amarti et al., 2011), *Thymus broussonnetii*, *Thymus leptobotrys* (El Hamdaoui et al., 2015) avec un taux d'endémie qui atteint 46,6 % dans ce genre (Fennane et al. 2007).

II.1 Position systématique de *Thymus satureioides*

Le thym compte plus de 200 variétés avec un endémisme d'environ 46,6 % au niveau du Maroc (Fennane et al. 2007).

Le genre Thymus (Lamiaceae) est représenté au Maroc par 21 espèces dont 12 sont endémiques y compris le thym satureioïde « *Thymus satureioides* » (Benabid, 2000).

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Lamiales
Famille	Lamiaceae
Genre	Thymus
Espèce	<i>Thymus Satureioides</i>

✓ Dénomination botanique et scientifique :

Thymus Satureioides Coss

✓ Noms vernaculaires :

Nom français : Thym satureioide ou Thym à feuilles de sarriette.

Nom marocain (en darija) : ZZiitra

Nom marocain (en tamazirt) : Azuknni

II.2 Description botanique et habitat naturel de *Thymus satureioides*

Thym satureioide ou "*Thymus satureioides* Coss" est un arbuste érigé, jusqu'à 60 cm, très ramifié, feuilles spatulées, inflorescence en grappe. Les fleurs sont lâches et ont des corolles roses ou rose pâle. Trouvé dans les forêts, les buissons et les clairières de niveau bas à moyen des montagnes à 2 200 mètres d'altitude, sur une matrice siliceuse calcaire et un sol rocheux, Plus ou moins terreux, mais bien drainé (Fennane et al. 2007).

Au Maroc, le thym est présent dans le Haut Atlas et l'Anti-Atlas, dans les bioclimats arides, semi-arides et semi-humides, dans les variantes chaudes, tempérées et fraîches, et niveau des étages de végétations Infra-méditerranéen et Méso-méditerranéen (Benabid 2000 ; EL Rhaffari 2008).

II.3 Usage traditionnel

Au Maroc le *Thymus satureioides* s'emploie en décoction contre la coqueluche, la bronchite et le rhumatisme (Bellakhdar et al. 1991), les infections gastro-intestinales, les maladies hépatiques, les coliques, les toux, les infections de la gorge et de la bouche, les gripes, les rhumes, le coryza, les refroidissements. Il est réputé tonique et antiseptique. On le mâche aussi contre les aphtes et les gingivites. Les feuilles séchées sont fumées en cigarettes contre le rhume et la grippe (Bellakhdar 1997). Il est aussi utilisé comme condiment et pour la conservation du smen (beurre fondu). Le miel butiné sur ce thym (spécialité de la région de Marrakech) est très recherché par les Marocains car il est réputé posséder de puissantes vertus thérapeutiques (Bellakhdar 1997).

Dans le Haut Atlas, le thym est consommé plus ou moins quotidiennement sous forme d'infusion fraîche lorsqu'il est disponible pendant la saison de récolte. L'herbe séchée est réduite en poudre et prise régulièrement par les femmes pour soulager les règles douloureuses, les troubles gastriques (maux d'estomac, troubles biliaires, indigestion, troubles intestinaux) et les troubles respiratoires en raison de son pouvoir réchauffant (Goodfield et Toulmin, 1964).

II.4 Propriétés pharmacologiques

Dans la littérature, le thym (*Thymus satureioides*) a été signalé d'avoir des attributs Analgésiques (Elhabazi et al. 2008), Anti-inflammatoires (Ismaili et al. 2004), Antioxydants (Ichrak et al. 2011 ; Ismaili et al. 2004) et antibactérien (Ichrak et al. 2011 ; Lattaoui et al. Paragraphe 1993 ; Lattaoui et Tantaoui-Elaraki 1994).

Thymus satureioides, également appelé "Thym bornéol", est indiqué pour les infections chroniques respiratoires, virales ou bactériennes ainsi que pour l'arthrite, le rhumatisme, l'asthénie physique et sexuelle profonde, la cystite, la leucorrhée, l'acné, les plaies infectées, la dermatite et d'autres problèmes de peau (Franchomme et al., 2001). D'autres recherches sur l'extrait aqueux de *T. satureioides* ont montré que son action analgésique est plus puissante que celle de l'acide acétylsalicylique (ASA), agissant par un mécanisme médié par les opioïdes (Elhabazi et al., 2008). C'est aussi un puissant expectorant et un spasmolytique. Il a des propriétés antiseptiques, qui peuvent exercer une forte action contre le rhume, la grippe, la sinusite et la bronchite dans ses formes aiguës et chroniques. Le thym peut également soulager les maux de gorge, la laryngite, la coqueluche et la tuberculose. Il est apaisant pour les toux irritables et convulsives (Zarzuelo et Crespo, 2002).

II.5 Etat de conservation de *Thymus satureioides*

Les pressions démographiques et les conditions socio-économiques de la population font que l'exploitation des PAM impacte significativement ces ressources. Les opérations de PAM au Maroc sont toujours gérées par le commerce de plantes séchées en vrac, tandis que d'autres formes d'exploitation dans le secteur peuvent faciliter l'acquisition de valeur ajoutée au niveau des zones de production. Mais, si cette pression démographique persiste, elle affectera la biodiversité et notre position sur le marché international (Lamrani et al., 2018).

Thymus satureioides est une espèce qui fait l'objet de plusieurs usages, elle est trop exploitée et donc pas durable. La plupart des zones de croissance du thym sont dans les montagnes, qui sont soumises à des facteurs de dégradation (déboisement, surpâturage, érosion et impacts des changements climatiques) l'espèce est menacée (Jamaledine et al., 2019).

III. Techniques de marquage moléculaire

Il est nécessaire d'évaluer la diversité génétique des espèces à étudier. C'est une étape nécessaire à tout progrès en matière d'amélioration génétique. La recherche sur la diversité génétique permet une meilleure gestion et valorisation des ressources génétiques (Adam & Dron, 1993). Le principe est d'étudier la variabilité au niveau du gène (allèle) qui existe à différents niveaux : le niveau interspécifique (entre espèces) et le niveau population (entre populations). Les objectifs recherchés sont d'identifier et de dénombrer des entités distinctes et de quantifier la variabilité génétique (Lesica et Allendorf, 1999 ; Martin et al., 1999).

A ce niveau, l'analyse repose essentiellement sur l'utilisation de marqueurs génétiques qui permettent de caractériser les individus et de mesurer leur variabilité génétique. Les premiers marqueurs utilisés en génétique des populations correspondent à des traits phénotypiques mais qui sont influencés par des facteurs environnementaux (Adam et Dron, 1993). Mais d'autres marqueurs existent et qui ne sont pas affectés par les conditions environnementales (Santoni et al., 2000).

III.1 Aperçu sur l'évolution des marqueurs

✓ Marqueurs morphologiques

Avant l'apparition des marqueurs moléculaires, les études de la diversité génétique et de caractérisation se limitaient à des observations morphologiques. S'intéresser aux traits morphologiques revient à attribuer des mesures de traits à chaque individu, telles que divers tests

de virulence et de pathogénicité, la taille, la forme, la couleur des organes, la précocité, le rendement, etc... (Prado et al. 1999).

Bien que ces marqueurs aient des limites, ils ne doivent pas être ignorés car ils restent le standard utilisé pour décrire et identifier les lignées et variétés végétales (Santoni et al., 2000).

✓ Marqueurs physiologiques

Les marqueurs physiologiques correspondent à tous types de molécules facilement identifiables dont la présence renseigne sur des stades de développement, des états physiologiques ou des situations complexes impliquant de nombreux paramètres en interaction (Santoni et al., 2000).

✓ Marqueurs biochimiques

Les séquences exprimées du génome codent pour des protéines dont certaines assurent les réactions enzymatiques du métabolisme. Les allèles au même locus codent pour des protéines qui peuvent différer en séquence et en activité. Ainsi, la quantité d'une substance peut révéler des changements dans les enzymes responsables de son accumulation. Dans certains cas, des métabolites secondaires très actifs dans les arbres forestiers peuvent être utilisés comme marqueurs. Les protéines enzymatiques issues directement de la traduction du génome sont des marqueurs moins influencés par l'environnement et l'ontogénèse, surtout si elles interviennent dans le métabolisme primaire : ce sont les isozymes. Ils ont été l'un des premiers marqueurs utilisés pour caractériser les génotypes végétaux par Tranksley et Orten en 1983.

✓ Marqueurs moléculaires

Avec le développement de nouvelles techniques de biologie moléculaire, ces nouveaux marqueurs génétiques sont rapidement utilisés pour vérifier la conformité variétale.

Les marqueurs moléculaires et les technologies qui permettent de les afficher peuvent être divisés en deux grandes catégories : d'une part, les technologies qui fournissent des marqueurs codominants et affichés individuellement, et d'autre part, les technologies qui affichent des marqueurs dominants « entiers ». Cette séparation est simple, mais elle correspond aux deux grands types d'usage des marqueurs (Santoni et al., 2000).

III.2 Marqueurs moléculaires codominants

Ils sont révélés séparément : RFLP, SSR, SNP... Ces techniques visent à révéler le polymorphisme dans ou à proximité de séquences spécifiques (techniques locus-spécifiques) (Santoni et al., 2000).

✓ Polymorphisme des longueurs de fragments de restriction (RFLP)

Les enzymes de restriction coupent l'ADN à des sites spécifiques, comprenant généralement un nombre pair de bases (4, 6 ou 8).

Le principe de polymorphisme de RFLP repose sur la présence de polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN, les profils de clivage sont comparés par des endonucléases de restriction à une autre. Les mutations dans la séquence d'ADN reconnues par les enzymes de restriction entraînent différentes longueurs de fragment de restriction. Ainsi, l'ADN des individus à comparer est digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les produits de restriction sont ensuite séparés sur des gels d'acrylamide ou d'agarose en présence de marqueurs de poids moléculaire connu (Tagu, 1999).

✓ Microsatellites

Les microsatellites, également appelés SSR (simples répétitions), sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri- ou tétranucléotidiques. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (GATA)_n, etc. La valeur de n peut aller de quelques unités à des dizaines. De tels motifs sont également très abondants chez les eucaryotes, c'est-à-dire qu'un même microsatellite peut exister en milliers d'exemplaires dans le génome d'une espèce (De Vienne, 1998).

✓ Polymorphismes nucléotidiques simples (SNP)

Plus récemment, l'utilisation des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) prend de l'ampleur, car ce type de marqueur permet d'observer des différences dans le codage des séquences d'ADN. Les polymorphismes mononucléotidiques (SNP) sont les formes les plus abondantes de variation génétique dans les génomes eucaryotes. Les SNP remplacent rapidement les séquences répétées simples (SSR) car ils sont plus abondants, stables, plus faciles à automatiser, efficaces et plus rentables (McCouch et al., 2010).

III.3 Marqueurs moléculaires dominants

✓ Polymorphisme d'ADN par Amplification Aléatoire (RAPD)

Les marqueurs RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) sont une variante de la technique PCR (polymerase chain reaction) qui permet l'amplification aléatoire de portions d'ADN (Welsh et McClelland, 1990 ; Williams et al., 1990).

Le principe des RAPD consiste à effectuer une réaction PCR sur l'ADN de l'individu étudié en utilisant une amorce courte, de 10 nucléotides en général, de séquence arbitraire. L'amorce va s'hybrider chaque fois que se trouvera dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire (ou comportant un nombre limité de mésappariements (Santoni et al., 2000).

✓ Polymorphisme des longueurs des fragments d'amplification (AFLP)

Historiquement, cette technique a été développée en 1993. Le principe repose sur l'amplification sélective de fragments de restriction générés à partir d'échantillons d'ADN génomique. Il permet de rechercher des polymorphismes de longueur des fragments d'ADN de restriction au niveau de l'ADN. Il est utilisé par exemple pour l'analyse généalogique et la recherche de marqueurs génétiques associés à des traits (Tagu, 1999).

✓ Séquence à Répétition Inter Simple (ISSR)

Les marqueurs ISSR sont liés à des séquences ou des nucléotides dans le génome qui existent dans des espaces entre des séquences répétées simples (SSR), basés sur des polymorphismes de taille de 200 à 2500 pb dans ces espaces inter-microsatellites qui peuvent être amplifiés par PCR à amorce unique (Zietkiewicz et al., 1994). En général, les locus microsatellites sont abondants et régulièrement distribués dans les génomes eucaryotes, fournissant ainsi un pool riche de marqueurs ISSR potentiels adaptés pour révéler la diversité étroitement associée au germoplasme (Wiesner et Wiesnerová, 2003).

Cette amplification ISSR est définie par une variante de la PCR, qui utilise des amorces à répétition unique (ex. [AC] n) pour amplifier des régions situées entre des séquences microsatellites (Figure 1) (Kahl, 2001). Selon Zietkiewicz et al (1994), les marqueurs ISSR sont moins coûteux à produire, plus rapides et plus faciles à optimiser par rapport aux marqueurs AFLP, SSR et RFLP. De plus, ils sont plus reproductibles que RAPD et détectent des polymorphismes génomiques plus importants que les marqueurs RFLP (Zietkiewicz et al., 1994 ; Oh et al., 2000). Les marqueurs ISSR se sont également révélés très polymorphes et peuvent donc distinguer des races génétiquement très similaires (Santoni et al., 2000).

La technique ISSR a été largement utilisée dans l'étude de la variabilité génétique des plantes (Godwin et al., 1997) et dans la caractérisation de certains organismes fongiques (Grunig et al., 2001). Il a ainsi été utilisé pour déterminer les polymorphismes génétiques dans le sorgho, la patate douce, l'eucalyptus, le riz, le lupin, l'asperge et d'autres espèces (Yang et al., 1996 ; Prevost et Wilkenson, 1999 ; Qian et al., 2001 ; Sica et al., 2005).

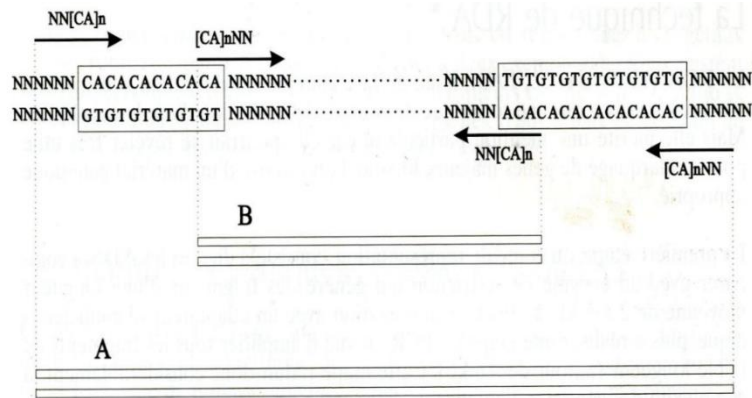


Figure 1: Principe de l'ISSR Si les bases arbitraires de l'amorce sont du côté 5', on obtiendra le produit d'amplification A, si elles sont du côté 3' le produit B. (Tagu, 1999)

Comme pour la plupart des autres expériences scientifiques, la procédure actuelle nécessitera des étapes supplémentaires de planification et évaluation avant le génotypage final des échantillons. La figure ci-dessous résume la procédure générale pour l'évaluation et l'utilisation d'une amorce ISSR pour le génotypage (Ng et al., 2015)

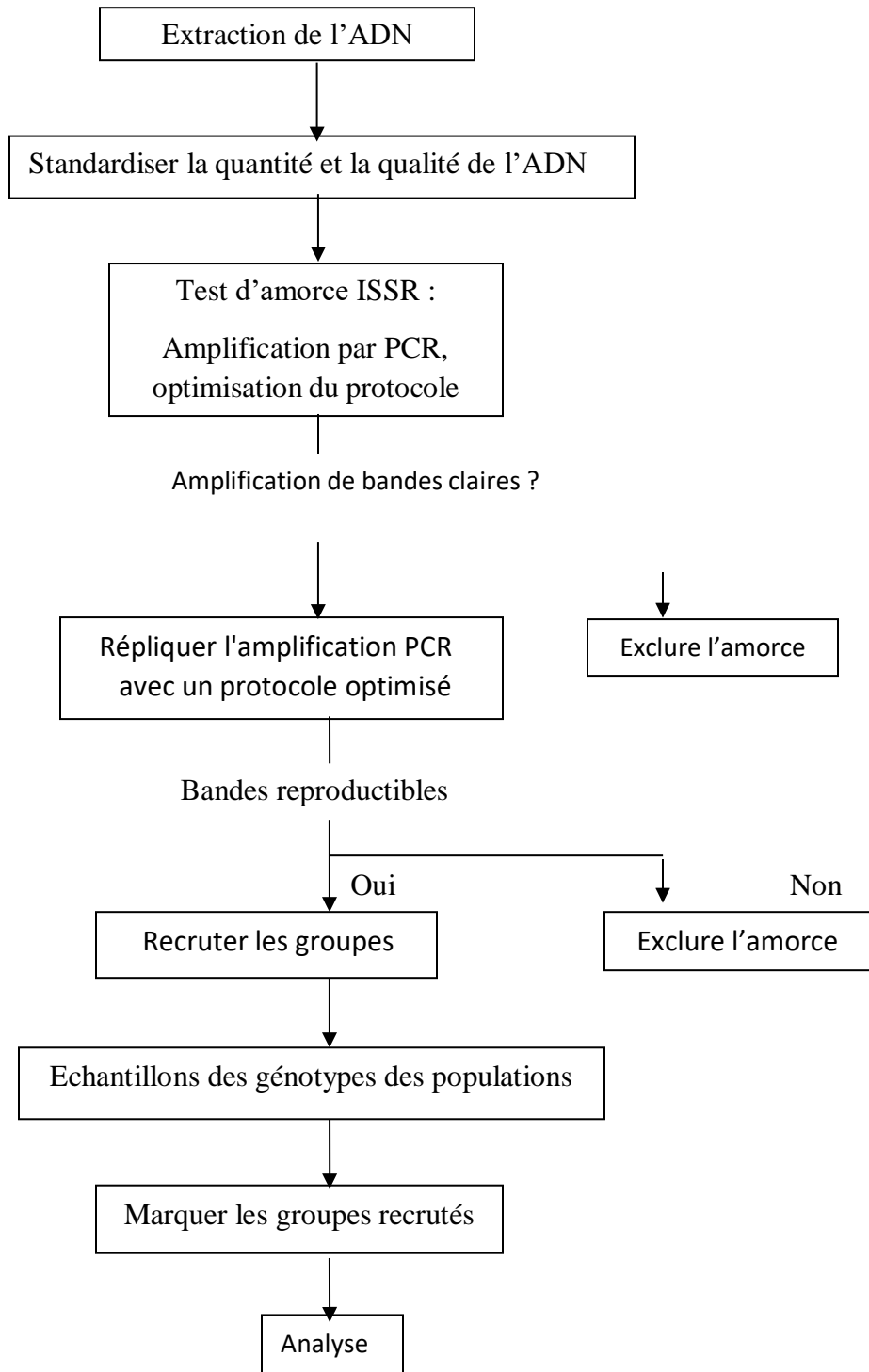


Figure 2: Organigramme recommandé pour les expériences de génotypage ISSR.

✓ Avantages et limites de cette technique

- Cette technique est simple et efficace en raison de sa reproductibilité et répétabilité élevée, générant un degré élevé de polymorphisme. Son utilisation est devenue de plus en plus courante (Tsumura et al., 1996).

- Les amorces ISSR sont plus robustes que les amorces RAPD car elles ont une plus grande surface d'ancrage et températures de recuit plus élevées, augmentant reproductibilité des produits (Tsumura et al., 1996).

- La génération de marqueurs ISSR utilise des séquences de microsatellites qui sont très variables et distribuées de manière omniprésente dans le génome, tout en emportant une reproductibilité supérieure par rapport à l'utilisation des RAPD et coûtant moins en temps et en argent qu'en utilisant les AFLP (Shafiei et al., 2015).

✓ Limites de cette technique

- La limitation de ce marqueur est liée au fait que, pour être dominant, la présence de la bande peut représenter la dominante homozygote ou l'individu hétérozygote, en supposant que l'absence de la bande est l'homozygote récessif. Cependant, la présence ou l'absence de la bande peut être liée à l'événement d'insertions ou de délétions dans le site de liaison de l'amorce (Zietkiewicz et al., 1994).

Matériel et méthodes

Matériel végétal et techniques expérimentales

I. Matériel végétal

Le matériel végétal est composé de jeunes feuilles de 54 accessions de *Thymus satureioides* provenant de 5 régions et 10 sites de prélèvement (Tableau 1), récupérée de l'essai installé dans la commune Houderrane, province de Khmésat. Les feuilles ont été lyophilisées dans un lyophilisateur type Christ alpha 1-4 LD plus pour servir à l'extraction de l'ADN.

Tableau 1: Régions et sites de prélèvements des 54 accessions de *Thymus satureioides*

	Régions	Sites de prélèvements	
<i>Thymus satureioides</i>	Azilal	Tamanait	60 accessions
		Affourar	
		Ait Atab	
	Ijoukake	Ounaine	
		Mjou	
		Tamssount	
	Ourika	Asni	
		Siti fatma	
	Immintanout	Immintanout	
	Er-Rachidia	Errachidia	

II. Techniques expérimentales

II.1 Extraction d'ADN

L'extraction de l'ADN nécessite 3 étapes primordiales, qui sont :

- ✓ Action physique : consiste à détruire les structures cellulaires par broyage mécanique.
- ✓ Action chimique (lyse chimique) : permet de solubiliser les composantes biochimiques du tissu et détruire les parois cellulaires.

- ✓ Purification (isolation) de l'ADN des autres molécules biologiques présentes dans les cellules (protéines, polysaccharides, composés phénoliques etc.), puis précipitation de l'ADN par l'alcool (isopropanol) et lavage par l'alcool (éthanol 70%).

II.1.1 Protocole d'extraction

L'extraction est réalisée en utilisant la technique CTAB décrite par Saghai-Marroof et al. (1984) avec des modifications mineures de (Diria et al., 2014), utilisation de 2 % CTAB au lieu de 1 % CTAB et utilisation d'eau déminéralisée stérile pour dissolution d'ADN au lieu de 10 mM NH₄OAc/0.25 mM EDTA.

Après avoir lyophilisés les échantillons pendant 48h, 60 mg des feuilles sont mis dans des tubes Eppendorf de 2ml et ont été broyées mécaniquement à l'aide des billes jusqu'à l'obtention d'une poudre homogène. A chaque tube ont été ajoutées 1mL du tampon d'extraction 2% CTAB et 2 µl de Mercaptoéthanol ; voir Annexe 1) préalablement chauffés à 65°C dans le bain marri pendant 20min.

L'extrait a été légèrement mélangé, mis à 65°C pendant une heure avec agitation toutes les 15 minutes puis les échantillons sont placés dans de la glace pendant 5min. 700 µL du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24/1) ont été ajoutés à l'extrait et agités vigoureusement pendant 15 min. L'extrait a été centrifugé à 12000 rpm à température ambiante pendant 15 min. La phase aqueuse (le surnageant) a été récupérée dans de nouveaux tubes de 2 ml. 2µl d'ARNase a été ajouté sur le surnageant puis chauffé à 37°C dans le bain marie pendant 30 min.

L'ADN a été précipité avec 700 µL d'isopropanol en remuant doucement jusqu'à l'homogénéisation de la solution et la formation des filaments d'ADN, puis déposé à 4°C pendant une nuit (ou bien 1h à -20°C). Le culot d'ADN a été récupéré par centrifugation à 12000 rpm pendant 10 minutes, puis lavé 2x avec 1ml d'éthanol 75% avec centrifugation réfrigérée de 4 °C pendant 5min après chaque lavage. Le culot d'ADN a été séché par un appareil (vacuum) puis 200 µL d'eau pure est ajouté pour dissoudre l'ADN qui est finalement stocké à 4°C jusqu'à utilisation.

II.2 Evaluation de la qualité et de la quantité d'ADN

II.2.1 Analyse de la qualité de l'ADN

La qualité d'ADN est analysée par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose 1% en comparant l'ADN des échantillons avec le marqueur de taille de 3Kb (Marqueur Bioline). L'agarose est

fondue à chaud dans TBE 5% (voir Annexe 2). 7µl d'ADN est mélangé avec 3µl de bleu d'agarose puis déposé dans les puits du gel, puis 5µl du marqueur de taille est déposé au final. Le gel a subi un voltage de 80 V, après 20 min, le voltage de migration a été monté à 120 V. Après la migration, le gel est coloré par le BET (bromure d'éthidium) pendant 20 min avec 40 tour/min d'agitation. Le gel est par la suite lavé par l'eau distillée durant 10 min avec 40 tour/min d'agitations puis visualisé sous UV et pris en photographie.

II.2.2 Evaluation de la quantité d'ADN

L'ADN de chaque échantillon est quantifié et qualifié à l'aide de Nano-Drop. Il permet de déduire la pureté des échantillons, ceci est généralement indiqué dans deux rapports : 260/280 et 260/230 qui correspondent à l'absorbance aux longueurs d'ondes 230, 260 et 280 nm.

La courbe devrait y avoir un pic à 260 nm, ce qui indique la présence d'acides nucléiques.

Le rapport 260/280 donne une indication de la pureté de l'échantillon de protéines contaminants. Puisque les protéines absorbent à 280 nm, un faible rapport 260/280 indique la présence de quantités élevées de protéines par rapport aux acides nucléiques. Le rapport 260/280 optimal est comprise entre 1,8 et 2.

Le rapport 260/230 est une valeur qui reflète la pureté de l'échantillon des sels et autres contaminants qui peuvent absorber à 230 nm tels que l'EDTA, les polyphénols et le chlorhydrate de guanidine. Le rapport 260/230 optimal est compris entre 1,8 et 2,2.

Après la mesure, une dilution des échantillons est faite afin d'obtenir une concentration de 10 ng/µl selon la formule suivante :

$$VI = (CF * VF) / CI$$

C : Concentrations initiale (i) et finale (f)

V: Volumes initial (i) et final (f)

III. Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) à l'aide des marqueurs ISSR

III.1 Mise au point du mixte réactionnel

La PCR permet d'amplifier des séquences cibles, afin de pouvoir identifier les marqueurs de l'individu. La spécificité de l'amplification est déterminée par les amorces qui sont spécifiques d'une séquence précise et unique du génome.

La composition du mélange réactionnel est celle décrite par (Houmnate et al., 2016) (tableau 1).

Le volume final nécessaire pour la réaction PCR est fixé à 10 μ l.

Tableau 2: Composition du mélange réactionnel pour PCR.

Composants (concentration dans la solution mère)	Volume pour une réaction d'un seul échantillon en μ l
Eau pure	5,5
Tampon 5X	2,4
Amorces (10Pmol)	1
Taq polymérase (5U/ μ l)	0,1
ADN	1

✓ Conditions de la PCR et choix des amorces ISSR

Parmi une trentaine d'ISSR dont dispose le laboratoire, on a testé sept amorces selon un gradient de température d'hybridation sur cinq échantillons pris au hasard puis sur la totalité des échantillons dans un Thermocycleur AerisTm à 96 puits.

Le programme utilisé suit le déroulement suivant : une première étape de dénaturation pendant 5 min à 95°C, puis 35 cycles comprenant : 30s à 95°C, 1 min à une température d'hybridation selon les amorces utilisées (Tableau 3), 2 min à 72°C, et enfin, une dernière réaction d'élongation à 72°C pendant 8 min. Cette dernière étape permet de compléter la synthèse des molécules en cours d'élongation. Les temps d'incubation à 72°C sont ajustés selon la longueur des fragments que l'on désire amplifier. La température d'hybridation est ajustée selon la température de fusion des amorces utilisées. Les produits PCR sont conservés à -20°C jusqu'au moment d'utilisation.

Tableau 3: Amorces ISSR utilisées, leurs séquences et températures d'hybridation.

Amorces	Séquences (5' à 3')	Température d'hybridation
I1	GAGAGA GAG AGA GAG AGA C	48.5
I3	GAGAGA GAG AGA GAG AGA A	51
UBC825	AGAGAGAGAGAGAGAGCT	51.5
UBC834	GAGAGAGAGAGAGAGACTC	51.5
UBC841	GAG AGA GAG AGA GAG AC	49
UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	49.5
UBC842	GAG AGA GAG AGA GAG ACG	51.5

III.2 Electrophorèse sur gel d'acrylamide

Les produits amplifiés ont été séparés sur gel d'acrylamide natif à 6% avec les composants suivants : 40% d'acrylamide / bis-acrylamide, 5X TBE à pH 8, 0.05% de TEMED et 0.5% d'Ammonium Persulfate (Annexe 2).

Pour la préparation du gel, les plaques ont été nettoyées dans la solution de NaOH qui élimine toute trace du gel restante. Par la suite, le gel est versé dans les plaques préparées. Après gélification, les plaques sont déposées dans l'appareil d'électrophorèse puis 6µl de bleu d'acrylamide a été ajouté au produit PCR, après un mélange avec la micropipette, 7µl de chaque échantillon est déposée dans les puits de gel. Au final, 4 µl du marqueur de taille de 50 pb a été déposée. Le voltage de migration a été déterminé à 300 V. Après migration, le gel a été coloré pendant 5min dans la solution du bromure d'éthidium (BET à 200µl/2L), puis les bandes ont été visualisées sous UV.

III.3 Analyses statistiques

Le scoring des allèles a été réalisé sur les gels. Les allèles amplifiés par amorces ISSR ont été notés par présence (1) et absence (0) de l'allèle.

Le logiciel SAS (Statistical Analysis System) Software, version 9.2 (SAS Institute, 2009, Cary, USA) a été utilisé pour calculer les paramètres de la diversité génétique à savoir le nombre d'allèles, l'indice de Nei et l'hétérozygotie attendue.

Le dendrogramme Neighbor-joining a été généré par la méthode (Saitou et Nei, 1987) utilisant PowerMarker et visualisé employant soit le logiciel MEGA5 (Tamura et al., 2011) soit le logiciel DARwin Version 6. L'analyse en composantes principales a été effectuée à l'aide des procédures appropriées d'Excel Stat.

Résultats et discussion

I. Résultats

I.1 Qualité de l'ADN extrait

L'ADN de 54 accessions a été extrait avec succès. Les résultats sont présentés sur le gel d'agarose, ce dernier montre une bonne qualité d'ADN, la présence de bandes à chaque échantillon montre que l'ADN n'est donc pas dégradé et l'extraction est réussie (Figure 3),

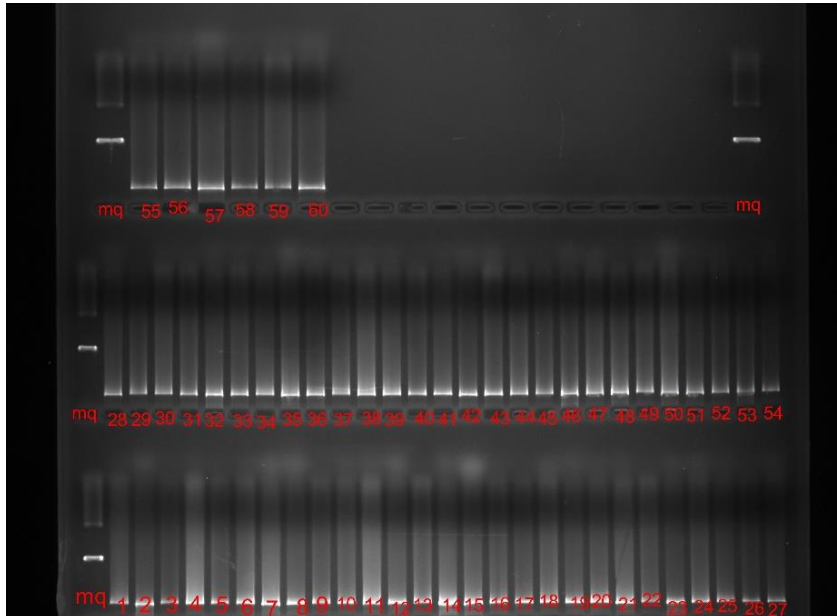


Figure 3: Profils électrophorétiques d'ADN génomique de 54 accessions de *Thymus saturoioides* sur gel d'agarose 3%, TBE 5x. M III : Marqueur Lambda DNA/Hind III – promega

Le NanoDrop a montré des concentrations élevées d'ADN, une concentration allant jusqu'à 1452 ng/μl pour certaines accessions (TS9) ; il a également révélé des valeurs optimales des deux ratio 260/280 (entre 1.8 et 2) et 260/230 (entre 1.8 et 2.2) (Figure 4).

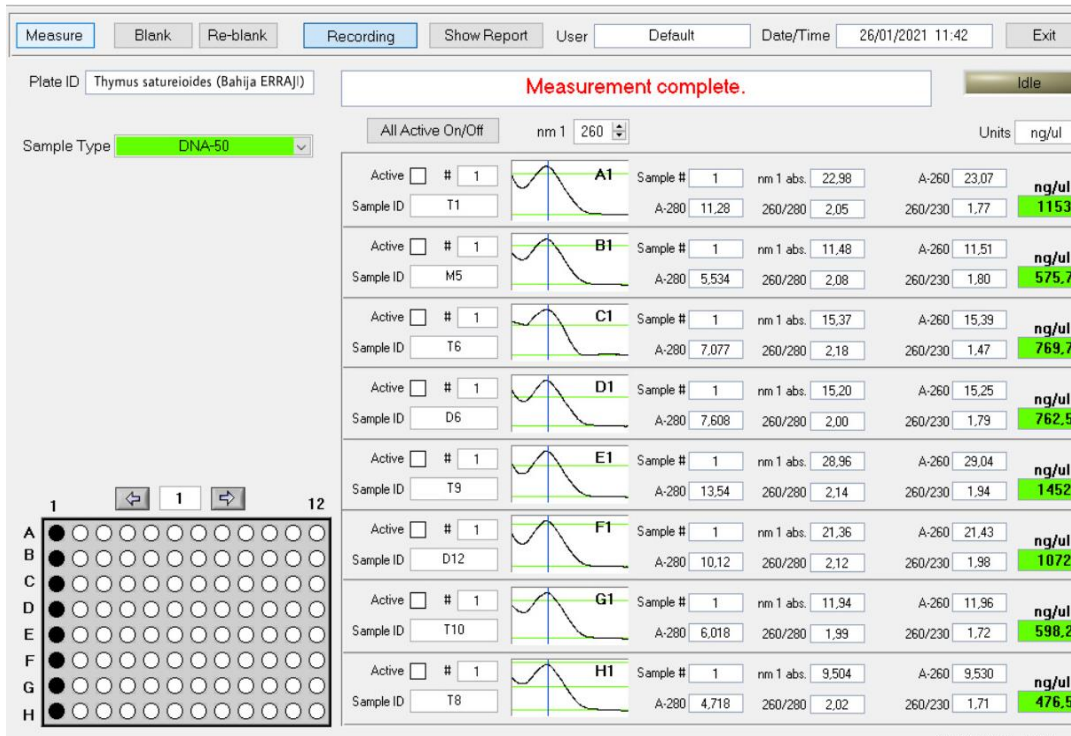


Figure 4: Exemple du résultat donné par le NanoDrop pour 8 individus de *Thymus Satureioides*.

I.2 Caractérisation moléculaire de la diversité génétique par les marqueurs ISSR

Parmi les sept marqueurs ISSR testés, quatre ont généré des profils bien lisibles et reproductibles. Ils ont donné un nombre total de 67 allèles, déterminé à partir du scoring, chez 54 accessions de *Thymus Satureioides*. Le nombre d'allèles par locus est compris entre 12 pour le marqueur UBC825 et 23 allèles pour le marqueur I1 (Tableau 5).

Tableau 4: Nombre des différentes bandes (NbT), Nombre des bandes uniques (NbU), moyenne d'indice de Shannon, d'He, d'Na, d'Ne et le pourcentage de polymorphisme des 54 accessions révélé par les 4 marqueurs ISSR.

Marqueurs ISSR	Nb total des bandes	Nb des bandes uniques	I moyenne	Na moyenne	Ne moyenne	He moyenne	P%
I1	23	23	0.204	2	1.134	0.107	100
UBC825	12	12	0.362	2	1.354	0.224	100
UBC834	18	18	0.199	2	1.141	0.107	100
UBC841	14	14	0.354	2	1.359	0.222	100

Le pourcentage de polymorphisme de loci (%P), le nombre des allèles efficaces (Ne), l'hétérozygotie attendue (He) et l'indice de diversité de Shannon (I) ils ont été calculés pour évaluer la diversité génétique et le pouvoir discriminant de chaque amorce au sein du matériel génétique analysé. L'ensemble des amorces ont donné un pourcentage de polymorphisme à 100% (Tableau 5). Le nombre d'allèles le plus élevé (23 allèles) était noté chez le marqueur I1, tandis la valeur la plus basse des allèles (12allèles) a été enregistrée chez les marqueurs UBC825.

Le marqueur UBC841 a le plus efficace allèle (Ne= 1,359) suivi de UBC825 (Ne=1,354) et UBC834 (Ne=1,141) et I1 (Ne=1,134).

Le marqueur UBC825 a une a enregistré l'indice de Shannon le plus élevé (I= 0,362) et par conséquent a révélé la plus grande diversité au sein des populations étudiés, suivi de UBC841 (I=0,354) avec I1 (I=0,204). Alors que le marqueur UBC834 a révélé une faible diversité (I=0,199).

✓ Etude de similarité

L'indice de similarité le plus élevé est observé entre l'accession TS39 et TS40 qui proviennent de la même région Ourika avec une valeur de 81% alors que les autres accessions TS31 et TS35 appartiennent à la région Ijoukak, TS7 et TS 44 qui proviennent de deux région Azilal et Ourika, TS4 et TS46 de la région Azilal et Ourika et TS29 et TS46 de la région Ijoukak et Ourika présente l'indice de similarité le plus éloigné avec une valeur de 5%.

Une dissimilarité de 100% est rencontré dans l'accession TS1 avec TS34 et TS46 car la similarité entre ces accessions et égale a 0.

Accession	TS1	TS2	TS4	TS5	TS6	TS7	TS8	TS9
TS1	1							
TS2	0,2	1						
TS4	0,28	0,36	1					
TS5	0,21	0,38	0,47	1				
TS6	0,20	0,44	0,52	0,56	1			
TS7	0,16	0,15	0,22	0,31	0,22	1		
TS8	0,08	0,16	0,10	0,25	0,16	0,70	1	
TS9	0,26	0,35	0,35	0,36	0,42	0,43	0,46	1

Figure 5: Exemple de la similarité entre 9 accessions basées sur les marqueurs ISSR

✓ Analyse de dendrogramme

Suite à l'analyse et l'observation du dendrogramme conception basé sur l'indice de similarité on constate que l'arbre contient 6 groupes. Chaque groupe contient des sous-groupes, et chaque sous-groupe contient des clades ou clusters, qui contiennent à leur tour des feuilles ; chaque feuille représente une accession, donc, chaque clade représente un ensemble d'accessions qui sont similaires et qui ont les mêmes caractéristiques.

Le dendrogramme global de l'ensemble des individus étudiés montrant la relation génétique entre les 54 accessions est présenté dans la Figure 6. En utilisant les 4 marqueurs ISSR, nous avons pu étudier la diversité génétique des individus. A une distance génétique d'allèles partagés égale à 17%, les individus ont formé 6 groupes. Le premier groupe contenant TS1, TS12, TS13, TS29, TS23, TS30, TS27, TS24 de deux régions Azilal et Ijoukak. Le deuxième groupe est formé de TS2, TS4, TS5, TS6, TS56, TS10, Ts11 de la même région Azilal. Le troisième groupe est celui de TS7, TS8, TS9, TS14 de la région Azilal. Le quatrième groupe contenant les individus TS16, TS20, TS21, TS31, TS32 de deux régions Azilal et Ijoukak. TS22, TS28, TS42, TS50, TS45, TS41, TS49, TS53, TS57, TS54, TS43, TS55, TS60 formant le cinquième groupe et appartiennent à 4 régions différentes Azilal, Ijoukak, Errachidia et Immintanout. Alors que le sixième groupe restant est composé de TS33, TS38, TS 51, TS59, TS48, TS37, TS39, TS40, TS47, TS44, TS35, TS58, TS36, TS34, TS46 qui appartiennent à 4 régions Ijoukak, Ourika, Errachidia et Immintanout.

Tableau 5: Tableau de 6 groupes avec leurs accessions

Les groupes	Les accessions
Groupe 1	TS1, TS12, TS13, TS29, TS23, TS30, TS27, TS24
Groupe 2	TS2, TS4, TS5, TS6, TS56, TS10, Ts11
Groupe 3	TS7, TS8, TS9, TS14
Groupe 4	TS16, TS20, TS21, TS31, TS32. TS22, TS28, TS42, TS50, TS45, TS41, TS49, TS53, TS57, TS54, TS43, TS55, TS60
Groupe 5	TS22, TS28, TS42, TS50, TS45, TS41, TS49, TS53, TS57, TS54, TS43, TS55, TS60

Groupe 6	TS33, TS38, TS 51, TS59, TS48, TS37, TS39, TS40, TS47, TS44, TS35, TS58, TS36, TS34, TS46.
----------	--

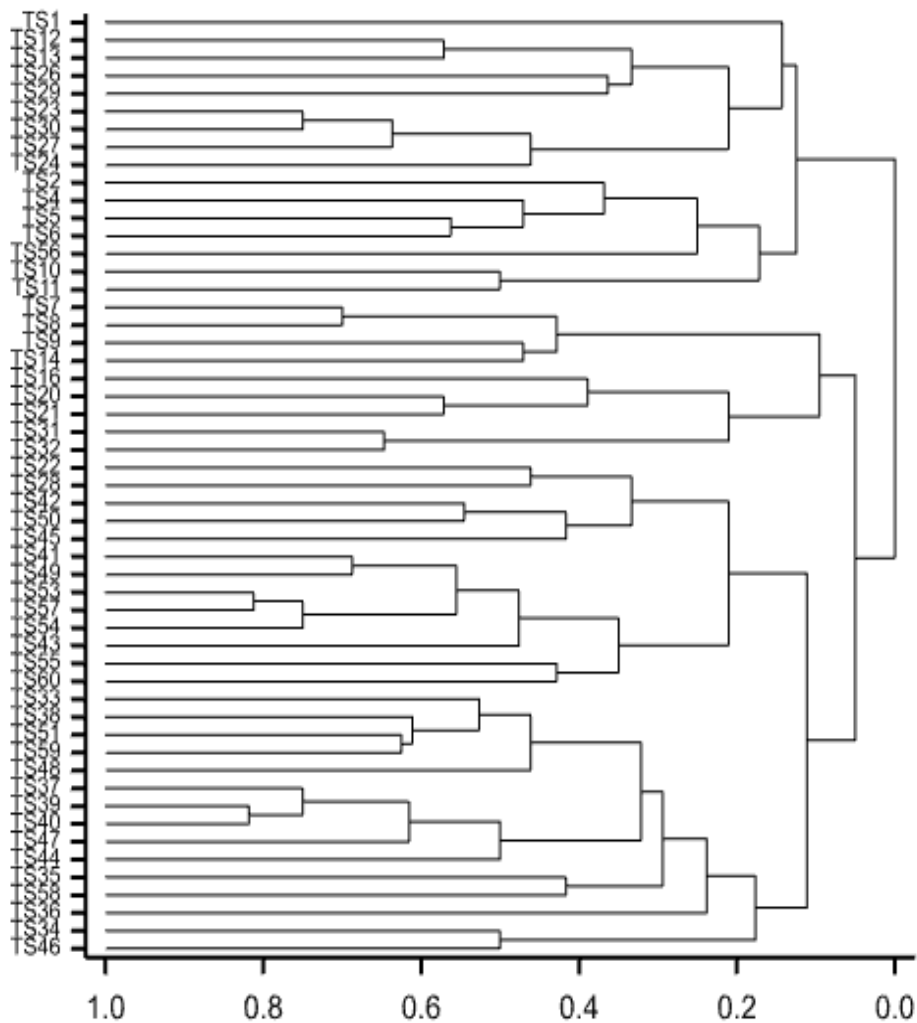


Figure 6: Dendrogramme global montrant la relation génétique entre 54 individus, Révélé par la méthode Neighbour-joining (NJ)

✓ Etude de la variance

Les résultats ont montré une variation moléculaire plus élevée au sein des accessions avec un pourcentage égal à 81%, et une variation de 19% entre les accessions.

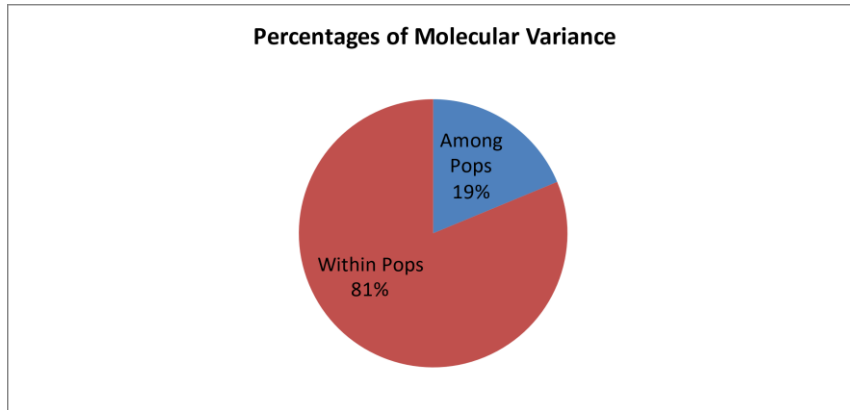


Figure 7: pourcentage de la variance moléculaire

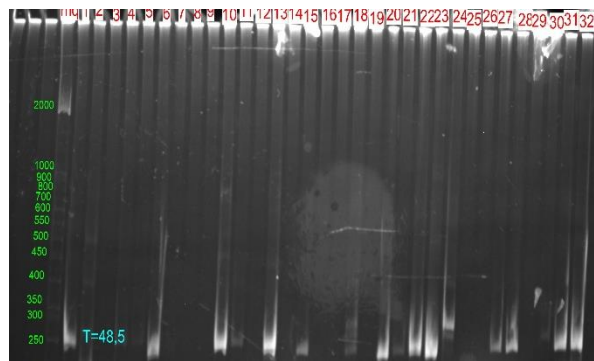


Figure 8: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce I1.

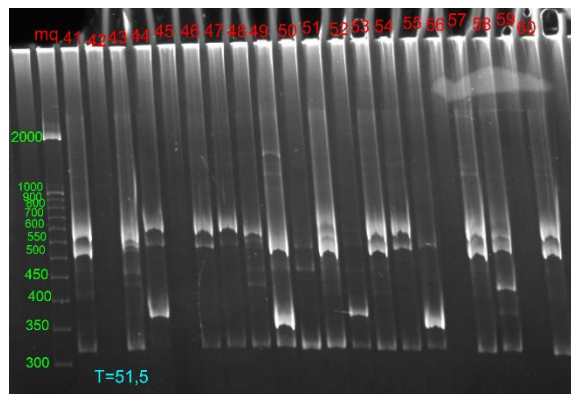


Figure 9: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC825.

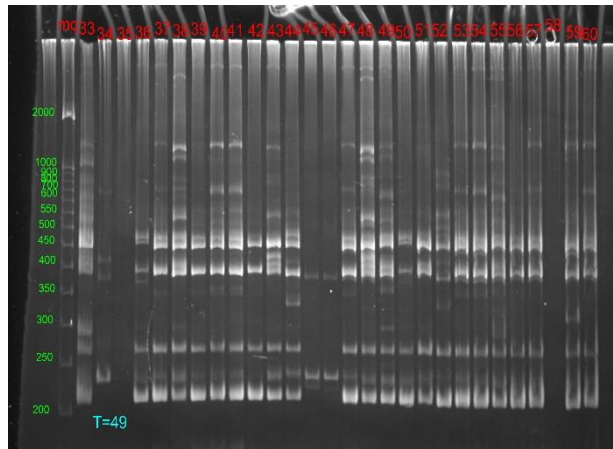


Figure 10: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC834.

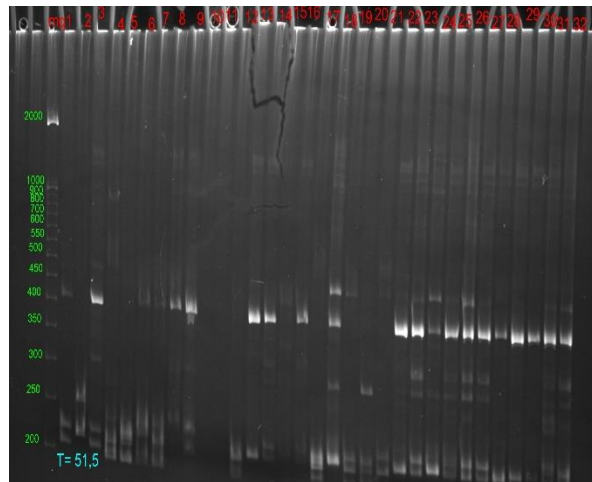


Figure 11: Exemple de profil génomique ISSR du polymorphisme des génotypes étudiés généré par l'amorce UBC841.

II. Discussion

Dans notre étude, sept amorces ISSR ont été testées pour quantifier la diversité génétique qui existe dans un ensemble de 54 accessions de *Thymus satureioides*. Quatre amorces ISSR ont été retenues pour le génotypage de toute la collection. Ces amorces sont I1, UBC825, UBC834 et UBC841, elles ont produit des profils polymorphes, avec des bandes non ambiguës et reproductibles. La taille des bandes varie entre 150 pb et 1800 pb. Les résultats que nous avons trouvés indiquent un polymorphisme élevé (100%), ce niveau élevé de polymorphisme est comparable aux résultats de certaines recherches moléculaires similaires sur des plantes médicinales de la famille des Lamiaceae (Liu et al., 2006 ; Agostini et al., 2008 ; Trindade et al., 2008 ; Agostini et al., 2010). Cela est également conforme aux études antérieures qui ont été réalisées sur l'une des espèces de *Thymus*, à l'aide des marqueurs AFLP (Rabiei et al., 2019) et des marqueurs ISSR (Yousefi et al., 2015) qui ont signalé un polymorphisme de 96,76 %. Rahimmalek et al, (2009) ont aussi observé un polymorphisme de 88,9% chez 17 accessions de *Thymus daenensis*, une plante médicinale aromatique endémique de l'Iran.

Toujours concernant le polymorphisme Yavari et al. (2012) ont évalué la diversité génétique de certaines populations sauvages de thym d'Azerbaïdjan en utilisant des amorces RAPD et ils ont observés un polymorphisme de 94,9%.

De plus notre étude a montré un polymorphisme génétique parfaitement significatif parmi 54 accessions de *Thymus Satureioides* étudiées, à l'aide des marqueurs ISSR. En effet, un total de 67 bandes scorables ont été identifiées grâce à l'amplification de 4 amorces ISSR. L'amplification variait de 1 bande à 49 bandes UBC825, avec une moyenne de 16,7, ce qui est comparable avec une étude de Rahimmalek et al, (2009) qui ont trouvé un nombre moyen de bandes qui varie entre 16,7 et 16,25.

En se basant sur les marqueurs moléculaires ISSR, nous avons montré que la variation est plus élevée au sein d'une population avec un pourcentage de 81% alors que celle entre les populations est de 19%. Sostarica et al., 2012 ont rapporté une variation génétique de 79,40 % au sein des populations dans une étude réalisée sur 32 populations appartenant à sept espèces du genre *Thymus*, section *Serpyllum*, en Serbie, à l'aide des marqueurs AFLP. Au contraire Hadian et al., 2014 ont étudié la diversité génétique de *Thymus caramanicus* une espèce endémique d'Iran à l'aide des marqueurs ISSR, ils ont trouvé une variation au sein des populations de 67% et un pourcentage de 33% entre les populations cela explique que la variation et les changements significatifs au sein de la même population par le flux génétique est due à la migration des gènes d'une population à l'autre et par conséquent un échange de matériel génétique entre les populations. Les études précédentes ont montré l'efficacité et la performance très élevées du marqueur ISSR dans l'étude de la variation génétique et aussi pour la distinction entre les populations de l'espèce de *Thymus Satureioides* avec des rapports de parenté étroits.

La matrice binaire du produit amplifié par PCR a été utilisée pour le calcul de l'indice de similarité, dont la similitude maximale a été identifiée entre les accessions qui appartiennent à la même région Ourika et au même site de prélèvement Asni avec un pourcentage de similitude égal à 81 %, cela indique que ces deux accessions sont voisins et très proches entre eux, alors que une faible similitude de l'ordre de 5 % est parfaitement remarquées entre la majorité des accessions des populations de la région Azilal, Ijoukak et Ourika prélevés de Tamssount, Affourar, Sitifatma, Tamanait et Mjou et cela signifie que ces accessions sont très éloignées et distantes génétiquement. En outre, une relation génétique entre 54 accessions de *Thymus Satureioides* a été évaluée par la construction d'un dendrogramme à l'aide de données d'amplification de 4 marqueurs ISSR. Le dendrogramme constitue un diagramme qui permet d'organiser et hiérarchiser les accessions étudiées en des groupes en arborescence en fonction de leur similitude.

Suite à l'observation du dendrogramme, nous avons constaté que les 54 accessions de *Thymus Satureioides* forment 6 groupes majeurs, et chaque groupe majeur est subdivisé en des sous-groupes. Le premier groupe contenant des accessions de deux groupes Azilal et Ijoukak. Le deuxième et le troisième groupe sont formés d'accessions d'une seule région Azilal. Quant au quatrième groupe il est formé d'accessions de deux régions Azilal et Ijoukak. Le cinquième groupe regroupe des accessions appartenant à quatre régions Azilal, Ijoukak, Errachidia et Immintanout. Alors que le sixième groupe restant est composé d'accessions qui appartiennent à quatre régions Ijoukak, Ourika, Errachidia et Immintanout. Ce qui confirme le degré élevé de la diversité génétique au sein et entre les populations de *Thymus Satureioides* étudiés révélé aussi par l'analyse moléculaire de la variance, par les distances génétiques observées et par le dendrogramme.

On se basant sur ce qui précède, le premier et le troisième groupe regroupe les accessions de la même région Azilal cela signifie qu'il y'a une conservation au sein de la même région mais avec un brassage génétique entre ces accessions confirmé par le pourcentage de la variabilité moléculaire observé au sein des populations et qui est de l'ordre de 81%. Ce qui signifie qu'il y a eu un flux de gènes entre les accessions de ces deux groupes. Tandis que le cinquième groupe regroupe des accessions appartenant à quatre régions Azilal, Ijoukak, Errachidia et Immintanout. Alors que le sixième groupe restant est composé d'accessions qui appartiennent à quatre régions Ijoukak, Ourika, Errachidia et Immintanout.

Ces résultats sont cohérents avec les résultats obtenus par Rahimamalek et al., (2009), Ils ont étudié la diversité génétique de 17 accessions de *Thymus daenensis* collectées dans différentes régions géographiques d'Iran, Ils ont trouvé que la diversité génétique et l'hétérozygotie attendue étaient plus importantes dans le groupe A que dans le groupe B, ce qui suggère que le germoplasme dont ils ont collecté le groupe A est plus variable.

Donc les résultats de notre étude montrent que les accessions provenant des différentes régions se regroupant dans un seul groupe signifie que ces accessions ont le même patrimoine génétique. On peut expliquer cela par les mouvements des plantes par l'homme, qui ont conduit à la dispersion des plantes dans différentes zones et donc à leur croissance et à leur émergence dans ces zones, ou à la suite d'un déplacement par des variables naturelles.

Les résultats de cette étude aideront à comprendre la variation génétique et la dynamique de l'évolution de *Thymus Satureioides* et à élargir la base génétique pour la sélection de Thymus. un renforcement de l'étude avec plus de marqueurs est recommandé.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Thymus Satureioides (endémique du Maroc) est une espèce qui fait l'objet de plusieurs usages, elle est trop exploitée et donc pas durable. La plupart des zones de croissance du thym sont dans les montagnes, qui sont soumises à des facteurs de dégradation (déboisement, surpâturage, érosion et impacts des changements climatiques) l'espèce est menacée. La caractérisation moléculaire de 54 génotypes, par l'emploi de 7 marqueurs moléculaires ISSR au cours de la présente étude a montré que 4 marqueurs parmi ces 7 se sont avérés très efficaces en termes de mise en évidence du polymorphisme moléculaire chez *Thymus satureioides* ainsi que pour l'exploration des relations génétiques entre les génotypes. Ces marqueurs sont I1, UBC825, UBC834 et UBC841. Ainsi, l'utilisation de ces 4 amorces a permis de déceler une grande diversité génétique au sein des génotypes étudiés. Les résultats de l'amplification a donné des bandes variant de 1 à 49 ; avec une moyenne de 16,7 bandes par amorce. Ce nombre témoigne du niveau élevé de polymorphisme au sein des génotypes révélés par les amorces sélectionnées.

Les quatre amorces utilisées ont généré des profils polymorphes avec un pourcentages de polymorphisme variable et significatif qui atteint 100%. L'étude de la distance génétique montre qu'un grand nombre d'accessions appartiennent à différentes régions. La similarité minimale est de 5 maximale est de 81%.

Le dendrogramme phylogénétique a permis de montrer l'existence d'une structure génétique évidente des accessions de *Thymus satureioides*. La distinction en plusieurs groupes qui regroupe des individus de différentes régions montre la présence de pools génétiques différents.

Par ailleurs, les résultats de notre étude procurent des indices importants dans la compréhension de la diversité génétique de l'espèce étudiée, ce qui peut contribuer à l'élaboration et à la planification des stratégies de la conservation de cette ressource génétique limitée et en danger. Les différents pools génétiques et la grande diversité vont constituer une base pour élargir la variabilité génétique et le profil variétal de *Thymus satureioides*.

Au terme de ce travail nous permettons de recommander ce qui suit :

- ✓ La replantation du thym dans les zones dégradées est souhaitable.
- ✓ Utiliser d'autre marqueurs (type Scot) pour approfondir l'étude la diversité et la structuration génétique de cette espèce très demandées et valorisées par les Marocains.

- ✓ Associer l'analyse moléculaire aux marqueurs phénotypiques pour mieux comprendre la distinction en pools génétiques et les relations génotypiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Adam A. F. et Dron M., 1993.** Les outils moléculaires et leur applications à l'amélioration des plantes. Dans: Le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire et des gènes? Ed. AURELP-UREF. John Libbey Eurotex, Paris, pp. 23-46.
- Ait-Sidi-Brahim, M., Markouk, M., Larhsini, M., 2019.** Moroccan Medicinal Plants as Antiinfective and Antioxidant Agents, in: New Look to Phytomedicine. Elsevier, pp. 91–142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814619-4.00005-7>.
- Barros L., Heleno S.A., Carvalho A.M. & Ferreira I.C.F.R. 2010.** Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolic. *Food Sci. Technol.* 43, 544–550.
- Bassaid Oulhadj, R., & Zermane, A. (2020).** Extraction de l'huile essentielle de *Lepidium Sativum* par plusieurs.
- Bellakhdar J., Claiss R., Fleurentin J. & Younos C. 1991.** Repertory of standard herbal drugs in the Moroccan pharmacopoea. *J. Ethnopharmacol.* 35, 123–143.
- Bellekhdar J. 1997.** Pharmacopée marocaine traditionnelle : Médecine arabe ancienne et savoirs populaire, Paris, Edit. Ibis Press, 764 p.
- Benabid A. 2000.** « Flore et écosystèmes du Maroc », Évaluation et préservation de la biodiversité. Ibis Press, Paris, p. 360.
- Bertrand, K. A., Tamimi, R. M., Scott, C. G., Jensen, M. R., Pankratz, V. S., Visscher, D., ... & Vachon, C. M. (2013).** Mammographic density and risk of breast cancer by age and tumor characteristics. *Breast Cancer Research*, 15(6), 1-13.
- Bouiamrine, E.H., Bachiri, L., Ibjibjen, J., 2017.** Fresh medicinal plants in middle atlas of Morocco: Trade and threats to the sustainable harvesting 7
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2009).** Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant molecular biology reporter*, 27(1), 86-93.
- De vienne D., 1998.** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, France, 195pages. ISSN : 1144-7605.
- Diria, G., Abdelwahd, R., Mustapha, L., Mhamed, B., F., G., Aziz, A., & Ibriz, M. (2014).** Marker assisted evaluation for resistance to *Septoria tritici blotch* in Moroccan wheat recombinant inbred lines (RILs). *International Journal of Agriculture Science Research*, 3, 213-221.
- Dyke F.V. (2008)** Conservation biology, foundations, concepts, applications. Springer.
- El Bouzidi L., Alaoui Jamali C., Bekkouche K., Hassani L., Wohlmuth H., Leach D. & Abbad A. 2013.** Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oils obtained from wild and cultivated Moroccan *Thymus* species. *Ind. Crop. Prod.* 43 (2013) 450–456.
- Emberger L. 1971.** Considérations sur les genres de la flore Marocaine. In Travaux de botanique et d'écologie, livre jubilaire, Paris, Ed. Masson, 520p.

- Elhabazi K., Ouacherif A., Laroubi A., Aboufatima R., Abbad A., Benharref A., Ziad A., Chait A. & Dalal A. 2008.** Analgesic activity of three thyme species, *Thymus satuireioides*, *Thymus maroccanus* and *Thymus leptobotrys*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, Vol. (2) pp. 262-267.
- EL Rhaffari L. 2008.** Catalogue des plantes potentielles pour la conception de tisanes. Faculté des Sciences et Techniques d'Errachidia, Equipe Environnement et Santé.
- Fennane M., Ibn Tattou M., Mathez J., Ouyahya A. & El Oualidi J. 2007.** Flore pratique du Maroc, 2. Angiospermae (Leguminosae-Lentibulariaceae); *Trav. Ins. Sci. Sér. Bot.*, n° 38. Institut Scientifique, UMV Agdal, Rabat, 636 pp.
- Franchomme P. & Péroël D. 1990.** L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles. Roger Jallois éditeur. Limoges. 445 p.
- Ghasemi Pirbalouti A. 2009.** "Medicinal plants used in Chaharmahal and Bakhtyari districts. Iran". *Herba Polon.* 55: 69-75.
- Goodfield J and Toulmin S. (1964).** The Qattara: A Primitive Distillation and Extraction Apparatus Still in Use. *Isis.* 55 (3), p339-342.
- Gruning Ch. R., Sieber T. N. et Holdenrieder O.,2001.** Characterization of dark septate endophytic fungi (DSE) using inter-simple-sequence-repeat-anchored polymerase chain reaction (ISSR-PCR) amplification. *Mycol. Res.* 105:24-32.
- Hadian, J., Bigdeloo, M., Nazeri, V., & Khadivi-Khub, A. (2014).** Assessment of genetic and chemical variability in *Thymus caramanicus*. *Molecular biology reports*, 41(5), 3201-3210.
- Houmanat K., Charafi J., Mazouz H., El Fechtali M., Nabloussi A., 2016.** Genetic diversity analysis of safflower (*Carthamus tinctorius*L.) accessions from different geographic origins using ISSR markers. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18 (6): 1081-1087.
- Jalas J. 1971.** Notes on *Thymus* L. (Labiatae) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. *Bot. J. Linn. Soc.*, 64, 199–215.
- Jamaledine, M., El Oualidi, J., Taleb, M. S., El Alaoui-Faris, F. E., & Benzine, A. (2019).** Les plantes aromatiques et médicinales au Maroc : statut, endémisme, chorologie et bioclimat. *Médecine thérapeutique*, 25(3), 185-191.
- Lamrani-Alaoui, M., Hassikou, R., 2018.** Rapid risk assessment to harvesting of wild medicinal and aromatic plant species in Morocco for conservation and sustainable management purposes. *Biodivers Conserv* 27, 2729–2745. <https://doi.org/10.1007/s10531-018-1565-3>.
- Lesica P & Allendorf FW (1999)** Ecological genetics and the restoration of plant communities: mix or match? *Restoration ecology* 7(1):42-50.
- Liu J., L. Wang, Y. Geng, Q. Wang, L. Luo, and Y. Zhong (2006).** Genetic diversity and population structure *Lamiophlomis rotata* (Lamiaceae), an endemic species of Qinghai-Tibet Plateau. *Genetica* 128: 385-394
- McCouch Susan R., Keyan Zhao., Mark Wright., Chih-Wei Tung., Kaworu Ebana Michael., 2010.** Development of genome-wide SNP assays for rice. *Breed.* 60, 524–535

Melero C. P., Medarde M, and Feliciano A.S, (2000). A Short Review on Cardiotoxic Steroids and Their Aminoguanidine Analogues, *Molecules*, Vol 5: 51-81.

Muthu C., Ayyanar M., Raja N. & Ignacimuthu S. 2006. Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram district of Tamil Nadu, India. *J Ethnobiol. Ethnomed.*, 2:43, 1-10.

Morales R. 2002. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: Stahl Biskup, E., Saez, F. (Eds.), *Thyme: The Genus Thymus*. Taylor & Francis, London, pp. 1-43.

Napoli E. M., Curcuruto G. & Ruberto G. 2010. Screening of the essential oil composition of wild Sicilian thyme. *Biochem. Syst. Ecol.* 38; 816–822.

Narasimhan S., P. Padmesh, and G.M. Nair (2006). Assessment of genetic diversity in *Coscinium fenestratum*. *Biol. Plantarum* 50: 111-113.

Newman D. J. and Cragg G. M., (2007). Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years, *J. Nat. Prod*, Vol 70: 461-477.

Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right. *ASM Sci J*, 9(1), 30-39.

Rabiei, B., Rastjoo, M., Aliakbar, A., & Kordrostami, M. (2019). Phylogenetic relationships and genetic diversity of landrace populations of thyme (*Thymus* spp.) of Iran using AFLP markers and GC–MS. *Brazilian Journal of Botany*, 42(4), 613-621.

Rahimmalek, M., Bahreininejad, B., Khorrami, M., & Sayed Tabatabaei, B. E. (2009). Genetic variability and geographic differentiation in *Thymus daenensis* subsp. *daenensis*, an endangered medicinal plant, as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Biochemical genetics*, 47(11), 831-842.

Rasooli I. & Mirmostafa S. A. 2002. Antibacterial properties of *Thymus pubescens* and *Thymus serpyllum* essential oils. *Fitoterapia*, 73, 244–250.

Saha, A., Basak, B.B., 2020. Scope of value addition and utilization of residual biomass from medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products* 145, 111979. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111979>

Santoni S., Faivre-Rampant P., Prado E., Prat D., 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. INRA, Station de génétique et d'amélioration des plantes, Centre INRA de Montpellier, 2, place Viala, 34060 Montpellier cedex 01, France, 9 :311-327

SAGHAI-MAROOF M. A., SOLIMAN K. M., JORGENSEN R. A. Et ALLARD R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *PNAS*, 81, 8014-8018.

Sostarica I, Liberb Z, Grdisac M, Marind PD, Stevanovica ZD, Satovicc Z (2012) Genetic diversity and relationships among species of the genus *Thymus* L. (section *Serpyllum*). *Flora* 207:654– 661

Stahl-Biskup E. & Saez F. 2002. *Thyme, The genus Thymus*. Taylor and Francis. (331 pp).

Sunar S., O. Aksakal, N. Yildirim, G. Agar, M. Gulluce, and F. Sahin (2009). Genetic diversity and relationships detected by FAME and RAPD analysis among *Thymus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Rom. Biotechnol. Letters* 14: 4313-4318

Shafiei-Astani, B., Ong, A. H. K., Valdiani, A., Tan, S. G., Yien, C. Y. S., Ahmady, F., ... & Kuar, T. (2015). Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): Comparative potentials of SSRs versus ISSRs. *Gene*, 571(1), 107- 116.

Tahiri B., Rejdali M. & Atbib M. 1998. Contribution à l'étude caryologique de certaines espèces marocaines du genre *Thymus* L. (Labiatae). *Fl. Medit.*, 8: 41-47.

Tsumura, Y., Ohba, K., & Strauss, S. H. (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and applied genetics*, 92(1), 40-45.

Yavari A, Nazeri V, Sefdkon F, Zamani Z, Hassani M (2012) Evaluation of genetic diversity among and within some endemic populations of *Thymus migricus* Klokov & Desj.-Shost using RAPD molecular markers. *Iran J Med Aromat Plants* 28:35–47

Yang W., De Olivera A. C., Godwin I., Schertz K. and Bennetzen J. L.,1996. Comparison of DANN marker technologies in characterization plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Sci.* 36:1669-1676

Yousefi, V., Najaphy, A., Zebarjadi, A., & Safari, H. (2015). Molecular characterization of *Thymus* species using ISSR markers. *JAPS : Journal of Animal & Plant Sciences*, 25(4).

Wiesner I. et Wiesner ova D.,2003. Effect of resolving medium and staining procedure on inter-simplesequence-repeat (ISSR) patterns in cultivated flax germplasm. *Genet. Res. Crop Evol.* 50:849-853

Zarzuelo A, Crespo E. (2002). In: *The genus Thymus*. Edited by Stahl-Bi-skup E, Saez F. The medicinal and non-medicinal uses of Thyme. London, New York: Taylor & Francis. p263-292.

Zhang H. W., Song, Y. C., Tan, R. X., (2006). Biology and chemistry of endophytes. *Nat Prod Rep*, Vol 23: 753-771.

Zietkiewicz E., Rafalski A. et Labuda D.,1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics.*, 20:176-183.

Zrira, S., 2017. Some Important Aromatic and Medicinal Plants of Morocco, in: Neffati, M., Najjaa, H., Máthé, Á. (Eds.), *Medicinal and Aromatic Plants of the World - Africa Volume 3, Medicinal and Aromatic Plants of the World*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 91–125. https://doi.org/10.1007/978-94-024-1120-1_5

LES ANNEXES

Annexe 1

Solutions nécessaires pour l'extraction

Solution stock pour EDTA

0,5 M EDTA (pH 8)	Pour 100 ml
EDTA	18,612
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 100 ml

Ajuster le pH à 8 par le NaOH

Solution stock Tris-HCL

1M tris-HCL	Pour 100 ml
Tris-base	12,114
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 100 ml

Ajuster le pH à 8 avec l'HCL

Solution stock NaCl

5M NaCl	Pour 300 ml
NaCl	87,66
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 300 ml

Solution stock du tampon d'extraction 2x CTAB

2X CTAB	Pour 100 ml	Pour 500 ml
0,5 M EDTA (pH 8)	6 ml	30 ml
1M Tris-HCL (pH 8)	15 ml	75 ml

5M NaCl	21 ml	105 ml
CTAB	2g	10 g
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 100 ml	Ajuster jusqu'à 500 ml

Solution de Chloroforme / Isoamyl alcool

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

Solution de 70% Ethanol

70% éthanol	Pour 100 ml
Ethanol absolu	70 ml
Eau distillée	30 ml

Annexe 2

Solutions stock pour les gels

Tampon de migration 5X TBE

5X TBE	Pour 1 L
Acide borique	27,5 g
Tris base	54g
0,5 M EDTA (pH=8)	20 ml
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 1 L

Ajuster le pH à 8 avec l'acide borique

Gel d'agarose

Solution d'agarose	Gel 3%
Agarose poudre	2,7 g
5X TBE	27 ml
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 270 ml

Solution d'acrylamide

Solution d'acrylamide	Pour 250 ml
Acrylamide poudre	96,65 g
Bis acrylamide	3,35 g
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 250 ml

Gel d'acrylamide 40%

Gel d'acrylamide 40%	Gel 40%
5X TBE	15 ml
Solution d'acrylamide	22,3 ml
Eau distillée	Ajuster jusqu'à 150 ml
TEMED	110 μ l
APS	450 μ l

Annexe 3

Solution 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 μ L
Eau distillée	1 L

Annexe 4

Produits nécessaires pour PCR

Préparation de l'amorce 10 pmol/ μ L :

Amorce F/R	Pour 100 μ l
100 μ M Amorce (Bioline)	10 μ L
Eau pure	90 μ L

Master Sciences et Techniques
Gestion et Conservation de la Biodiversité
Résumé

Nom et prénom : ERRAJI Bahija

Année Universitaire : 2021-2022

Titre : Caractérisation moléculaire de *Thymus Satureioides* par les marqueurs ISSR.

La filière nationale des plantes aromatiques et médicinales a beaucoup souffert de dysfonctionnement qui entrave son développement. Il revient ainsi aux professionnels de fédérer leurs forces pour le structurer et l'optimiser. Cependant, sa multiplication par bouturage engendre des problèmes de confusion variétale et intra variétale. Plusieurs études de caractérisation, d'identification variétale et de conservation des ressources phyto-génétiques du *Thymus satureioides* ont été effectuées au Maroc. Dans cette optique, la présente étude consiste en l'identification moléculaire de 60 génotypes locaux de *Thymus satureioides* récupérés de l'essai installé dans la commune Houderrane, province de Khmésat.

La diversité génétique des accessions, analysée à l'aide de quatre amorces ISSR, a généré des profils polymorphes avec un pourcentage de polymorphisme variable et significatif (100%). En effet, les résultats engendrés par l'indice de diversité de Shannon (I) et le calcul des distances de similarité, ont montré une large diversité moléculaire des différentes accessions étudiées. La similarité minimale est de 19% et la similarité maximale est de 81%. Le dendrogramme phylogénétique a révélé 6 groupes principaux dont 2 regroupent des accessions qui appartiennent à quatre régions.

Mots clés : *Thymus*.
Polymorphisme.

✉ B.P. 2202, Route d'Imouzzer FES

re, ISSR,

☎ +212(0)535608014 /+ 212(0)535609635/+212(0)535602953
- 📠 212(0)535608214