

## *Projet de Fin d'Etudes*

### Licence Sciences & Techniques

### Biotechnologie et Valorisation des Phyto-Ressources

## **Initiation à la caractérisation Moléculaire chez le prunier (*Prunus domestica* L.)**

**Présenter par : OUAYAT Fatiha**

### Encadré par :

- Pr. BOUCHAMA El-Ouazna (FST-Fès)
- Pr. CHARAFI Jamal (INRA-Meknès)

### Soutenu le : 07/07/2021

Devant le jury composé de :

- Pr. HAGGOURD Abdellatif (FST-Fès)
- Pr. CHARAFI Jamal (INRA-Meknès)
- Pr. BOUCHAMA El-Ouazna (FST-Fès)

**Année universitaire : 2020/2021**

## **DEDICACES**

*Je dédie ce travail*

À

*Ma très chère honorable mère, qui représente pour moi  
le symbole de la bonté par excellence, je te dédie ce travail en  
témoignage de mon profond amour, puisse Dieu le tout puissant,  
te préserver et t'accorder santé.*

À

*Mon très cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,  
l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.*

*Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit*

*Pour mon éducation et mon bien être.*

*Je souhaite de tout mon cœur que Dieu les garde près de moi.*

À

*Mes frères et sœurs, je leur souhaite tout le succès... Tout le bonheur.*

À

*Mes amis, pour une sincérité si merveilleuse, en leur souhaitant tout le succès... Tout le  
bonheur.*

*Aimablement*

**OUAYAT Fatiha**

## REMERCIEMENT

La réalisation de ce projet a été possible grâce à ALLAH tout puissant, de m'avoir guidé toutes les années d'études et m'avoir donnée la volonté, la patience et le courage pour bien mener ce travail.

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements accompagné de mon profond respect à mon encadrant Dr. Jamal CHARAFI chercheur à l'Unité de Recherche Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto-Génétiques au Centre Régionale de la Recherche Agronomique de Meknès pour le temps qui m'a consacré, pour m'avoir dirigé et encouragé tout au long de ce travail.

Mes remerciements au Pr. El-Ouazna BOUCHAMMA mon encadrante au sein de la Faculté des Sciences et Techniques à Fès, de m'avoir soutenu par son aide, ses orientations et sa disponibilité ainsi que ses encouragements. Merci pour l'encadrement.

Je voudrai remercier également P. Abdellatif HAGGOURD , qui m'a honorée en acceptant de juger ce modeste travail .

Je souhaite remercier mes collègues à INRA Meknès : C. ELBOUKHRISSI, A. HAMDANI, S. CHAKIB et A. ADIBA, pour leur aide, leur soutien ainsi que leur support moral pendant notre travail au laboratoire.

Mes remerciements les plus sincères et les plus chaleureux vont à ma famille et mes amis et amies qui m'ont encouragé.

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

*Merci !!*

## LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Arbre du prunier ( Prunus domestica .L).</i> .....	4
<i>Figure 2 : Fleurs du Prunier (N° 126 Mars 2005)</i> .....	6
<i>Figure 3 : Photo présentant une partie de la collection du prunier étudiée.</i> .....	7
<i>Figure 4 : 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.</i> .....	10
<i>Figure 5: Broyeur à billes (Retech MM400)</i> .....	14
<i>Figure 6: Centrifugeuse ouverte remplie par les tubes (A) et son écran de paramétrage(B).</i> ....	14
<i>Figure 7:Spectrophotomètre utilisé pour la quantification d'ADN</i> .....	15
<i>Figure 8: Thermocycleur pour la PCR</i> .....	16
<i>Figure 9 : Dépôt de l'ADN Liste des figures mélangé au bleu d'agarose dans les puits du gel d'agarose.</i> .....	18
<i>Figure 10 : Système d'imagerie pour la lecture du gel d'agarose</i> .....	18
<i>Figure 11 : Profil génomique ISSR du polymorphisme des 29 géotypes étudiés généré par l'amorce UBC-818</i> .....	20
<i>Figure 12: Distribution des fréquences de similitude génétique, fournies par les ISSR, pour toutes les combinaisons paires entre les 29 géotypes du prunier .</i> .....	23
<i>Figure 13 : Dendrogramme des géotypes étudiés du prunier engendré par les ISSR à l'aide de calcul des distances et la méthode UPGMA.),</i> .....	24

## LISTE DES TABLEAUX

<i>TABLEAU 1 : LISTE DES 20 AMORCES ISSR UTILISEES, LEUR SEQUENCE, TEMPERATURE D'HYBRIDATION (TH), TAILLE DES BANDES, NOMBRE DE MARQUEURS POLYMORPHES (P) ET MONOMORPHES (M), POURCENTAGE DU POLYMORPHISME LIE A LA DIVERSITE (PIC)</i> .....	21
---	----

## SOMMAIRE

Dédicaces .....	i
Remerciement .....	ii
Liste des figures .....	iii
Liste des tableaux.....	iii
Introduction générale.....	1
<b>PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>3</b>
I. Généralité sur le Prunier ( <i>Prunus domestica</i> ) .....	4
1. Classification botanique .....	4
2. Origine et répartition géographique.....	5
3. Biologie de Prunier .....	5
A. Arbre .....	5
B. Rameau .....	5
C. Fleur .....	6
D. Feuille.....	6
E. Racine.....	7
F. Fruit .....	7
II. Phénologie de Prunier .....	7
III. Variétés et Port- greffes .....	8
1. Port- greffes .....	8
IV. Exigences pedo- climatiques de prunier. ....	9
V. Situation du prunier au Maroc.....	9
VI. Techniques de marquage moléculaire .....	9
1. Généralité.....	9
2. Inter simples séquence repeat (ISSR) .....	10
<b>PARTIE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>12</b>
I. Matériel végétal.....	13
II. EXTRACTION D'ADN .....	13
1. Protocole d'extraction d'ADN .....	13
2. Quantification d'ADN par spectrophotométrie .....	15
3. Dilution des échantillons.....	15
4. Condition d'application de la PCR.....	16

5. Electrophorèse sur gel d'agarose .....	17
<b>PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION</b> .....	19
I. Extraction d'adn.....	19
II. Caractérisation moléculaire de 29 échantillons par les marqueurs ISSR.....	19
1. Sélection d'amorces ISSR.....	19
2. Caractérisation des génotypes.....	21
A. Calcule et analyse des données fournies par les ISSR .....	21
B. Relation génétique entre les génotypes .....	23
<b>Conclusion generale</b> .....	25
<b>Présentation de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique</b> .....	26
<b>REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	28

## INTRODUCTION GENERALE

L'arboriculture fruitière concerne au Maroc une large gamme d'espèces arboricoles dont les plus importantes restent l'amandier, le pommier, l'abricotier, le prunier et le pêcher qui occupent, à elles seules, plus de 95% de la superficie nationale (*MAPMDREF, 2011*).

Le présent travail porte sur l'une de ces espèces fruitières en l'occurrence le prunier. Cette espèce qui a connu un développement rapide durant ces dernières années pour passer de 8951 ha en 2010 à 15 790 ha en 2019 (*FAO, 2019*).

Comme pour toutes les espèces arboricoles, et pour accompagner l'effort de la mise en place des stratégies agricole nationales, l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) à installer une collection des principales variétés du prunier qui entre dans son programme de conservation des ressources génétiques de l'espèce et constitue une base pour la sélection et les programmes d'amélioration génétique. La caractérisation des ressources génétiques est une étape indispensable pour une meilleure gestion de la conservation ex-situ et pour l'accompagnement des programmes de sélection et d'amélioration génétique.

En outre, la filière arboricole tient une place importante dans la consommation nationale, par la satisfaction des besoins nutritionnels de la population et ce grâce à la production d'une gamme diversifiée de fruits frais et transformés évitant, par conséquent, à notre pays le recours aux importations.

Par ailleurs, ce secteur assure le maintien en activité d'un important outil de conservation, de conditionnement et de transformation et joue un rôle précurseur vis-à-vis des autres secteurs agricoles, en matière d'adoption des innovations technologiques.

La caractérisation des ressources génétiques est une étape indispensable pour une meilleure gestion de la conservation ex-situ et pour l'accompagnement des programmes de sélection et d'amélioration génétique.

Divers marqueurs moléculaires sont actuellement utilisés pour mieux évaluer la diversité génétique chez les plantes. Ces marqueurs peuvent être utilisés seuls ou en complément aux traditionnels marqueurs agro-morphologiques connus pour être trop sensibles aux facteurs environnementaux.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail qui consiste à l'évaluation des ressources génétiques en collection du prunier à l'aide des marqueurs moléculaire de type ISSR.



## **PARTIE I: REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## I. GENERALITE SUR LE PRUNIER (*PRUNUS DOMESTICA*)

Le prunier est un arbre rustique atteignant généralement les 8 m de hauteur, son port étalé est spacieux lui donne une allure vigoureuse et bien portante. C'est un arbre à origine fort obscure (*Lespinase et al.2005*).



*Figure 1 :Arbre du prunier ( Prunus domestica L.)*

### 1. CLASSIFICATION BOTANIQUE

Les pruniers font partie de la famille des rosacées, et appartient au genre *Prunus* qui regroupe 400 espèces et des milliers de variétés cultivées. (*Cronquistetal.1981*).

#### Systematique du prunier

Embranchement	Spermaphytes
Sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédone
Ordre	Rosales
Famille	Rosacées
Sous Famille	Paranoïdes
Genre	<i>Prunus</i>
Espèce	<i>Prunusdomestica</i>

## **2. ORIGINE ET RÉPARTITION GÉOGRAPHIQUE**

Par estimation, les pruniers sont d'origine du sud Caucase, du nord de l'Iran et des Balkans, ils étaient cultivés en Syrie à Damas dès la Haute antiquité, Puis furent diffusés sur toute la rive Nord de la Mer Med. A l'époque romaine ; il existait en Italie de nombreux types de prunier à fruits diversement colorés, dont la Damascène est la plus ancienne. Les fruits étaient appréciés à cette époque pour leur valeur diététique et thérapeutique (*Gautier 1993*). D'après ( *Gautier 1993*), la culture du prunier est à la fois dispersée et relativement concentrer en Amérique(Californie), Argentine, en Asie et en Europe (France, Italie, Espagne).

## **3. BIOLOGIE DE PRUNIER**

### **A. ARBRE**

Le prunier est un arbre fruitier caractérisé par un tronc arrondi (*Guiheneuf, 1993*) et des rameaux avec un aspect tortueux et très déployés. Son écorce et de couleur gris brun et présente une brillance. Les pruniers se diffèrent en hauteur selon les espèces et les variétés.

### **B. RAMEAU**

Le développement des rameaux est annuels, ils commencent avec une couleur verte et deviennent marron et plus aoutés avec l'âge (*Bretaudefaure, 1991*). Leur dimension est en fonction du porte-greffe et la richesse du sol. Alors que la longueur des entre nœuds diffèrent selon les variétés (*Hilaire, 2002*).

En distingue deux phases de croissance des rameaux d'un même arbre : une première qui est accélérée et une deuxième qui est ralentie (*Laye, Bassi, 2008*).

Gautier (1988) a rapporté que chez le prunier domestique, la croissance de la pousse est sympodiale. Cette croissance est active en Mai et Juin. Vers la fin juin début juillet la plupart des rameaux cessent de croître, le bourgeon terminal tombe par abscission au-dessus du dernier œil. Le phénomène débute sur les rameaux les plus faibles ou les rameaux retombants. Sur les arbres, les rameaux les plus vigoureux continuent leur croissance plus longtemps

jusqu'à la 2eme quinzaine de juillet, puis intervient la chute des bourgeons terminaux. L'allongement du rameau s'opère alors par le développement d'un bourgeon latéral.

### C. FLEUR

La fleur du prunier est hermaphrodite composée d'un calice mono-cépitale à cinq divisions, d'une corolle à cinq pétales, 20 à 30 étamines qui portent les anthères productrices de pollen, et un pistil plus long que les étamines avec un ovaire, le nombre de fleurs par arbre est estimé d'environ 3000 (**Benttayeb , 1993**). D'après Boulât (**Boulay , 1966**) ; le prunier possède des bourgeons floraux ou boutons à fleurs solitaires. Les bourgeons floraux contiennent des ébauches de fleurs (comprenant 1 à 3 fleurs).

Le prunier est très exigeant pour la pollinisation croisée et la fécondation. On distingue des variétés auto-fertiles (Prune d'Ente, Stanley, Victoria...) partiellement auto-fertiles (AngelinoBurdett, le groupe des Mirabelles, ...) et les variétés auto stériles (**Bretaudeau , Faure , 1991**). Pour les variétés auto fertiles (ou partiellement auto fertiles) la présence d'un pollinisateur compatible est un facteur de régulation de la production (**Blanchet , 1994**). Ce dernier a rapporté que, malgré la forte attractivité pour les abeilles des fleurs de prunier domestique, une densité élevée de pollinisateur est nécessaire (10 à 15% d'au moins deux variétés compatible et concordantes) avec une distance pollinisateur-variété de 10 m comme optimum, maximum 18 m (**Guiheneuf.1988**). Selon les régions, ces phénomènes d'auto-fertilité et d'autostérilité sont quelquefois modifiés par les conditions ambiantes (**Bretaudeau , Faure , 1991**).



*Figure 2 : Fleurs du Prunier*

### D. FEUILLE

Les feuilles du prunier sont alternes courtement pétiolées, ovale, dentées, acuminées, présence de quelques nectaires sur le pétiole et de deux stipules à sa base (**Breitaudeau , Faure , 1991**).

#### **E. RACINE**

Le système racinaire de l'arbre est souvent superficiel, parfois semi-pivotant, et présente une résistance à l'asphyxie racinaire bonne à moyenne (**Guyot , Gibassier ; 1966**).

#### **F. FRUIT**

Le fruit est une drupe charnue de forme variable, composée de l'extérieure vers l'intérieure d'un épiderme lisse, mince, toujours glabre, couverte de pruine(**Lespinasse , Leterme , 2005**)de couleur variable : jaune, jaune-vert, rougeâtre, bleu-violacé, puis un chair plus ou moins ferme, juteuse, acidulée ou sucrée et finalement un noyau qui présente une grosseur variable selon les variétés, il renferme une amande à saveur amère en raison de la présence d'acide cyanhydrique (acide prussique).



*Figure 3 :Photo présentant une partie de la collection du prunier étudiée. (Source : Photographie personnelle, 2021)*

## **II. PHÉNOLOGIE DE PRUNIER**

Le prunier est un arbre fruitier caractérisé par un tronc arrondi ou plus au moins étalé selon les variétés (**Guiheneuf, 1998**). Le système racinaire de l'arbre est souvent superficiel,

traçant, parfois semi-pivotant, sa résistance à l'asphyxie radicaire est bonne à moyenne (Guyot et Gibassier, 1966).

D'après (Boulay 1966), Le prunier possède des bourgeons floraux ou des boutons à fleurs solitaires, géminés ou fasciculés comme pour le pêcher. Les bourgeons floraux contiennent des ébauches de fleurs (comprenant 1 à 3 fleurs). Selon le même auteur les feuilles du prunier sont alternes, courtement pétiolées et dentées. La fleur du prunier est de type V (5 pétales et 5 sépales) (Caillavet, 1991).

Selon (Breteau, 1991) ; chaque fleur est composée d'un calice mono-cépitale à cinq divisions, une corolle à cinq pétales, 20 à 30 étamines et un pistil plus long que les étamines. Le nombre de fleurs par arbre est d'environ 3000 (Bentayeb, 1993).

La prune qui se caractérise par un effet laxatif, est connue d'après (Deveaux, 1999) ; depuis des siècles. C'est une drupe dont le péricarpe charnu est comestible, sa forme est globuleuse ou allongée.

La peau des prunes est fine et glabre, couverte de pruine (Lespinasse et Leterme, 2005). Le noyau est de grosseur variable selon les variétés, il renferme une amande à saveur amère en raison de la présence d'acide cyanhydrique (acide prussique). Il est libre ou semis libre cas de Reine Claude, Mirabelle, ou adhérent cas de prune japonaise (Breteau et Faure, 1991).

### III. VARIÉTÉS ET PORT- GREFFES

#### 1. PORT- GREFFES

Chez les arbres fruitiers, le porte-greffe assure par son système racinaire les fonctions d'ancrage, de stockage, de réserve et d'absorption hydrominérale. Il s'agit en interaction avec la partie aérienne, en lui permettant de s'adapter à certaines conditions pédo-climatiques de culture. De ce fait, le succès d'une plantation dépend largement d'un choix judicieux de l'association « variété /porte-greffe » (Anonyme, 2010).

Selon, (Gautier, 2001) les pruniers végétant sur leurs propres racines, présentent une croissance lente les premières années. Les porte-greffes les plus utilisés pour cette espèce sont : Myrobolan B, Mariana GF8-1, toutefois beaucoup d'espèces de *Prunus* peuvent être employées comme porte greffes du prunier.

#### **IV. EXIGENCES PEDO- CLIMATIQUES DE PRUNIER.**

Les exigences climatiques différentes selon les groupes variétaux. Ainsi, selon **(Gautier, 1988)** ; les pruniers européens préfèrent les climats continentaux aux hivers rigoureux. Par contre, les pruniers japonais se développent bien dans la zone méditerranéenne.

Le prunier entre en végétation à la température moyenne de 10°C, une température de -4 °C détruit le bouton floral, -2 °C détruit les fleurs, et de -1 °C endommage les jeunes fruits **(Guibrat, et clavet, 1979)**. Le prunier a besoin d'accumuler un certain nombre d'heure de froid de 800 à 1100 heures inférieure à 7.2 °C selon les variétés.

Une humidité élevée de l'air constitue une contrainte notable pour les arbres fruitiers, elle nuit à la pollinisation, en agglutinant les grains de pollen et en favorisant l'installation de la fumagine **(Benttayeb , 1993)**.

D'après, **(Guiheneuf,1988)** ; le prunier se rencontre sur un sol profond, frais, de silico-argileux à argileux et même calcaire sans irrigation.

#### **V. SITUATION DU PRUNIER AU MAROC**

Au Maroc, le prunier est l'une des principales espèces qui a connu un développement rapide, avec une superficie récoltée de 15 790 ha et une production annuelle estimée à 151 488 T/an (FAO, 2019). La majorité des variétés cultivées au Maroc sont de type Japonais (Golden Japan, Formosa, Santa rosa, Mathley, Red Beauty), ce sont des variétés aqueuses et supportent mal les manipulations et le transport. La variété Stanley cultivée notamment au niveau de la région de Khémisat et Meknès, constitue la base des plantations au Maroc (Oukabli et Mamouni, 2005).

#### **VI. TECHNIQUES DE MARQUAGE MOLÉCULAIRE**

##### **1. GÉNÉRALITÉ**

Les marqueurs moléculaires ont de nombreuses applications en génétique des plantes. Ils permettent d'observer, de façon plus ou moins fine, le polymorphisme de séquences de l'ADN d'un certain nombre de sites ou de locus répartis sur le génome. Plus précisément, les marqueurs moléculaires révèlent directement le polymorphisme de l'ADN, les séquences ciblées correspondant ou non à des séquences codantes. Les bons marqueurs moléculaires doivent réunir les caractéristiques idéales suivantes : être des caractères mendéliens à hérédité

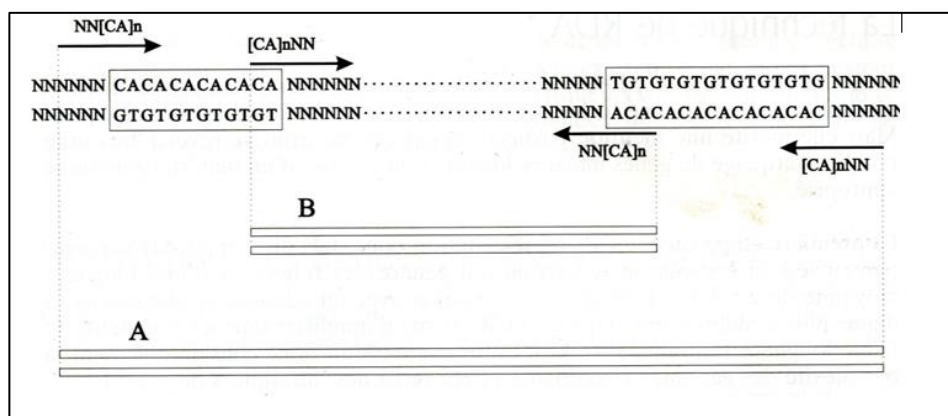


simple; avoir plusieurs allèles ; être codominants; ne pas avoir d'effet paléotrope ni épistatique ; être dispersés le long du génome; ne pas être liés entre eux ; être insensibles au milieu ; être stables à tous les stades du développement; ne pas avoir d'effet sur la croissance ou la reproduction sexuée ; être sélectivement neutres ; être facilement observables et sans ambiguïté (**Devienne, 1998**).

Il existe plus d'une dizaine de techniques de marquage génétique. Six techniques, largement répandues ou prometteuses sont abordées les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), les AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), les ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), les microsatellites et les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (**Devienne, 1998**).

## 2. INTER SIMPLES SEQUENCE REPEAT (ISSR)

Une exploitation plus récente des microsatellites consiste à les révéler en masse, en s'inspirant du principe de la technique R.A.P.D. On utilise pour cela une amorce constituée pour partie d'une séquence de microsatellite, et pour partie de base arbitraire. Deux types d'amorces sont concevables, selon les positions relatives de ces deux parties. La P.C.R. va amplifier en même temps de nombreux fragments flanqués de microsatellites, donc très polymorphes (**Devienne, 1997**). Le polymorphisme dépend ici du nombre d'unités de répétitions. La quantité de marqueurs polymorphes peut être élevée. La technique est simple et de faible coût. Enfin, l'avantage de cette technique est qu'elle ne nécessite pas de connaissances particulières des séquences d'ADN. (**Tagu, 1997**).



**Figure 4 :** 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.

Les marqueurs ISSR ont été très utilisés pour l'analyse du polymorphisme génétique au niveau inter et intra spécifique chez plusieurs espèces, à savoir le cas du riz (**Joshi et al.**



2000), le maïs (**Kantety et al., 1995**), la pomme de terre (**Huang et Sun, 2000**) et le lupin (**Talhinhas et al. 2003**). Les ISSR ont constitué des marqueurs de choix pour les avantages qu'ils présentent (**Zietkiewicz et al., 1994**). Ces marqueurs ISSR ont permis de révéler un niveau élevé de polymorphisme.

## **PARTIE II : MATERIEL ET METHODES**

## **I. MATERIEL VEGETAL**

Cette étude a été réalisée sur 29 géotypes de prunier, installés en collection au domaine expérimental à Ain Taoujdate – Meknès. Les cultivars ont été plantés en 1996 à un écartement de 5m x 3m, à raison de 9 arbres/cultivar. Le verger est conduit en irrigué au goutte à goutte, de mai à mi-octobre. Les arbres sont conduits en forme libre (goblet) avec élimination des rejets. Tous les cultivars étaient dans les mêmes conditions géographiques et subissant les mêmes pratiques horticoles de conduite. Le matériel végétal est composé de jeunes feuilles qui ont été prélevées au début de l'apparition de feuillage sur les arbres (mi-mars), puis congelées à -20°C. Elles sont ensuite lyophilisées dans un lyophilisateur type WPA Biowave S2100 pour servir à l'extraction de l'ADN.

## **II. EXTRACTION D'ADN**

L'extraction de l'ADN nécessite trois étapes primordiales, dont :

- ❖ Une action physique : qui consiste à détruire les structures cellulaires (particulièrement la paroi cellulaire) par broyage mécanique ;
- ❖ Une action chimique (lyse chimique) tendant à solubiliser les composantes biochimiques du tissu et détruire les parois cellulaires.
- ❖ Une purification (isolation) de l'ADN des autres molécules biologiques présents dans les cellules comme les protéines, les polysaccharides et les composés phénoliques (Séparation par affinité aux phases), précipitation de l'ADN par l'alcool (isopropanol) et lavage de l'ADN par l'alcool (éthanol 70%).

### **1. PROTOCOLE D'EXTRACTION D'ADN**

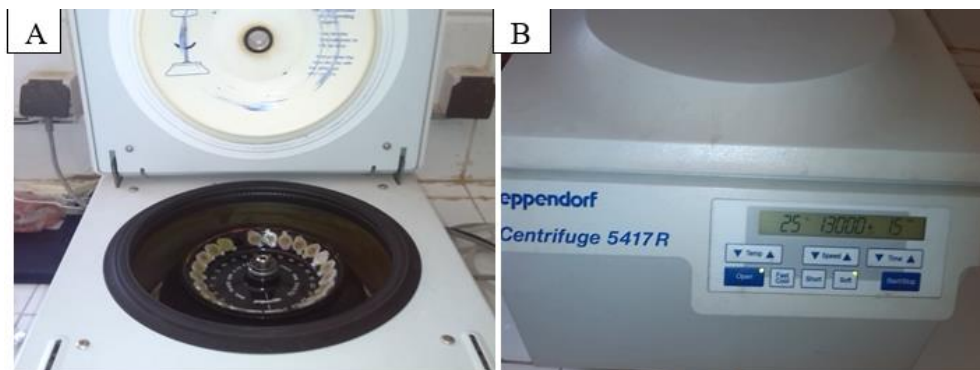
Une quantité de 40 mg des feuilles lyophilisées a été broyée mécaniquement à l'aide d'un broyeur à billes de type (Broyeur : Retech MM400), cette action physique consiste à détruire les structures cellulaires (particulièrement la paroi cellulaire).



**Figure 5:** Broyeur à billes (Retech MM400). (Source : Photographie personnelle, 2021)

La poudre obtenue a été mise dans un tube Eppendorf de 2ml à laquelle on a ajouté 1250  $\mu$ l de tampon d'extraction CTAB (Tris (1M), EDTA (0,5M), NaCl, Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromide, PVP 40000 (Poly-VinylPirrolidone, Sodium di-sulfite, Beta-mercaptoethanol et H<sub>2</sub>O) déjà préparé ; Le CTAB est considéré comme un détergent cationique qui fragilise le lien entre l'ADN et les protéines ; ainsi, il détruit les structures lipidiques membranaires et fixe les polysaccharides et les polyphénols. En suite les tubes ont été mis dans un bain Marie réglé à 65 °C pendant 30 min à 1 heure en mixant avec le vortex toute les 15 min ; en suite 500  $\mu$ l de du chloroforme/iso-amylque (24/1) (Solution toxique) est ajouté et l'ensemble est agité manuellement à température ambiante pendant 15 à 20 min.

La solution est centrifugée à 13 000 tours par minute (TPM) à 25°C pendant 15 min à l'aide d'une centrifugeuse de type (Centrifugeuse Eppendorf, 4517R). La phase aqueuse (supérieure) est transférée dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5ml, et la phase organique est éliminée. En suite, 500  $\mu$ l du chloroforme/iso-amylque (24/1) est additionné, puis agiter le tous manuellement 3 min puis centrifuger à 13000 TPM à 25 °C pendant (10min) ;



**Figure 6:** Centrifugeuse ouverte remplie par les tubes (A) et son écran de paramétrage(B).

Ensuite, prendre le surnageant est ajouté 1ml d'isopropanol ; laisser les tubes 30min à 4°C (ou dans la glace), l'ADN est précipité avec 1 ml d'isopropanol, et l'ensemble est centrifugé 15 min à 13 000 TPM à 4 °C.

La phase liquide est soigneusement retirée. Le culot d'ADN récupéré est fixé au fond des tubes est rincé avec 500 µl d'éthanol 70 %. Ce dernier est soigneusement retiré, et le culot est laissé sécher à l'air libre pendant 15 min environ.

En fin, 100 µl de la solution Tris-EDTA (0,5X) ajouter à l'ADN récupérée pour être conservé dans un congélateur à -20°C.

## 2. QUANTIFICATION D'ADN PAR SPECTROPHOTOMETRIE

L'objectif est la mesure de la concentration d'ADN des 28 échantillons du prunier, qui passent par la 1<sup>ère</sup> étape de la dilution des échantillons avec un facteur de dilution équivalent à 1/50 à partir de l'ADN concentré.

Puis nous procédons à l'étalonnage du spectrophotomètre de type (WPA, Biowave, S2100, Diode Arrayspectrophotometer), qui donne des valeurs numériques de la densité d'ADN.



**Figure 7:** Spectrophotomètre utilisé pour la quantification d'ADN. (Source : Photographie personnelle, 2021)

## 3. DILUTION DES ECHANTILLONS

L'objectif est d'avoir une concentration finale pour chaque échantillon de 15 ng/µl d'ADN. Pour tous les échantillons, on considère la concentration finale ( $C_F$ ) à atteindre, à partir

de la concentration initiale mesurée par le spectrophotomètre ( $C_I$ ) et le volume final ( $V_F$ ). Donc on calcule le volume initial ( $V_I$ ) à prendre de chaque échantillon comme suis :

$$V_I = (C_F * V_F) / C_I$$

#### 4. CONDITION D'APPLICATION DE LA PCR

La PCR permet d'amplifier des séquences cibles (des microsatellites et d'I.S.S.R), 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 (cas des microsatellites).



*Figure 8: Thermocycleur pour la PCR (Source : Photographie personnelle, 2021)*

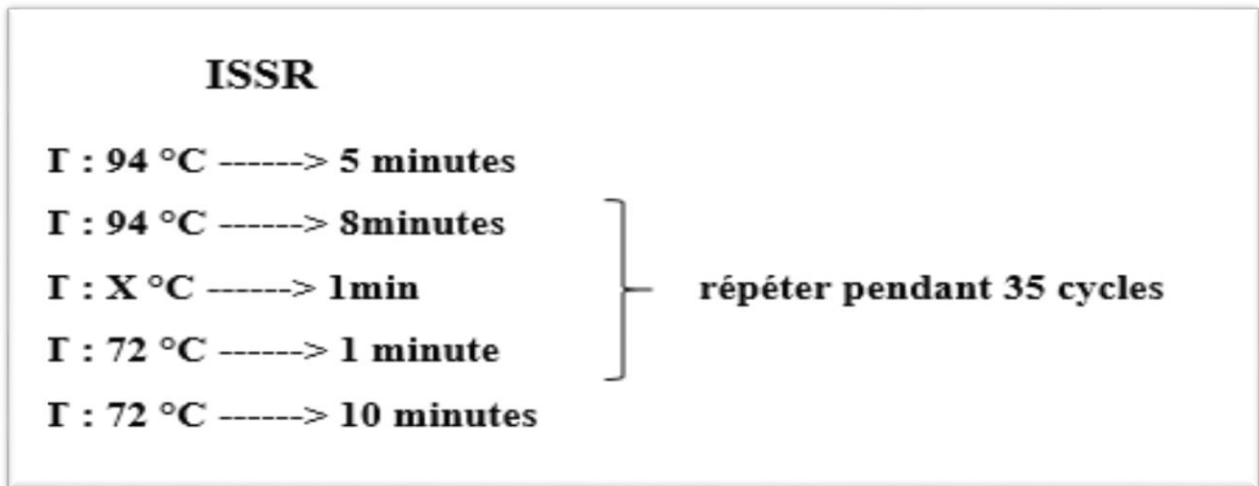
##### ➤ *Mélange réactionnel de PCR*

- ✓ 1520,2  $\mu$ L L'eau distillée stérile
- ✓ 85  $\mu$ L Solution Tampon (5X)
- ✓ 68  $\mu$ L dNTPs (2mM)
- ✓ 85  $\mu$ L Amorces (10  $\mu$ M)
- ✓ 6,8  $\mu$ L Taq polymérase (5U)

➤ **Les étapes de PCR**

- Dénaturation
- Hybridation
- Elongation

➤ **Les condition de PCR**



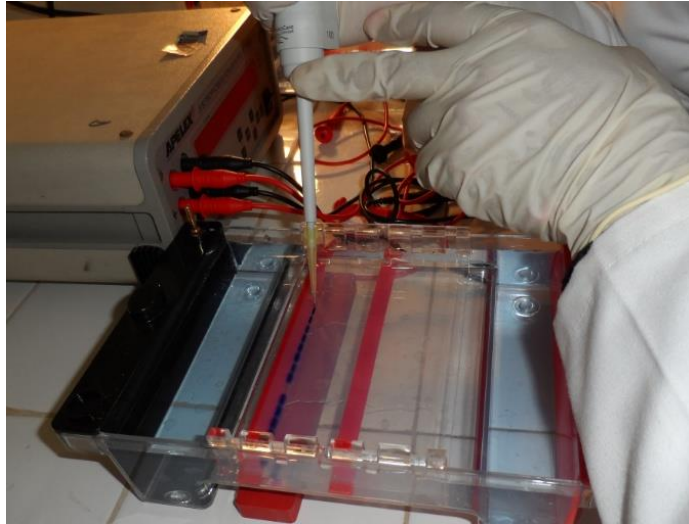
La PCR consiste à une étape de dénaturation initiale de l'ADN et l'activation de la taq polymérase à 94°C pendant 5 min suivie d'une amplification de 35cycles.

Chaque cycle comprend une dénaturation à 94°C pendant 1min ,une hybridation à la température adéquate pour l'amorce utilisé pendant une minute ,après les 35cycles , une élongation finale à 72°C à été appliqué durant 10 minutes .

## **5. ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE**

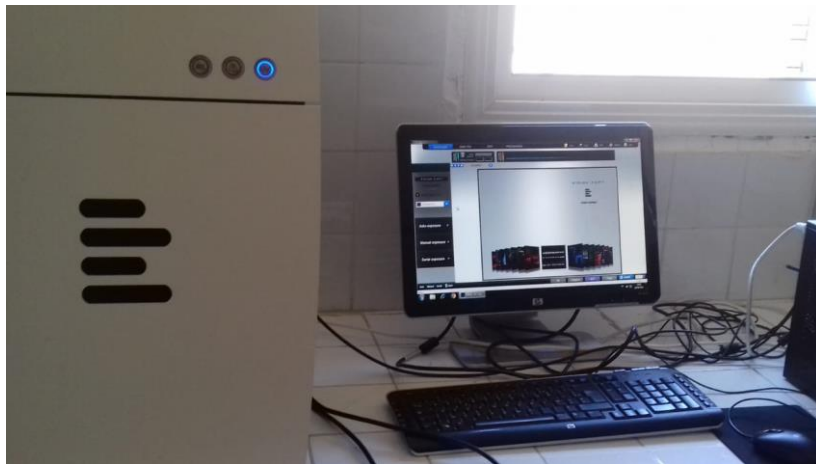
L'électrophorèse a été effectuée sur des gels d'agarose de 2%. La préparation du gel se fait par dissoudre de 2 g d'agarose dans 100 ml de tampon TBE 1x à pH 8 (89mM de Tris, 2mM de l'EDTA, 89mM d'acide borique et quantité suffisante d'eau ultra pure pour un volume de 100 ml). La migration s'effectue aussi dans un tampon de TBE 1x sous un courant électrique en respectant la polarisation du pole négatif vers le positif.

Après l'ajout de bleu d'agarose, les produits PCR sont ensuite déposés dans les puits du gel, en laissant un puit pour le marqueur de taille qui sera déposé à la fin.



**Figure 9 :** Dépôt de l'ADN mélangé au bleu d'agarose dans les puits du gel d'agarose. (Source : Photographie personnelle, 2021)

L'électrophorèse a été effectuée sous 150 V jusqu'à ce que le colorant a migré plus que 2/3 de la distance dans le gel. Ensuite on procède à la coloration au bromure d'éthidium sous agitation pendant une heure. L'ADN peut être visualisé en utilisant un trans-illuminateur UV lié à un système d'imagerie.



**Figure 10 :** Système d'imagerie pour la lecture du gel d'agarose. (Source : Photographie personnelle, 2021)



## **PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

### **I. EXTRACTION D'ADN**

Une meilleure technique d'extraction d'ADN a pour objectif l'obtention d'une sufsinate de l'ADN en assurant une pureté et une bonne qualité

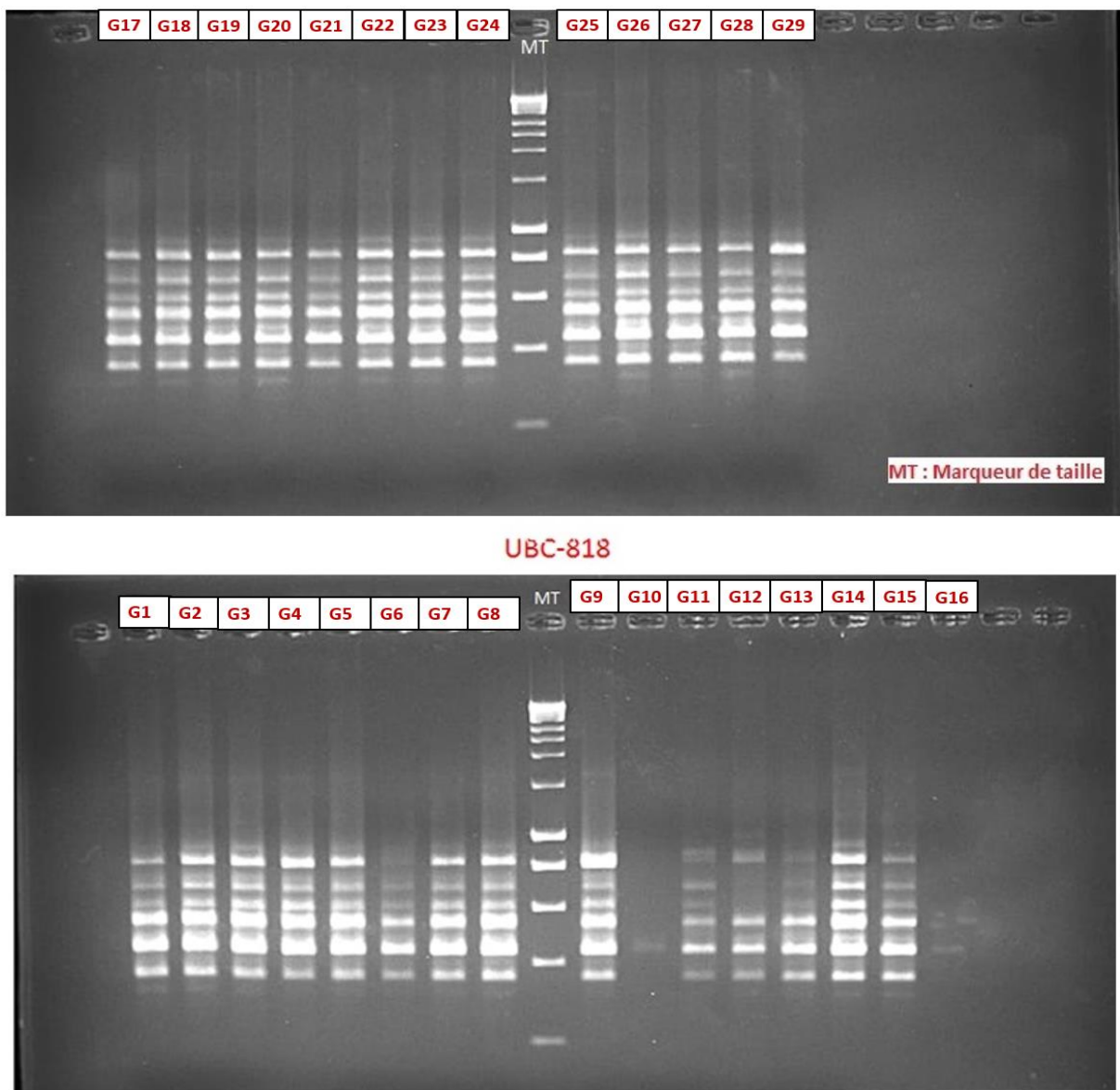
La quantité et la qualité de l'ADN extraite joue un rôle important dans la réussite de son amplification par PCR. Le rapport 'A260/A280 nm', mesuré par spectroscopie, d'une valeur comprise entre 2 et 1,8 indique que l'extraction est de bonne qualité alors que s'il est inférieur, on peut envisager une contamination par des protéines. Une valeur supérieure à 2 indique, en général, une présence importante d'ARN.

Les résultats du dosage d'ADN des 29 génotypes, donnent un rapport qui varie entre 1,803 pour la variété G20 et 2,020 pour la variété G29. L'ADN des génotypes est généralement de bonne qualité. Cependant, celui des génotypes G8 et G29, décèle la présence des ARN.

### **II. CARACTERISATION MOLECULAIRE DE 29 ECHANTILLONS PAR LES MARQUEURS ISSR**

#### **1. SELECTION D'AMORCES ISSR**

Après avoir testé un total de 44 amorces ISSR par un test gradient de la température d'hybridation et la révélation sur gel d'agarose (2%), 20 amorces (46 %) ont généré des profils bien lisibles et reproductibles (voir exemple de gel Figure 10). Selon plusieurs auteurs (**Machkour-M'rabet et al. 2009; Wolfe, 2000; Oh et al., 2000**), la technique ISSR est dotée d'une meilleure qualité de ses profils qui émane surtout de la longueur de séquence de ses amorces, procurant des bandes épaisses et reproductibles. Dans des travaux similaires, seulement 11 amorces ISSR ont été utilisées pour caractériser des cultivars de prunier japonais (**Carrasco et al., 2012**).). Les température d'hybridation choisies varient de 40,1°C pour les amorces F11, F14 et UBC808-3 jusque au 50,7°C pour les amorces F2,F7,F8,F10,IMA9-Z ... (Tableau n° 2)



**Figure 11** : Profil génomique ISSR du polymorphisme des 29 génotypes étudiés généré par l'amorce UBC-818. (Source : Photographie personnelle, 2021)

## 2. CARACTERISATION DES GENOTYPES

Les tailles de bandes produites par les marqueurs ISSR ont été calculées à l'aide du logiciel Mesurim pro en se basant sur un algorithme produit par les bandes de marqueur de taille. L'interprétation des profils ISSR se fait phénotypiquement sur la base de la présence et de l'absence des différents fragments amplifiés pour chaque amorce chez tous les individus analysés. La valeur «1» indique la présence d'une bande à un niveau de migration donné (Poids moléculaire en Pb) alors que la valeur «0» signifie son absence dans un autre profil électrophorétique ; puisque les marqueurs sont dominants, chaque bande représente le phénotype d'un locus biallélique. Une fois la lecture est achevée, une matrice binaire constituée de 1 (présence) et 0 (absence) est créée où les lignes représentent les marqueurs dans une position déterminée et les colonnes représentent les génotypes étudiés. A partir de la matrice des données nous pouvons calculer et comparer différents paramètres permettant d'évaluer le polymorphisme entre les génotypes.

### A. CALCULE ET ANALYSE DES DONNEES FOURNIES PAR LES ISSR

*Tableau 1: Liste des 20 amorces ISSR utilisées, leur séquence, température d'hybridation (TH), taille des bandes, nombre de marqueurs polymorphes (P) et monomorphes (M), pourcentage du polymorphisme lié à la diversité (PIC).*

Amorces	Séquences	T.H (°C)	Taille des bandes	Nombre des bandes	P	M	P (%)	PIC
F2	[CA] 6GC	50.7	318 - 3071	8	7	1	87.5	0.323
F4	[AGC] 4CT	45.4	614 - 3353	11	11	0	100	0.343
F7	[AC] 8CT	50.7	159 - 2785	16	15	1	93.6	0.381
F8	[AG] 8CC	50.7	233 - 3489	15	15	0	100	0.451
F10	[CA] 8AG	50.7	202 - 3438	15	15	0	100	0.351
F11	[CA] 8AC	41.3	207 - 1832	11	9	2	81.8	0.297

F14	[GT] 8CT	41.3	283 - 1318	10	4	6	40	0.129
ISSR-1	[AG] 8CA	45.4	160 - 971	10	4	6	40	0.105
ISSF-1	[AG] 8TA	43.1	331 - 2784	8	7	1	87.5	0.359
IMA9-Z	[GA] 8CG	50.7	227 - 2771	22	22	0	100	0.421
IMA12-1	[CA] 8TC	50.7	206 - 1783	7	5	2	71.4	0.232
IMA834-Z	[AG] 8YT	50.7	188 - 1586	16	14	2	87.5	0.333
IMA934-1	[AG] 8YT	50.7	165 - 577	8	5	3	62.5	0.196
UBC808-2	[AG] 8C	43.1	217 - 808	9	9	0	100	0.322
UBC808-3	[AG] 8C	41.3	235 - 737	7	4	3	57.1	0.183
UBC808-4	[AG] 8C	50.7	150 - 705	12	11	1	91.7	0.292
UBC807	[AG] 8T	45.4	385 - 3289	12	12	0	100	0.370
UBC810	[GA] 8T	43.1	260 - 1834	13	13	0	100	0.319
UBC817	[CA] 8A	50.7	222 - 2279	15	15	0	100	0.383
UBC818	[CA] 8G	45.4	246 - 1006	11	5	6	45.5	0.208
			<b>Moyenne</b>	<b>11.8</b>	<b>10.1</b>	<b>1.7</b>	<b>82.3%</b>	<b>0.3</b>

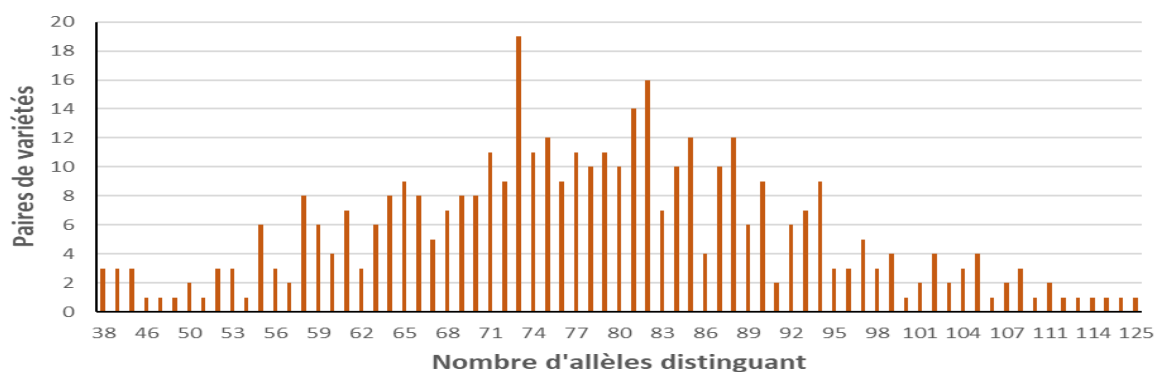
L'ensemble des amorces ont générées des bandes avec des tailles variables, avec un maximum de 3489 Pb par l'amorce F8 et un taille minimum de 150Pb par l'amorce UBC808-4. Le nombre total de bandes révélés par les 20 amorces est de 360 marqueurs avec un

maximum de 22 bandes chez l'amorce IMA9-Z minimum de 7 bandes pour l'amorce UBC808-3 et la moyenne est de 11,8 marqueurs par amorce. Toutes les amorces utilisées ont généré des profils polymorphes avec des pourcentages de polymorphismes variables et significatifs. Le taux de polymorphisme varie de 40% pour les amorces F4 et ISSR-1 jusqu'au 100% pour les amorces F4,F8 ;F10,IMA9-Z,UBC808-2,UBC807,UBC810,et UBC817,La moyenne est de 82,3% (Tableau 2).

Les valeurs du contenu d'information sur le polymorphisme (PIC) indiquent la capacité de distinguer entre les génotypes pour chaque amorce. Toutes les amorces utilisées ont généré des profils très polymorphes, avec un indice PIC variable entre 0.105 comme valeur minimale pour l'amorce ISSR-1 et 0,451 pour l'amorce F8 comme valeur maximale et une valeur moyenne de 0,3 (Tableau 2).

## B. RELATION GENETIQUE ENTRE LES GENOTYPES

Les relations génétiques entre les génotypes analysés ont été étudiées sur la base d'une matrice de similarité en utilisant le nombre de bandes polymorphes (Nei et Li, 1979). Les distances génétiques ont été calculées à l'aide de programme Clustering Calculator développé par Brzustowski (2002) par le biais de Simple Matching Coefficient. Ainsi, sur cette base, un histogramme de comparaison des individus deux-à-deux en fonction du nombre de marqueurs ISSR qui les distinguent a été établi.



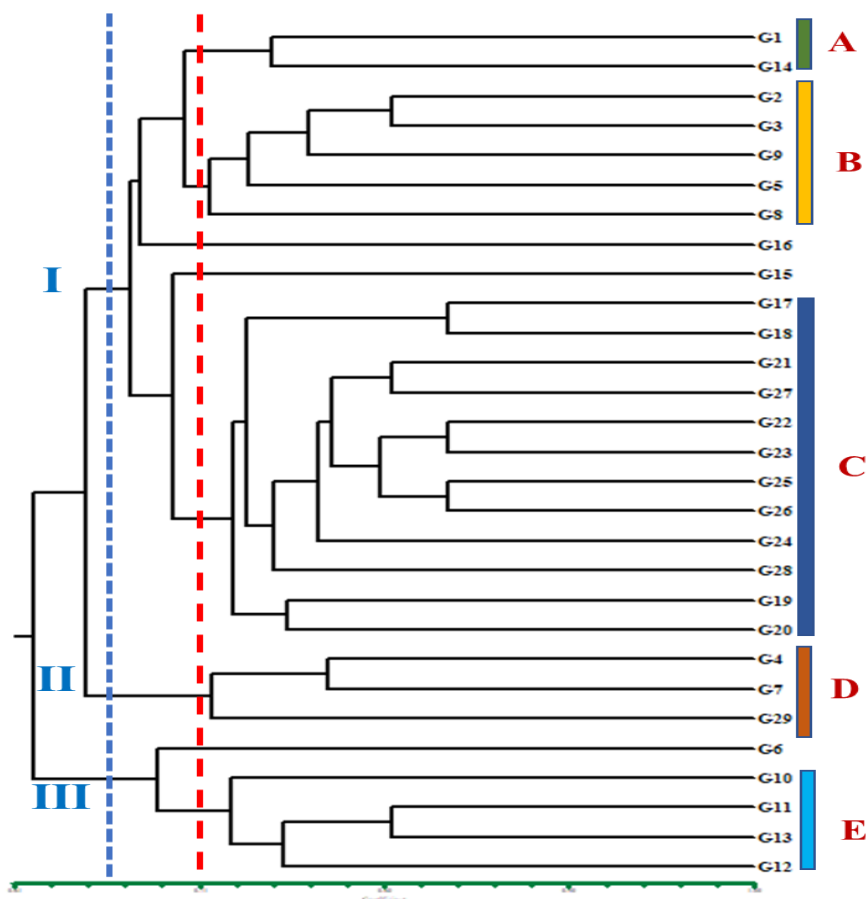
**Figure 12:** Distribution des fréquences de similitude génétique, fournies par les ISSR, pour toutes les combinaisons paires entre les 29 génotypes du prunier.

Cette figure présente le nombre d'allèles qui distingue les 29 génotypes deux à deux en effet en comparant tous les génotypes deux-à-deux, les variétés les plus proches génétiquement sont distinctes par 38 marqueurs, pour celles qui sont très dissemblables les différences s'élèvent à 125 marqueurs. Le graphe montre que la plupart sont séparés par plus de 60

marqueurs, on peut donc conclure que la collection du prunier de l'INRA est de grande diversité génétique et que 'il n'y pas de variétés proches génétiquement.

Cette diversité entre les génotypes de prunier étudiés se confirme par une distance minimale de 0,16 entre les génotypes G17 et G18, maximum de 0,53 entre G10 et G29, et une moyenne de 0,33.

L'analyse de la matrice binaire obtenue à travers la lecture de différents gels , a permis de construire d'un dendrogramme sur la base des distances génétiques et la méthode UPGMA (Figure 4), qui illustre parfaitement les relations génétiques existant entre les 29 génotypes et variétés du prunier.



**Figure 13 :** Dendrogramme des génotypes étudiés du prunier engendré par les ISSR à l'aide de calcul des distances et la méthode UPGMA.),

La classification ascendante hiérarchique montre une diversité importante de la collection de prunier de l'INRA et elle a permis la distinction de plusieurs pools génétiques distincts. A un niveau de similarité de 0,65 (Figure13) le dendrogramme se distingue en 3 grandes groupes homogènes qui se subdivisent en 5 sous-groupes à un niveau de similitude de 0,72. Le premier sous-groupe A est constitué des génotypes G1 et G14), le B de G2, G3, G9, G5 et G8) troisième C contient les génotypes 17,18,21, 27,22,23,25,26,24, 28, 19 et 20,Le quatrième D contient les génotypes 4,7,et29 , et le cinquième E est constitué de quatre génotypes 10,11,12 13 .

## CONCLUSION GENERALE

L'étude de la diversité génétique de 29 génotypes de prunier collectés à AIN TAOUJDAT par le biais de la technique moléculaire des ISSR, a révélé un polymorphisme élevé.

Vingt amorces utilisées dans cette étude ont engendré 360 marqueurs ISSR reproductibles. Ces marqueurs ont varié de 7 à 22 bandes avec une moyenne de 11,8 bandes par amorce. Ce nombre témoigne le niveau élevé de polymorphisme au sein des génotypes révélés par les amorces sélectionnées.

Toutes les amorces utilisées ont généré des profils polymorphes avec des pourcentages de polymorphismes variables et significatifs, avec un taux de polymorphisme moyen de 82,3%. Les indices PIC des amorces confirment ce polymorphisme avec des valeurs qui variées de 0,105 jusqu'au 0,451 et avec une valeur moyenne de 0,3.

L'étude des distances génétiques et la comparaison deux-à-deux montrent que tous les paires de génotypes sont distincts avec plus de 38marqueurs avec un maximum de 60 bandes.

Le dendrogramme obtenu a montré que les génotypes du prunier sont dissemblable, et ne sont pas proche génétiquement.

## PRESENTATION DE L'INSTITUT NATIONALE DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE



L'institut national de la recherche Agronomique est un établissement public dont les origines remontent à 1914, ayant pour mission d'entreprendre la recherche pour le développement agricole. C'est un institut de recherche producteur de connaissances scientifique et technologiques au service de bien-public, accompagnant l'innovation économique et sociale dans les domaines de l'alimentation, de l'agriculture et de l'environnement. Ses recherches sont nourries par une double dynamique faire progresser les connaissances et répondre à des questions de développement.

Ses orientations se définissent et évoluent au contact d'une grande diversité d'acteurs par un collectif pluridisciplinaire d'experts INRA et par ses multiples ancrages, académiques, économiques, associatifs et territoriaux.

Ses dites orientations, en perpétuelle évolution depuis sa création, intègrent de plus en plus les études des enjeux majeurs à des échelles variées, dictés par la complexité croissante des contextes climatique, démographique et énergétique. L'INRA opère à travers dix centres régionaux et 23 domaines expérimentaux répartis sur le territoire national et couvrant les divers agrosystèmes du pays lui-même permettant d'être à l'écoute de son environnement.



## **Centre Régional de la Recherche Agronomique CRRA Meknès :**

### **Missions et zone d'action**

Le Centre Régional de la Recherche Agronomique est une entité régionale opérant dans une zone incluant différents agrosystèmes, par des recherches, études et actions de recherche-développement visant :

Une meilleure connaissance du milieu et développement de technologies adéquates ;

Une valorisation des acquis et une implication des partenaires dans la recherche.

Pratiquement le CRRA-Meknès assure :

La réalisation d'études et la recherche ;

L'analyse du sol, eau et plante et diagnostic de l'état sanitaire des cultures ;

L'élaboration de support de vulgarisation (fiches techniques, CD interactifs, support de projection, ...)

La formation à la recherche par la recherche (encadrement de thésards, mémorisant et stagiaires).

L'objectif étant d'établir une capacité de recherche appliquée, adaptée aux systèmes de culture de la zone et de développer des technologies permettant l'amélioration de la productivité des exploitations agricoles.

Le CRRA-Meknès couvre la zone d'action de neuf directions provinciales d'agriculture (DPA), Boulmane, El Hajeb, Fès, Ifran, Khènèfra, Midelt, Meknès, Taounate, Taza et Sefrou) s'étalant sur une superficie d'environ 7,3 millions ha (9,8% de territoire nationale), dont 1,7 millions ha de SAU (superficie agricole utile), à dominante céréalière et représentant 22% de la SAU nationale.

## REFERANCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Ali El Mekki, 2015.** Perspective de production et de commercialisation des prunes et des pruneaux au Maroc à l'horizon 2025. Alternatives rurales.

**Anderson , et al. 2001**(Effets des doses croissantes d'azote sur la croissance végétative, la production, la qualité et la conservation des fruits chez Le Prunier (*Prunus domestica* L.. Fortune) dans la région de Séfrou. Mémoire de fin D'études.

**Anonyme, 2010.** Guide Fertilisation Raisonnée En Arboriculture Fruitière.

**Bentayeb , 1993.** Biologie des arbres fruitiers.

**Blanchet , 1994,** Pollinisation et fécondation L'Arboriculture fruitière.

**Boulay , 1966.** Arboriculture et production fruitière. 2eme édition. Presse universitaires de France.

**Bretonneau , Faure , 1991.** Atlas d'arboriculture fruitière, Paris.

**Cronquist , 1981.**An integrated system of classification of flowering plants.Ed.

**Vienne,1997.** Hakim OUTGHOULIAST (Identification moléculaire des génotypes locaux du figuier.

**Gautier, 1993.** La culture fruitière. Ed. Tec et Doc. Paris.

**Gautier, 1988.** La culture fruitière. Vol2. 1er édition. Tec et Doc. Paris .

**Gautier , 2001.** La culture fruitière, les productions fruitières et l'agriculture d'aujourd'hui.

**Genebank , 1993 .**Morgante & Olivieri,; de Vienne & Santoni, 1998.

**Guibral , Calvet , 1979.** Manuel d'arboriculture fruitière. Ed Bailliaire. Paris.

**Guiheneuf , 1998.** Production fruitière. Ed. Synthèse agricole. France.

**Guiheneuf, 1988.** Le paillage plastique en arboriculture fruitière. Fruit Belge

**Guyot , Gibassier , 1966.** Les noms des arbres. Ed. Presses Universitaires de France.

**Hajeer, Worthington et al. 2000.** SNP and Microsatellite Genotyping: Markers for Genetic Analysis. Biotechniques: Molecular Laboratory Methods Series. Eaton Publishing, Manchester'e ».

**Hilaire, 2002** ( Effets des doses croissantes d'azotesur la croissance végétative, la production, la qualité et la conservation des fruits chez leRouergue.

**Khadari et al.1994.**Memoire de master hakim outghouliast.

**Layne , Bassi , 2008.**The Peach: Botany, Production and Uses, Eds. CABI,

**Lespinasse et Leterme, 2005.** De la taille à la conduite des arbres fruitiers. Ed. Rouergue-Parc Saint Joseph. France.

**Mikolajski , Rooney , 2007.**Les arbres fruitiers. Ed. Marabout. France.

**Oukabli et Mamouni, 2015.** (Contribution à l'étude l'impact de différentes doses d'irrigation sur les paramètres de production du prunier dans la région de Séfrou (domaine agricole Louata) Projet de fin d'étude).

**Stand, 1999** . Integrated Pest Management for Stone Fruit.

#### **Annexe n°1 : Préparation du tampon d'extraction :**

✓ Tris (1M) pH=8 :		0.1M
✓ EDTA (0,5 M) pH=8 :		0.02M
✓ NaCl(Sodium chloride):	82g/l	
✓ CTAB (Hexadecyltrimethyl-Amonium Bromide):		20g/l
✓ PVP 40000 0,5 % (Poly-VinylPirrolidone):		5g/l
✓ Na-Bisulfate (Sodium di-sulfite)*:	2g/l	
✓ β-mercaptoethanol (solution toxique)*:		2ml/l

✓ dH<sub>2</sub>O:  
\*à ajouter au dernier moment

QSP

### Annexe n°2: Tampon de migration TBE×1

Pour 1 litre, 5x

	<b>P.M.</b>	<b>Concentration Finale</b>	<b>Poids (g)</b>
<b>Tris</b>	121.1	89 mM	53.91
<b>EDTA</b>	7,45	2 mM	3.72
<b>Acideborique</b>	61.83	89 mM	27.52