



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الأخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et écologie végétale

قسم : بيولوجيا و ايكولوجيا.

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *biologie et génomiques végétales*

Intitulé :

*Utilisation de marqueurs moléculaires liés aux gènes cibles : une nouvelle approche pour améliorer les stratégies de sélection du blé dur (*Triticum durum* Desf.)*

Présenté et soutenu par : *BOULAHROUF Sara*
MERDJANA Nessrine

Le : 19/06/2017

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. *BOUSBA Ratiba* MCA. Université Frères Mentouri Constantine

Rapporteur : Mr. *KELLOU Kamel* MAA. Université Frères Mentouri Constantine

Examineur : Mlle. *MOUELLEF Adra* MAA. Université Frères Mentouri Constantine

Année universitaire
2016 - 2017

Remerciement

Au terme de ce travail,

D'abord, nous remercions ALLAH, Le Tout Puissant, Omnipotent, Clément pour avoir guidé et soutenu nos pas et nous a donné le courage et la volonté pour mener à terme ce travail.

Nous voudrions remercier du fond du cœur Notre encadreur Mr Kellou.K, maitre assistant à l'université Frères Mentouri constantine 1, qui a encadré cette étude au quotidien et avoir proposé ce thème et nous avoir formés tout au long de ce travail. Nous lui disons merci encor pour sa totale disponibilité et sa modestie à notre égard.

Nous tenons à remercier les membres de jury

Madame la présidente du jury : Docteur BOUSBA Ratiba , Maitre de conférence A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 qui à accepter et bien voulu nous faire l'honneur de présider le jury.

Mademoiselle MOUELLEF Adrra , Maitre Assistante A à l'Université des Frères Mentouri Constantine 1, membre du jury Examineur pour le temps consacré pour examiner ce modeste travail.

Nos vifs remerciements sont adressés pareillement à tous mes enseignants et à toute l'équipe BTGV y compris mes amis de la promo.

En fin et profondes reconnaissances à tout ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail mais qui ne sont pas cités ici, nous les remercions tous chaleureuse

Dédicaces

C'est grâce à ALLAH que j'ai eu le courage et la force d'accomplir ce modeste travail.

Je dédie ce travail à celui que je ne pourrais jamais remercier assez, à

Mon père Mouhamed ,ma mère

je tiens à exprimer ma profonde gratitude et tous mes respects pour tout son soutien

A mes sœurs Hannen , Amina , Nassima et Merieme

A mes anges Abd rahime , Louai , Hadil

A tous ceux qui m'ont encouragé de près ou de loin.

Sara

Dédicaces

Avant toute chose je remercie Allah de me donner la force pour arriver à ce niveau, de me faciliter et de m'aider à atteindre ce succès.

Je dédie ce travail à mes chers parents, ma mère Fatiha et mon père Abdelhafid pour leurs sacrifices et leurs soutiens tout au long de mes études

A mes sœurs: Khawla et Nedjwa

A mon frère Abdenour

A ma deuxième mère : Fatima

A mes plus proche sœurs : Samah et Houda

A mon fiancé: Abdelghani

A mes chers grands parents

A toute mes tantes et oncles

A ma proche amie et sœur : Nidal

A tous mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours de mon cursus à l'université

Nessrine

Résumé

Les marqueurs moléculaires directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'amélioration des plantes. Parmi les marqueurs moléculaires, les microsatellites ou SSRs sont réputés être les plus performants pour des analyses de diversité dans de vastes collections de blé.

L'objectif de Cette étude est basé sur la recherche de variabilité génétique au sein de 10 lignées recombinantes issues de croisement interspécifique *Triticum durum* Desf. (Var. Oued Zenati 368) × *Aegilops geniculata* Roth., en utilisant des marqueurs moléculaires de type SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microsatellites, l'ensemble est ainsi comparé avec deux variétés de blé tendre (*Chinese spring* et Courtot) très utilisées en cartographie du génome de blé. Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, université des Frères Mentouri Constantine. Au cours de cette étude on a consacré la première partie à la recherche des amorces les plus polymorphes et les bien réparties sur les chromosomes 1A, 1B, 3A, 3B, 6A et 6B du génome de blé et ceci à partir de la base de données *Graingene* disponible sur Internet. A la deuxième partie de cette étude on a testé les 15 marqueurs SSR sélectionnés sur 14 individus. En effet, les hybrides ont hérité plus de caractères ou d'allèles du parent cultivé (variété Oued Zenati 368) que l'espèce sauvage *Aegilops geniculata* Roth. Il est à signaler que les SSR ciblés sur les chromosomes 1A, 1B, 3A, 3B, 6A et 6B sont polymorphes car sur un nombre total de 51 amplifiats, 35 sont polymorphes. Ce large spectre de polymorphisme peut être exploité pour la recherche des QTLs et leur utilisation dans la sélection assistée par marqueurs des blés cultivés.

Mots clés : Blé, *Aegilops geniculata*, locus, microsatellites et polymorphisme.

Summary

The markers molecular directly from polymorphism existing at the DNA, are now used frequently for analysis of genetic resources and in plans breeding programs .among the markers molecular the microsatellites or SSRs are considered to be the best performers for analyzes of diversity in vast collections of wheat.

The objective of this study is based on the search for polymorphism in 10 recombinant lines from crosses interspecific *Triticum durum* Desf. (Var. Oued Zenati 368) × *Aegilops geniculata* Roth And their parents using markers molecular of type SSR (Simple Sequence Repeat) or microsatellites this work was carried out in the laboratory of genetics, biochemistry and plant biotechnology, university Constantine 1. The first part of this study consisted of research of the most polymorphic primers and well distributed over the genome 1A 1B 3A 3B 6A 6B of wheat et and from the data bank of [GrainGenes](#). available on the web site. The second part of this study consisted of testing these markers on the 14 samples. Indeed, hybrids inherited more traits or alleles from the cultivated parent (Oued Zenati variety 368) than the wild species *Aegilops geniculata* Roth. It should be pointed out that the SSRs targeted on chromosomes 1A, 1B, 3A, 3B, 6A and 6B are polymorphic because over a total of 51 amplicons are polymorphic.

a list of polymorphic markers with a clear and easily interpretable profile , this broad spectrum of polymorphism can be exploited for research of QTL and their use in marker assisted selection of cultivated wheat.

Key words :wheat , *Aegilops geniculata*, locus, microsatellite et polymorphisme.

ملخص

تقوم هذه الدراسة علي تقييم التنوع الوراثي عبر استعمال خمسة عشرة واسمة جزيئية SSR تستخدم هذه الوسامات الجزيئية في كثير من الأحيان لتحليل الموارد الجينية وفي برامج تربية السلالات كما تعتبر أفضل أداء لتحليلات التنوع في مجموعات شاسعة من القمح.

ويستند الهدف من هذه الدراسة على البحث عن تعدد الأشكال في 10 سلالات المؤتلف من *Triticum durum* Desf بين أنواع مختلفة. (*Aegilops geniculata* × (Var. Oued Zenati 368) Roth وأولياء أمورهم باستخدام علامات الجزيئية من نوع SSR (Simple Sequence Repeat) أو الأقمار الصناعية الصغيرة تم تنفيذ هذا العمل في مختبر علم الوراثة والكيمياء الحيوية والتكنولوجيا الحيوية النباتية، جامعة قسنطينة 1.

يتكون الجزء الأول من هذه الدراسة في البحث عن الأشكال متعددة وتوزيعها جيدا على الجينوم القمح الموجود في بنك البيانات Graingene متاح على الموقع الانترنت. أما الجزء الثاني من هذه الدراسة فقد تضمن اختبار هذه العلامات على 14 عينة. في الواقع، ورثت المزيد من الصفات أو الأليلات من (variété Oued Zenati 368) وكذا من الأنواع البرية *Aegilops géniculata* Roth

و هذه القائمة من علامات متعددة الأشكال لها ملف تعريف واضح وسهل التفسير، وهذا الطيف الواسع من تعدد الأشكال يمكن استغلالها للبحوث من كتل واستخدامها في علامة مساعدة اختيار القمح المزروعة.

الكلمات المفتاحية: القمح *Aegilops géniculata* ، SSR (Simple Sequence Repeat)

التنوع الوراثي.

Liste des Figures

Fig 01: Schéma des deux événements de polyploïdisation qui ont conduit à la formation du blé hexaploïde. D'après (B. S. Gill et al., 2004).....	03
Fig 02: Carte du centre d'origine et la diffusion de la culture de <i>Triticum turgidu</i>	04
Fig 03 : Arbre phylogénique des variétés de blé diploïdes, tétraploïdes, pour lesquelles le chromosome 3B à été trié et séquencé.....	07
Fig 04 : La production céréalière dans le monde (source: USDA,compagne2014/2015)	12
Fig 05: Courbe représente la variation de la production du blé en Algérie durant 1961/2014 (FAO 2016).....	13
Fig 06 : Exemple de réalisation Carte génétique réalisé par les SSR(génome A de <i>Triticum aestivum</i>)	23
Fig 07 : Boîtes de pétri contenant les gnaines pré-germés des 14 variétés de blé dur.....	27
Fig 08 : Culture des graines de blé dur dans le sol.....	27
Fig 09 : Dépôt d'un échantillon sur Nano drop.....	29
Fig 10 : Analyse de la qualité d'extraction d'ADN génomique des échantillons étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.....	36
Fig 11 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc24 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudié.....	36
Fig 12 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm497 gel sur d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudié.....	37
Fig 13 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm413 gel sur d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	39
Fig 14 : Vérification de l'amplification du locus XCfa2147 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	40
Fig 15 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc50 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	41
Fig 16 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm169 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	42
Fig 17 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc322 sur gel d'agarose de 2%	43

chez les 14 génotypes étudiés.....	
Fig 18 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm30 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	44
Fig 19 : Vérification de l'amplification du locus Xwms124 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	45
Fig 20 : Vérification de l'amplification du locus Xbarc81 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	46
Fig 21 : Vérification de l'amplification du locus Xbarc8 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	47
Fig 22 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm493 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	48
Fig 23 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc307 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	49
Fig 24 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc419 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	49
Fig 25 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc105 sur gel d'agarose de 2% chez les 14 génotypes étudiés.....	50
Fig 26 : Dendrogramme des marqueurs SSR basé sur la distance Euclidienne des 14 génotypes étudiés.....	51

Liste des Tableaux

Tableau 01: Origines possible du génome B.....	05
Tableau 02: Différentes espèces de blé (genres <i>Aegilops</i> , <i>Amblyopyrum</i> <i>Triticum</i>). D'après (Feldman et Levy 2012).....	08
Tableau 03: Formules génomiques et niveaux de ploïdies des espèces du genre <i>Aegilops</i>	09
Tableau 04: Les espèces <i>Aegilops</i> considérées comme des sources potentielles de tolérance au stress abiotique.....	10
Tableau 05 : Sources de résistance à l'Ug99.....	11
Tableau 06: Représente le marché mondial du blé durant 2012/2017(FA2016/2017)	13
Tableau 07: Les qualités d'un Marqueur SSR.....	21
Tableau 08: Utilisation des Marqueurs Microsatellites.....	22
Tableau 09: Différents types de microsatellites connus chez le blé source: GrainGenes= http://wheat.pw.usda.gov/ ;keller(université de Zurich,Suisse) ;RAGT : Rouergue Auvergne Gévaudan Tarnais. In (Cyrille Saintenac 2009.....	24
Tableau 10 : Origines des variétés étudiées de blé dur.....	26
Tableau 11 : Amorces Arbitraires utilisées dans les réactions PCR-SSR.....	30
Tableau 12: Les réactifs du mélange réactionnel du PCR.....	31
Tableau 13: Programme des PCR effectué sur les différents génotypes.....	32
Tableau 14: Quantités d'ADN extraites chez les différents génotypes étudiés.....	34

Liste des Abréviations

Ae : *Aegilops*

BET : Bromure d'éthidium

CS : *Chinese Spring*

Ct : *Courtot*

dNTP: désoxyribonucléotides Triphosphates

FAO : L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

FMC1 : Université des Frères Mentouri Constantine 1

GBBV : laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales

H : Hybride

INRA Institut National de la Recherche Agronomique

ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures.

O.Z : *Oued Zenati*

Taq : Taq DNA polymérase

TBE : Tampon de migration d'électrophorèse

TE : Tris EDTA

eSSR : SSR des EST

gSSR : SSR génomique

MTP : Minium tiling path

Ug99 : une souche de champignon phytopathogène de la rouille noir des céréales

Table de matière

Résumé

Introduction 01

Chapitre 1 : Recherche Bibliographique

1. Evaluation du génome du blé	03
1.1.1 Origine du blé	03
1.1.2 Origine du génome A	05
1.1.3 Origine du génome B.....	05
1.1.4 Origine du génome D	06
1.2 Utilisation des <i>Aegilops</i> dans l'amélioration du blé	08
1.2.1 Evolution du génome des <i>Aegilops</i>	08
1.2.2 Intérêt des <i>Aegilops</i> dans l'amélioration des génomes des blés cultivés	09
2. Importance du blé	12
2.1 Importance dans le monde	12
2.2 Importance pour l'Algérie	13
3. Amélioration du genre <i>Triticum</i>	14
3.1 Diversité intraspécifique	14
3.2 L'hybridation interspécifique	14
3.3 Les méthodes d'amélioration	15
4. Marqueurs génétique utilisées dans la sélection des <i>Triticum</i>	16
4.1 Marqueurs moléculaires	17
4.1.1 Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP)	18
4.1.2 Les marqueurs détectables par PCR	18
4.1.2.1 Amplification Fragment lenght Polymorphism (AFLP)	18
4.1.2.2 Amplification Aléatoire d'ADN Polymorphe (RAPD)	19
4.1.2.3 La technique des SSR	19
4.1.3 Le principe des SSR	19
4.1.3.1 Le polymorphisme SSR	20
4.1.3.2 Les deux types de marqueurs microsatellite gSSR et eSSR	21
4.1.3.3 Les qualités des marqueurs SSR	21
4.1.3.4 Les principales utilisations des marqueurs SSR	22
4.1.3.5 Exemple d'identification et recherche des SSR	25

Chapitre 2 : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal	26
2. Mise en place de l'essai	27
3. Caractérisation moléculaire des géotypes	28
1) L'extraction de l'ADN génomique	28
2) La Quantification de l'ADN et le contrôle de qualité	29
3) Les amorces SSR utilisées	30
4) Les réactions d'amplification	31
5) La vérification des produits PCR et visualisation des résultats	32
6) Traitement des résultats	33

Chapitre 3 : Résultats et discussion

1. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN génomique extrait	34
1.1. Quantification de l'ADN	34
1.2. Qualité d'extraction	35
2. Polymorphisme des marqueurs étudiés	36
3. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)	51
Conclusion	53
Référence bibliographique	55
Annexe	64

Introduction

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans les systèmes agricoles, ils sont considérés comme une principale source de nutrition humaine et animale (Slama *et al.*, 2005).

Le blé toutes variantes de céréales qui appartiennent au genre *Triticum*. On en distingue plus de 20 000 variétés, dont les plus connues et répandues sont Le blé tendre (*Triticum aestivum*) (AABBDD, $2n = 42$), et le blé dur (*Triticum durum* Desf.) (AABB, $2n = 28$). Bien que nos connaissances sur cette espèce soient moins avancées que sur les plantes modèles (arabette et riz), principalement à cause de la taille de son génome, de nombreuses populations ont été cartographiées. Ainsi, le séquençage de génome de blé ou le décryptage de l'information génétique contenu dans les séquences génomiques de cette céréale implique l'établissement de la carte de référence ; qui comporte plus de 1500 marqueurs.

En 2012 Le plus grand chromosome du blé est le chromosome 3B, et établi par les chercheurs de l'INRA de Clermont-Ferrand, Toulouse et Versailles, la carte physique de ce chromosome qui se compose de 1036 groupes de séquence d'ADN, appelés contigs. Cette carte génétique va permettre : de localiser rapidement les gènes d'intérêt agronomiques, Codant pour le rendement, la qualité ou la résistance aux maladies, afin de mettre au point de nouveaux marqueurs génétiques (Anonyme 2012)

L'essor des techniques de marquage moléculaire par : PCR (SSR, STS, RAPD et AFLP) ou par digestion enzymatique (RFLP) a induit des changements considérables dans plusieurs branches de la biologie notamment la biologie moléculaire: la génétique évolutive (cartographie comparative), détection et identification des locus contrôlant les caractères quantitatifs (QTL) l'amélioration des espèces (sélection assistée par marqueurs)

Le développement des marqueurs moléculaires liés aux gènes cibles offre la possibilité d'établir: de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. Les marqueurs moléculaires un outil essentiel dans les programmes de sélection du blé pour les résistances aux maladies et aux insectes ces marqueurs contribuera à l'amélioration du rendement de cette culture céréalière à grande importance économique

L'utilisation de marqueurs génétiques très polymorphes, comme les microsatellites SSR est particulièrement intéressante pour examiner la diversité génétique au sein des espèces. Ce polymorphisme repose sur variation du nombre d'unités de répétitions constituant les microsatellites. Les séquences flanquant ces éléments répétés permettent de définir les amorces qui seront utilisées pour l'amplification PCR

Le principal objectif de cette étude est la recherche de la variabilité génétique au sein d'une descendance interspécifique en utilisant les marqueurs microsatellites cartographiés sur les chromosomes 3A 3B 1A 1B 6A et 6B (source : GrainGenes ,Anonyme2017).

La présente étude se compose de trois chapitres:

- La Synthèse Bibliographique dont la quelle nous présentons la littérature relative à notre thème.
- Le chapitre Matériel et Méthodes sous le quel sont rassemblées la description du matériel végétal ainsi que les techniques utilisées pour la réalisation de notre objectif.
- Vous trouverez enfin dans le dernier chapitre Résultats et Discussions, l'ensemble des résultats obtenus et leur interprétation

Chapitr 01

Revue biographique

1. Evolution du génome du blé

Le blé possède l'un des génomes les plus complexes parmi les céréales et au-delà dans l'ensemble du monde vivant. De plus le blé comporte non pas un simple génome nucléaire composite une association de trois génomes de trois espèces différentes regroupés dans la même cellule et formant une nouvelle espèce.

Au cours du temps les blés ont connu de nombreuses mutations et croisements qui ont conduit à des diversités au niveau chromosomique et génique. Schéma :

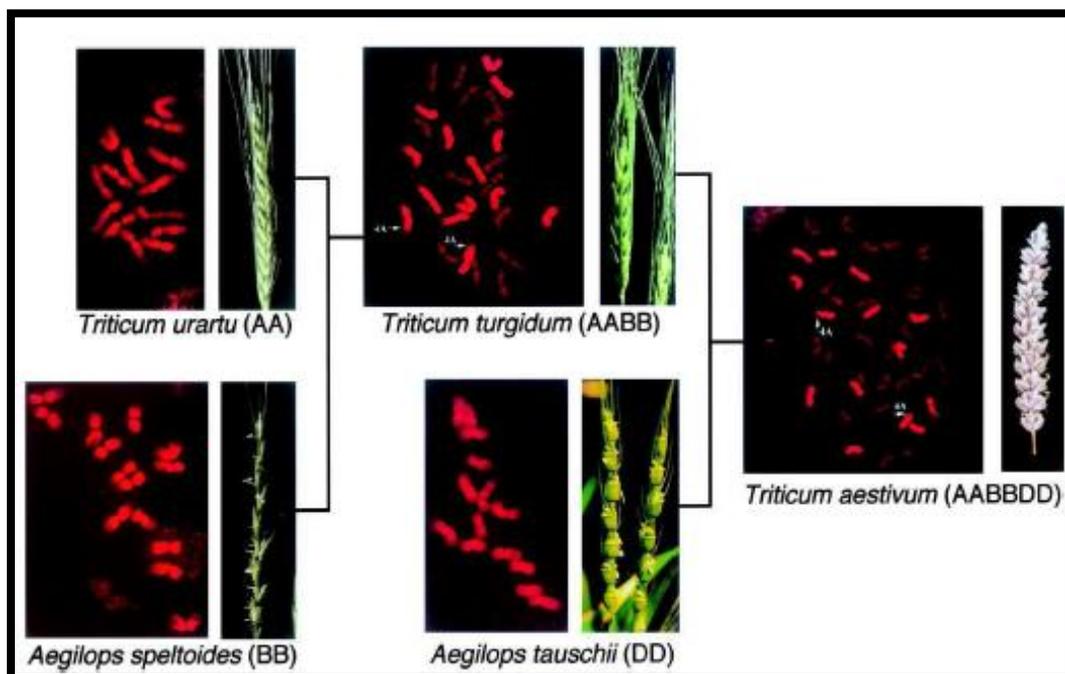


Figure 01: Schéma des deux événements de polyploïdisation qui ont conduit à la formation du blé hexaploïde. D'après (B. S. Gill et *al.*, 2004)

1.1. Origine du blé

Le blé est l'une des premières espèces cultivées par l'homme, depuis plus de 7000 à 10000 ans avant Jésus-Christ. En ce qui concerne la localisation de la domestication de blé, on considérait jusqu'à aujourd'hui qu'elle avait eu lieu dans la région du croissant fertile borné par les plaines alluviales du Nil à l'ouest, Tige et l'Euphrate et la Jourdain au centre. Au nord par les monts Taurus de Turquie, au sud par la mer Rouge et le désert d'Arabie (Clerget, 2013).

Les trois groupes d'espèces du genre *Triticum* aurait trois centres d'origine distincts. Selon Vavilov (cite par Auriou, (1967) et Moule, 1980) ces groupes sont repartis comme suit :

- ⇒ Groupes des Diploïdes : dont le centre d'origine est le foyer SYRIEN et le nord PALISTINIEN.
- ⇒ Groupes des Tétraploïdes : ayant comme centre d'origine l'ABYSSINIE.
- ⇒ Groupes des Hexaploïdes : dont le centre d'origine est le foyer AFGHANO INDIEN.

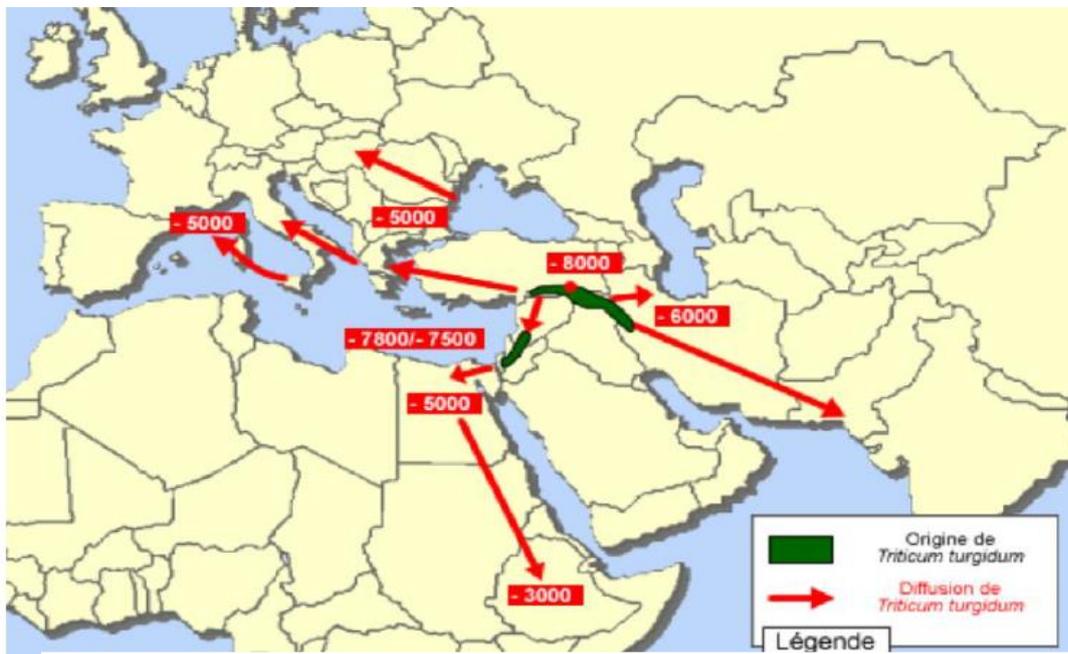


Figure 02: Carte du centre d'origine et la diffusion de la culture de *Triticum turgidum* (Bonjean, 2001)

Les différentes espèces de blé ont subi des transformations au fil du temps, les faisant passer de l'état de graminées sauvages à des espèces cultivées. L'observation des chromosomes pendant la méiose et les résultats d'hybridation a montré que les génomes des graminées peuvent souvent être regroupés en deux types distincts. Chaque type a reçu un nom A, B ou D.

En effet, la détermination de l'origine des génomes du blé est difficile du fait de l'évolution des espèces. Il revient se origine a un croisement naturels entre *T.monococcum* ; *T. urartu* et des espèces apparentées appartenant a *Aégilops.sp.* D'un point de vue génétique le premier événement impliquant *Triticum monococcum* et *Aegilops speltoides* a conduit a apparition du blé dur *Triticum turgidum*. Le deuxième événement de polyploidisation a eu

lieu entre le blé dur tétraploïde et *Aegilops tauschii* donnant naissance au blé tendre *Triticum aestivum* de structure chromosomique hexaploïde (Chantret et al., 2005).

1.1.1. Origine du génome A

Par l'analyse cytogénétique des séquences nucléotidiques répétées du génome A chez les espèces : *T. turgidum*, *T. timopheevii*, *T. aestivum*, il a été confirmé que ces séquences ont peu de divergence par rapport à celles du génome A de *T. urartu*. Alors que chez *T. zhukovskyi* un des génomes provient de *T. urartu* et l'autre de *T. monococum*. (Hamdi, 2003)

Des études plus récentes notamment celles de Zhang et al., (2001), Peterson (2006) et Wang et al., (2007) approuvent *T. urartu* comme le donneur du génome A.

1.1.2. Origine du génome B

Celle-ci reste jusqu'à ce jour controversée, Sarkar et Stebbins, (1956) rapportent que l'origine du génome B reste un mystère. Plusieurs recherches ont tentées d'identifier les espèces parentales qui ont contribué à la formation du génome B du blé tétraploïde et hexaploïde par des méthodes cytologiques mais sans succès.

Johnson (1975) observa les protéines des graines est propose *T. urartu* comme ancêtre du génome B.

Tableau 01: Origines possible du génome B

Auteur	Année	Origine possible du génome B
Pathak	1940	<i>Aegilops speltoides</i>
Sarkar et Stebbins	1956	<i>Aegilops speltoides</i>
Johnson	1975	<i>Triticum urartu</i>
Konarev et al	1976	<i>Aegilops longissima</i>
Feldman	1978	<i>Aegilops searsii</i>
Kushnir et Halloran	1981, 1983	<i>Aegilops sharonensis</i>
Lange et Balkema boomstra	1988	<i>Aegilops</i> , Viz de la sélection <i>Sitopsis</i>

D'après ce tableau, l'origine du génome B demeure incertaine (source non identifiée). Il est présent chez la plupart des blés tétraploïdes, il est similaire à *Aegilops speltoides*. Ainsi six espèces ont été données en tant que donneuses potentielles et *Aegilops searsii* semble être le donneur le plus probable (Kerby et Kuspira, 1987).

En effet, les premières constatations morphologiques faites par Sarkar et Stebbing (1956) Riley *et al.*, (1958) attribuèrent l'origine du génome B à *Ae. speltoides*. Alors que l'utilisation du Kimber, (1974) in Hamdi, (2003) montre que les chromosomes d'*Ae. speltoides* ne présentent pas d'homologie avec ceux du génome B.

Le chromosome 3B est le plus grand des 21 chromosomes du blé tendre, avec une taille estimée en cytologie à 995 Mb. En 2004, ce chromosome fut le premier chromosome pour lequel une banque BAC a été construite (Safar *et al.*, Plant J 2004), et en 2008, pour lequel une carte physique a été établie (Paux *et al.*, 2008). Puis finalement optimisée (Rustenholtz, 2011). Cette carte couvre 97% (961 Mb) du chromosome et est composée de 1669 contigs de BAC, une puce à ADN Nimblegen a été mise au point à partir de 40 349 séquences unigènes de blé tendre présentes dans les bases de données, avec pour but d'étudier l'organisation de l'espace génique du chromosome 3B par l'hybridation des BAC composant le MTP (Rustenholtz, 2010 et 2011). Par cette approche, 2924 loci exprimés ont pu être cartographiés sur le chromosome 3B, confirmant l'existence d'un gradient de densité des gènes croissant le long de l'axe centromère-téломère. Cette analyse a également suggéré que 70% des gènes sont organisés en îlots (plusieurs gènes présents sur le même BAC), et que les gènes du même îlot tendent à partager un profil d'expression et/ou une fonction similaire.

1.1.3. Origine du génome D

Royburn et Gill (1987) in Monneveux *et al.*, (2000) rapportent que *Ae. tauschii* = *Ae. squarrosa* est bien le donneur du génome D.

Yan *et al.*, (2002) montrent que les profils électrophorétiques obtenus par Acid-PAGE1 du génome D chez les accessions d'*Ae. tauschii*. sp *strangulata* sont très proches des profils électrophorétiques de *T. aestivum*, et supposent donc la sous espèce *strangulata* comme progénitrice du blé cultivé. Récemment Boyko *et al.*, (2002) ont réussi à établir

Tableau 02: Différentes espèces de blé (genres *Aegilops*, *Amblyopyrum* et *Triticum*).
D'après (Feldman et Levv 2012)

Niveau de ploïdie	Espèce	Génome
Diploïds ($2n = 2x = 14$)	<i>Amblyopyrum muticum</i> (= <i>Ae. mutica</i>) <i>Aegilops speltoides</i> <i>Ae. bicormis</i> <i>Ae. longissima</i> <i>Ae. sharonensis</i> <i>Ae. searssi</i> <i>Ae. tauschii</i> (= <i>Ae. squarrosa</i>) <i>Ae. caudata</i> <i>Ae. umbellulata</i> <i>Ae. comosa</i> <i>Ae. uniaristata</i> <i>Triticum monococcum</i> <i>T. urartu</i>	TT SS SbSb SISI SISI SsSs DD CC UU MM NN AmAm AA
Tétraploïds ($2n = 4x = 28$)	<i>Ae. biuncialis</i> <i>Ae. geniculata</i> (= <i>Ae. ovata</i>) <i>Ae. neglecta</i> (= <i>Ae. triaristata</i> 4x) <i>Ae. columnaris</i> <i>Ae. triuncialis</i> <i>Ae. kotschyi</i> <i>Ae. peregrina</i> (= <i>Ae. variabilis</i>) <i>Ae. cylindrica</i> <i>Ae. crassa</i> 4x <i>Ae. ventricosa</i> <i>T. turgidum</i> <i>T. timopheevii</i>	UUMM MMUU UUMM UUMM UUCC ; CCUU SSUU SSUU DDCC DDMM DDNN BBAA GGAA
Hexaploïds ($2n = 6x = 42$)	<i>Ae. recta</i> (= <i>Ae. triaristata</i> 6x) <i>Ae. vavilovii</i> <i>Ae. crassa</i> 6x <i>Ae. juvenalis</i> <i>T. aestivum</i> <i>T. zhukovskyi</i>	UUMMNN DDMMSS DDDDMM DDMMUU BBAADD GGAAAmAm

1.2. Utilisation des *Aegilops* dans l'amélioration du blé

1.2.1 Evolution du génome des *Aegilops*

Carl Linnaeus fut l'un des premiers à décrire le genre *Aegilops* en (1737), plus tard plusieurs auteurs ont classés le genre en groupes et sous groupe en se basant sur les études des caractères morphologiques et la distribution géographique des espèces du genre *Aegilops*. (in Raskina et al., 2004).

Le genre *Aegilops* consiste en 11 espèces diploïdes, 10 tétraploïdes et 2 hexaploïdes (Van Slageren, 1994), avec des formules génomiques extrêmement différentes, y compris les génomes D, S, U, C, N et M. (Tableau 03).

Aegilops geniculata Roth (syn. *Ae. ovata* L.) est une espèce annuelle, autogame (Hammer, 1980), allotétraploïde ($2n = 4x = 28$), issue du croisement naturel entre deux espèces diploïdes : *Aegilops umbellulata* Zhuk. ($2n = 2x = 14$, UU) et *Aegilops comosa* Sm ($2n = 2x = 14$, MM). Ce qui donne la formule génomique UUMM (Kihara (1937), (1946), (1954); Kimber & AbuBakar, 1981) In Zadri, (2009).

Elle pousse dans la région méditerranéenne, le Moyen Orient et les parties sud de la Russie et de l'Ukraine

Tableau 03 : Formules génomiques et niveaux de ploïdies des espèces du genre *Aegilops*

Section <i>Aegilops</i>	Espèces diploïdes	Génome	Espèces tétraploïdes	Génomes	Espèces hexaploïdes	Génomes
<i>Aegilops l.</i>	<i>Ae.umbellulata</i>	U	<i>Ae. biuncialis</i> <i>Ae.columnaris</i> <i>Ae.geniculata</i> <i>Ae. kotschyi</i> <i>Ae.neglecta</i> <i>ssp</i> <i>Ae. peregrina</i> <i>Ae.triuncialis</i>	UM UM MU SU UM SU UC	<i>Ae.neglecta</i> <i>Ssp.recta</i>	UMN
Comopyrum (Jaub et spach) Zhuk	<i>Ae.comosa</i> <i>Ae. uniaristata</i>	M N	<i>Ae.cyindrica</i>	DC		

Les espèces du genre *Aegilops* constituent une bonne partie du génome du blé. En effet, les blés cultivés sont issus d'hybridation interspécifique entre ses espèces apparentées. De ce fait, une partie de la variabilité présente chez les *Aegilops* ne se trouve pas chez les blés cultivés. La diversité des blés cultivés permet la possibilité d'introduction des gènes d'*Aegilops* dans les programmes d'amélioration génétique du blé. Ces espèces représentent une grande diversité génétique et sont donc une source potentielle pour de nombreux traits agronomiques y compris le rendement et la tolérance aux stress ... (Zaharieva et Monneveux (2006))

Tableau 04 : Les espèces *Aegilops* considérées comme des sources potentielles de tolérance au stress abiotique (Monneveux et al., 2000)

Stress abiotique	Espèce	Génome	Référence
Salt (salin)	<i>Ae. tauschii</i>	D	Farooq et al., (1989), Gorham (1990), Xu et al., (1993), Farooq, (1994).
	<i>Ae. comosa</i>	M	
	<i>Ae. umbellulata</i>	U	
	<i>Ae. cylindrica</i>	CD	
	<i>Ae. neglecta</i>	UM	
	<i>Ae. triuncialis</i>	UC	
	<i>Ae. kotschyi</i>	SU	
	<i>Ae. crassa</i>	DDM	
	<i>Ae. juvenalis</i>	DMU	
	<i>Ae. vavilovii</i>	DMS	
Cold (du froid)	<i>Ae. tauschii</i>	D	Barashkova (1981), Limin and Fowler (1981), Barashkova and Vavilov (1991).
	<i>Ae. umbellulata</i>	U	
	<i>Ae. cylindrica</i>	CD	
	<i>Ae. neglecta</i>	UM	
	<i>Ae. triuncialis</i>	UC	
Drought (sécheresse)	<i>Ae. tauschii</i>	D	Damania et al., (1992), Waines et al., (1993), Rekika et al., (1998b).
	<i>Ae. sharonensis</i>	S'	
	<i>Ae. longissima</i>	S'	
	<i>Ae. kotschyi</i>	SU	
	<i>Ae. geniculata</i>	MU	
	<i>Ae. triuncialis</i>	UC	

Les espèces du genre *Aegilops* peuvent également contribuer à des modifications de la physiologie du blé tel que *Ae. tauschii* (génome D) en augmentant la taille de la feuille étendard et donc la production de la biomasse (Monneveux et al., 2001) de sorte que d'autre *Aegilops* tel que *Ae. kotschyi* et *Ae. tauschii* possède une grande teneur en zinc et en fer dans la graine ce qui peut avoir un impact sur l'amélioration de la qualité du blé.

Tableau 05: Sources de résistance à l'Ug99

Gène	Chromosome	Origine
Sr2	3BS	Tetraploid wheat
Sr12	3BS	Tetraploid wheat
Sr28	2BL	Hexaploid wheat
Sr32	2DS	<i>Aegilops speltoides</i>
Sr33	1DS	<i>Aegilops tauschii</i>
Sr35	3AL	<i>Triticum monococcum</i>
Sr39	2BS	<i>Aegilops speltoides</i>
Sr40	2BS	<i>Triticum timopheevii</i>
Sr45	1DS	<i>Aegilops tauschii</i>
Sr46	2DS	<i>Aegilops tauschii</i>
Sr47	2BL	<i>Aegilops speltoides</i>
Sr50	1DS	Rye
Sr51	3DS	<i>Aegilops searsii</i>
Lr46	1BL	Hexaploid wheat
Temporary Designations		
SrWeb/Gabo56	2BL	Hexaploid wheat
Sr1662	1DS	<i>Aegilops tauschii</i>
SrTm4	2A	<i>Triticum monococcum</i>

2. Importance du blé

2.1. Importance dans le monde

Le maïs est la céréale la plus produite au monde et représente 40% de la production mondiale, suivi du blé (29%) et du riz blanchi (19%) (Figure 04) (USDA, 2014/2015).

La production mondiale de blé est de 742 millions de tonnes lors de la campagne 2016-2017, et sa consommation estimée à 730,5 millions de tonnes. En 2016 sa production est estimée à 1,2% supérieure à celle de 2015 (FAO 2015-2016), (Tableau 06).

Les cinq premiers pays producteurs de blé mondiaux durant l'année 2014 sont : La Chine vient au premier rang dans la production mondiale, ensuite l'Inde, la Russie, les États-Unis et la France. Et l'Algérie qui occupe le rang 35 dans le classement des pays producteurs du blé avec un rendement de 2436197 de tonnes. (FAO 2014).

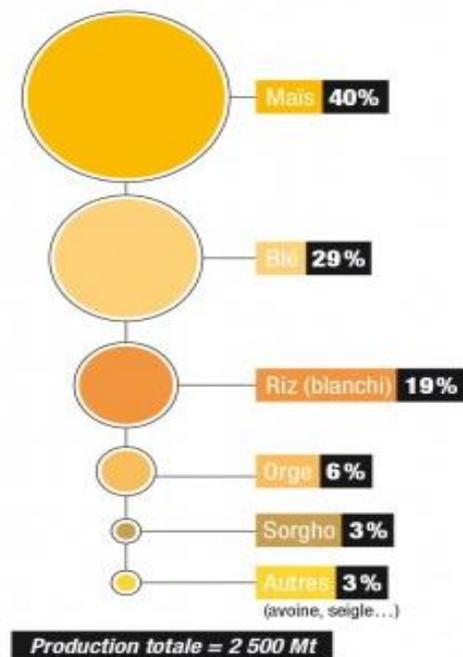


Figure 04: La production céréalière dans le monde (source: USDA, campagne 2014/2015)

Tableau 06: Représente le marché mondial du blé durant 2012/2017 (FAO 2016/2017)

	2012/ 2013	2013/ 2014	2014/2015	2015/2016 estimation	2016/2017 Prévision	
<i>Millions de tonnes</i>					Précédente (02/02/2017)	Dernière (02/03/2017)
Production	654.9	711.5	730.5	735.2	758.1	758.0
Utilisation	684.4	693.8	706.6	714.1	736.5	738.9
Commerce	143.5	157.8	156. 8	166.8	171.0	172.0

2.2. Importance pour l'Algérie

En cinq décennies d'indépendance, l'Algérie a creusé un écart géant entre les besoins et la production de blé. Selon une analyse de FAOSTAT, les besoins de l'Algérie en blé ont observé une progression spectaculaire alors que la production locale a enregistré une quasi-stagnation depuis 1961 jusqu'à 2015. D'après cette courbe, l'année possédant la production la plus élevée du blé est en 2012 avec 3432231 tonnes, (FAO 2016).

La cause principale de la faiblesse de la production du blé dur en Algérie est due à des contraintes abiotiques telles que : la pluviométrie, biotiques telles que : l'adventices et aussi humaines (CHellali, 2007)

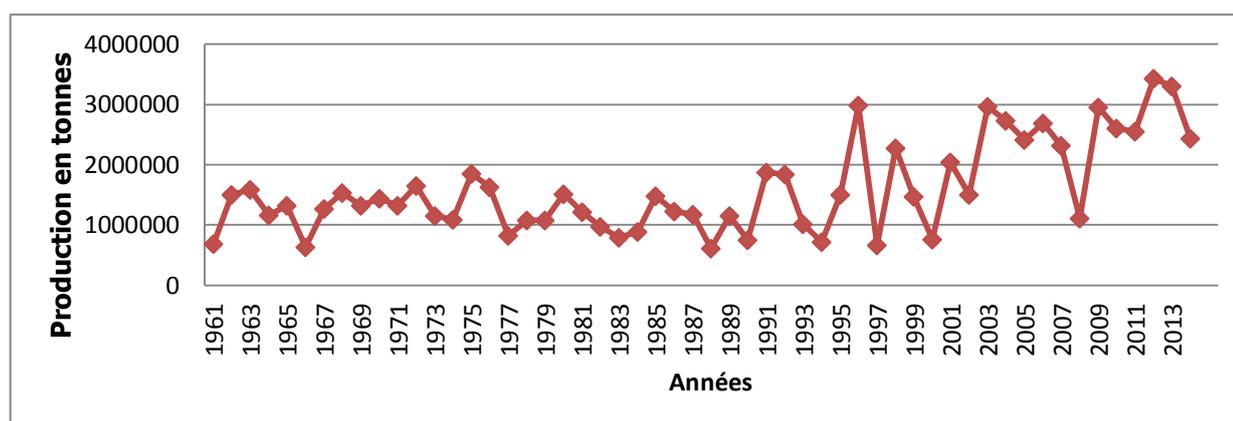


Figure 05 : Courbe représente la variation de la production du blé en Algérie durant 1961/2014 (FAO 2016)

3. Amélioration génétique du genre *Triticum*

Depuis le début de l'agriculture, l'homme a cherché à améliorer les plantes par rapport à des critères de qualités ou de rendement correspondants à ses besoins. (Rossignol et *al.*, 2000).

L'amélioration variétale est un mécanisme très long qui tient compte de divers facteurs: génétiques, physiologiques et pédoclimatiques. Cette amélioration peut utiliser les techniques de la génétique, du génie génétique, de la biochimie, de la physiologie et de la biotechnologie. L'objectif final est d'obtenir un matériel végétal performant qui réponds aux besoins de l'agriculteur et qui possède des paramètres de tolérance et d'adaptation aux contraintes environnementales. (D-Desclaux, 2006)

3.1. Diversité intraspécifique

C'est la variété qui existe au niveau des gènes. Ceux-ci constituent le matériau de construction, elle peut se définir sur le plan des allèles (les variantes d'un même gène), par exemple la hauteur des plantes. Au niveau variétal on peut distinguer pour l'espèce de blé dur (*Triticum durum* Desf.) trois groupes:

- **Les blés d'hiver** : Caractérisent les régions Méditerranéennes et tempérées.
- **Les blés de printemps** : Ils n'ont pas de périodes inactives et ne peuvent survivre à de très basses températures.
- **Les blés alternatifs** : Qui sont intermédiaires, au plan tolérance au froid, entre les blés d'hiver et ceux du printemps (Hanson et *al.*, 1982) in Souilah (2005).

3.2. L'hybridation interspécifique

L'hybridation interspécifique ouvre des perspectives nouvelles complémentaires des méthodes d'hybridation intraspécifique. L'introduction de résistance aux maladies depuis les espèces apparentées est l'exemple le plus illustrant. Elle permet aussi de créer des espèces entièrement nouvelles. L'obtention du triticales est l'exemple le plus célèbre de création d'une espèce végétale entièrement nouvelle par l'homme. Il est issu de croisement entre le blé et le seigle (*Secale cereale* L.) (Lukaszewski & Gustafson, 1987).

Les croisements interspécifiques sont une méthode importante dans la manipulation des génomes par l'introduction d'une seule variation aux cultures (Sharma, 1999).

3.3. Les méthodes d'amélioration

3.3.1 Sélection conventionnelle

Utilisé pour l'amélioration la technique des croisements simple au complexe, interspécifique au inter génétique entre les variétés présentant les caractères requis, les combinaisons souhaitée sont ensuite sélectionnées dans la descendance puis stabilisées et multipliées comprend les technique qui ont été développées et pratiquées par les générations passés pendant de nombreux siècles ces technique utilisent les processus naturelle des organismes vivants, ne suscitent généralement pas d'inquiétude dans la population. Quelle que méthodes de sélection :

- La sélection massale : c'est la plus ancienne, c'est une méthode simple et peu coûteuse : on choisit les plantes qui semblent les plus intéressantes dans une population puis on utilise leurs graines comme [semence](#) pour la culture suivante. Ceci est fait de génération en génération ce qui permet d'augmenter la valeur moyenne de la population.
- La sélection récurrente : est donc une sorte de sélection massale où les croisements sont cette fois contrôlés, ce qui conduit à la sélection de lignées ou d'hybrides. (Kacem, 2005).

3.3.2. Méthode de sélection moderne

La biotechnologie végétale récente utilise des techniques de modification génétique scientifique et d'analyse moléculaire, on parle de marqueur génétique qui permet une accélération du processus de sélection, d'identification en quelques jours et avec une bonne précision les plantes réellement intéressants. Nous avons :

- ⇒ Culture *in vitro*.
- ⇒ Fusion de protoplaste.
- ⇒ Utilisation de mutagenèse.

3.3.3. Sélection assistée par marqueur

La sélection assistée par marqueurs est basée sur la possibilité d'inférer la présence d'un gène par la recherche du marqueur qui lui est étroitement lié. Cette sélection est particulièrement avantageuse lorsque le gène cible est récessif et/ou lorsque son expression

est tardive ou influencée par les conditions de l'environnement. (Dekkers, 2002 et Hospital, 2002).

Outre, les marqueurs moléculaires suscitent un grand intérêt dans le domaine de la sélection (Eagles et *al.*, 2001). Le développement considérable des marqueurs moléculaires au cours des dernières décennies a permis une meilleure compréhension du génome de blé et la cartographie de plusieurs dizaines de locus liés aux résistances aux maladies et insectes. L'utilisation d'un marqueur moléculaire dans un programme de sélection doit passer d'abord par sa validation, en examinant le polymorphisme détecté dans différents fonds génétiques et par l'évaluation du rapport efficacité espérée (Moreau et *al.*, 2001).

4. Marqueurs génétique utilisées dans la sélection des *Triticum*

Un marqueur génétique est tout un marqueur chromosomique biochimique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme (serre, 2006). La connaissance et l'identification de formes de polymorphismes permette de comprendre le mécanisme d'interaction avec autre espèces (De Moraes et *al.*, 2007).

Dans le programme de sélection des plantes les caractères morphologique sont les premiers à être observés. Exemple : la hauteur, la précocité, les composantes et le rendement. (Cui et *al.*, 2001; Gomez et *al.*, 2004).

Ces marqueurs sont utilisés également pour estimer la variation intra et inter populations. En plus ils fournissent des informations utiles pour identifier le matériel biologique (Andersson et *al.*, 2006).

Les marqueurs biochimiques tel que les allozymes et les protéines (protéine soluble: albumines et les globulines, protéine de réserve: tel que les gliadine et les Gluténine (Hernandez et *al.*, 2004) ont été les premiers marqueurs a voir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (Harry, 2001) .

Un marqueur génétique de bonne qualité est Polymorphe, Co-dominant, Non-épistatique, Neutre.

4.1. Marqueurs moléculaires

Un marqueur moléculaire est une séquence (un fragment) d'ADN présentant des variations d'un individu à l'autre. Lorsque l'on parle de l'utilisation de marqueurs moléculaires, il s'agit de l'utilisation d'une technique permettant de visualiser ces différences (Gallais. A, 2013).

Alors, un marqueur moléculaire est un fragment spécifique d'ADN pouvant être identifié au sein du génome complet. (Prat. D et *al.*, 2006).

Ces marqueurs présentent également différents avantages comparés aux marqueurs morphologiques et protéiques, très nombreux, neutres vis à vis de la sélection, couvrent le génome entier, indépendants de la partie de la plante prélevée et de son stade de développement et autonomes des influences environnementales. (Belkadi, 2003).

En outre les marqueurs moléculaires deviennent un outil essentiel dans les programmes de sélection du blé dur (*Triticum durum Desf.*) pour les résistances aux maladies et insectes en offrant des solutions alternatives aux problèmes inséparables à l'utilisation des marqueurs phénotypiques traditionnels (Hospital, 2001).

Il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires, mais cette étude sera consacrée aux microsatellites ou SSR. On outre, de nombreuses techniques de marquage moléculaire sont aujourd'hui disponibles, et de nouvelles sont régulièrement publiées (Gupta et *al.*, 2001; Langridge et *al.*, 2001; Rafalski, 2002 a,b). Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories:

- Les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).
- Les marqueurs basés sur la méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Le choix du système de marquage dépend de l'objectif précis fixé, des moyens et des compétences disponibles au laboratoire (Gupta et *al.*, 1999; Santoni et *al.*, 2000; Langridge et *al.*, 2001).

4.1.1. Polymorphisme de Longueur des Fragments de Restriction (RFLP)

La découverte d'enzymes de restriction bactériennes (endonuclease) a permis le développement de nouvelles techniques d'exploration de l'ADN, basées sur la coupure spécifique de séquences nucléiques par ces endonucleases (Bostein et *al.*, 1980).

Ces enzymes, dont plusieurs centaines ont été découvertes, coupent l'ADN au niveau de sites présentant une séquence spécifique. En revanche, Cette méthode est basée sur la digestion de l'ADN, une séparation par taille des fragments d'ADN sur gels d'agarose et transférée par capillarité sous forme dénaturée une visualisation de séquences spécifiques d'ADN en utilisant des sondes marquées par radioactivité ou par des molécules fluorescentes. Cette méthode, n'a été utilisée que très rarement dans le cadre des espèces domestiques (Lagziel et *al.*, 2000) (Gallais. A, 2011).

4.1.2. Les marqueurs détectables par PCR

Le développement de la technique PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN (Prat. D et *al.*, 2006).

Les plus largement utilisés chez le Blé sont les microsatellites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), l'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) et les RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Gallais, 2013).

4.1.2.1. Amplification Fragment length Polymorphism (AFLP)

Cette technique est basée sur la mise en évidence de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires, utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. L'ADN génomique est clivé par deux enzymes de restriction. Des adaptateurs connues et spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification (Gallais, 2011).

Seuls sont amplifiés les fragments possédant les bases complémentaires de ces bases arbitraires. Ces amorces sélectives permettent de réduire le nombre de fragments amplifiés à une centaine (Prat. D et *al.*, 2006).

Toutefois, la dominance, le coût élevé et les difficultés techniques liées au marquage par AFLP limitent son utilisation à grande échelle pour des applications comme la sélection assistée par marqueurs. (Prat. D et *al.*, 2006)

4.1.2.2. Amplification Aléatoire d'ADN Polymorphe (RAPD)

Les RAPDs (pour *Random Amplified Polymorphic DNA*) ont défini comme un autre type de marqueurs moléculaires récemment développé reposant sur la mise en évidence du polymorphisme. Cette méthode est utilisée couramment en cartographie génétique des plantes et pour évaluer les variations génétiques à la fois entre espèces et au sein d'une même espèce (Pitel et Riquet, 2000).

Cette technique consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10pb). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments correspondant à des locus dominants. (Prat. D et *al.*, 2006)

Les produits d'amplification sont généralement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le polymorphisme décelé est dû à des mutations soit dans les régions amplifiées soit au niveau des sites de fixation des amorces. (Gallais. A, 2013)

4.1.2.3. La technique des SSR

Les SSR constituent une large panoplie de marqueurs, qui peuvent être utilisés pour évaluer les variations génétiques à la fois entre espèces et au sein d'une même espèce. Cette technique consiste à amplifier des fragments d'ADN dont la séquence a été connue. Pour deux variétés, mêmes voisines, des différences de taille existant entre des fragments d'ADN amplifiés sont visualisées par une électrophorèse.

4.1.3. Le principe des SSR

Ils sont constitués de séquences de di, tri ou tétranucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce, (Gallais. A, 2013)

Ils peuvent être localisés dans les régions codantes et non codantes du génome (Toth et *al.*, 2000). Les motifs de répétition des microsatellites sont créés par l'accumulation des mutations successives lors de la répartition, la recombinaison ou bien la réparation de l'ADN (Ingvarsson et *al.*, 2008). Les Marqueurs microsatellites SSR (*Simple Sequence Repeat*) sont spécifiques d'un locus et liés à la présence de répétition en tandem. Ils sont très nombreux (1SSR en moyenne pour 21 Kpb chez les dicotylédones, 1 pour 65 Kpb chez les monocotylédones) et en forment polymorphes en raison d'une variation du nombre de répétitions (Samouelian et *al.*, 2009).

Les microsatellites di-nucléotides les plus fréquents chez les plantes sont (AT) n avec n compris entre 5 et 30. Bien que distribués en de très nombreux loci, les microsatellites peuvent être détectés à des loci spécifiques, des sites STS, en utilisant comme amorces pour la réaction de PCR des oligonucléotides spécifiques des séquences génomiques des espèces analysées. Le repérage de microsatellites peut être effectué par simple interrogation des bases de données à l'aide des programmes d'une analyse de séquences disponible ; l'interrogation est suivie d'une vérification de la réalité du polymorphisme par des réactions de PCR sur différentes plantes, les tailles des fragments amplifiés étant relativement petites et les différences de taille étant faibles, la détection du polymorphisme lié aux microsatellites est réalisée en électrophorèse en gel de polyacrylamide. L'utilisation d'amorces radio marquées ou fluorescentes augmente la sensibilité de la détection (Samouelian et *al.*, 2009).

La technique SSR se base sur l'amplification par PCR de l'ADN génomique moyennant des amorces spécifiques flanquant les séquences répétées. Les SSR se sont révélés des marqueurs moléculaires très utiles dans la sélection assistée par marqueurs, l'analyse de la diversité génétique et l'analyse de la structure génétique des populations chez plusieurs espèces (Gupta, 2000; Budak et *al.*, 2003).

4.1.3.1. Le polymorphisme SSR

Les microsatellites sont utilisés comme marqueurs génétiques ils se caractérisent par leur variabilité individuelle leur stabilité et leur transmission. Ils correspondent à un emplacement strictement défini sur le génome à un locus génétique et aussi à un système allélique.

Ces marqueurs sont codominants, neutres et très polymorphes du fait d'un taux de mutation élevé en moyenne est d'environ 10^{-4} mutations par locus par gamète et par génération (Rognon et Verrier, 2007). Les microsatellites sont donc des marqueurs multi-alléliques et hautement polymorphes (Ollivier et *al.*, 2004).

4.1.3.2. Les deux types de marqueurs microsatellite gSSR et eSSR

Les microsatellites génomiques sont issus de séquences provenant du génome entier, et sont surtout situés dans les régions non-codantes. Leur développement se fait à partir de banques enrichies en motifs microsatellites qui sont fastidieuses à développer, mais sont indispensables lorsque pour l'espèce étudiée il n'y a pas ou peu de données de séquences disponibles. Ce type de microsatellite est très polymorphe (plus de 50% en général selon les espèces), mais moins transférable que les microsatellites issus d'EST (Varshney et *al.*, 2005).

Les eSSR sont issus du séquençage d'ADNc et sont situés dans les régions géniques (introns, exons et UTR). La cartographie de ce type de motif permet donc de cartographier les gènes correspondants, dont la fonction peut être identifiée via des homologues de séquences (Gupta et *al.*, 2003). Il est possible de développer des marqueurs issus de ce type de motif dès que des ressources génomiques sont développées pour l'espèce étudiée.

4.1.3.3. Les qualités des marqueurs SSR

Tableau 07 : Les qualités d'un Marqueur SSR

SSR	
Polymorphisme	Très élevé
Spécifique au locus	Oui
Codominance	Oui
Non épistatique	Oui
Neutralité	Oui
Insensibilité au milieu	Oui
Nombre	Très élevé
Universalité	Non
Technicité	Oui
Fiabilité	Très élevé

4.1.3.4. Les principales utilisations des marqueurs SSR

De nombreuses applications découlent des SSR, les premiers marqueurs microsatellites développés chez les plantes étaient génomiques. Avec l'essor de projets de séquençage d'ADNc et d'outils d'analyses *in silico*, les microsatellites génomiques ont laissé peu à peu place aux microsatellites d'EST (Sharma *et al.*, 2007). De plus, chez certaines espèces génétiquement proches de celles totalement séquencées, il est possible d'estimer la position *in silico* d'un microsatellite. Pour cela, des relations chromosomiques doivent être établies entre les espèces par le détour de marqueurs orthologues déjà cartographiés. Ainsi, à partir d'une espèce séquencée, on peut directement connaître la localisation de ces microsatellites.

Les microsatellites ont été en premier lieu utilisés dans l'étude des population humaines puis dans les races domestique pour évaluer la variabilité génétique intra et inter-races (Ollivier *et al.*, 2000). Ces marqueurs microsatellites ont des qualités qui les rendent idéaux pour la localisation des gènes déterminant un caractère quantitatif ou QTL et ils peuvent être utilisés pour suivre la ségrégation de ces régions importantes au cours du programme d'amélioration (Hartl et Jones, 2003).

Dans le cadre d'une cartographie le pedigree, permettant ainsi d'aligner les groupes de liaisons parentaux. Ils sont aussi d'excellents marqueurs pour la cartographie fine de QTL (Shultz *et al.*, 2007) et pour la marche chromosomique.

En effet, lorsqu'ils sont repérés dans des extrémités de BAC, ils sont couramment utilisés comme point d'ancrage entre la carte physique et la carte génétique. Ils sont également très utilisés pour la cartographie génétique comparée entre espèces génétiquement proches. En faisant de la cartographie comparée à l'aide de microsatellites génomiques, des segments conservés entre ces deux espèces ont été identifiés (Suwabe *et al.*, 2006).

Tableau 08: Utilisation des Marqueurs Microsatellites

Principales utilisations d'un Marqueur SSR	Génotypage
	Étude de génétique des populations
	Marquage de gène
	Cartographie génétique

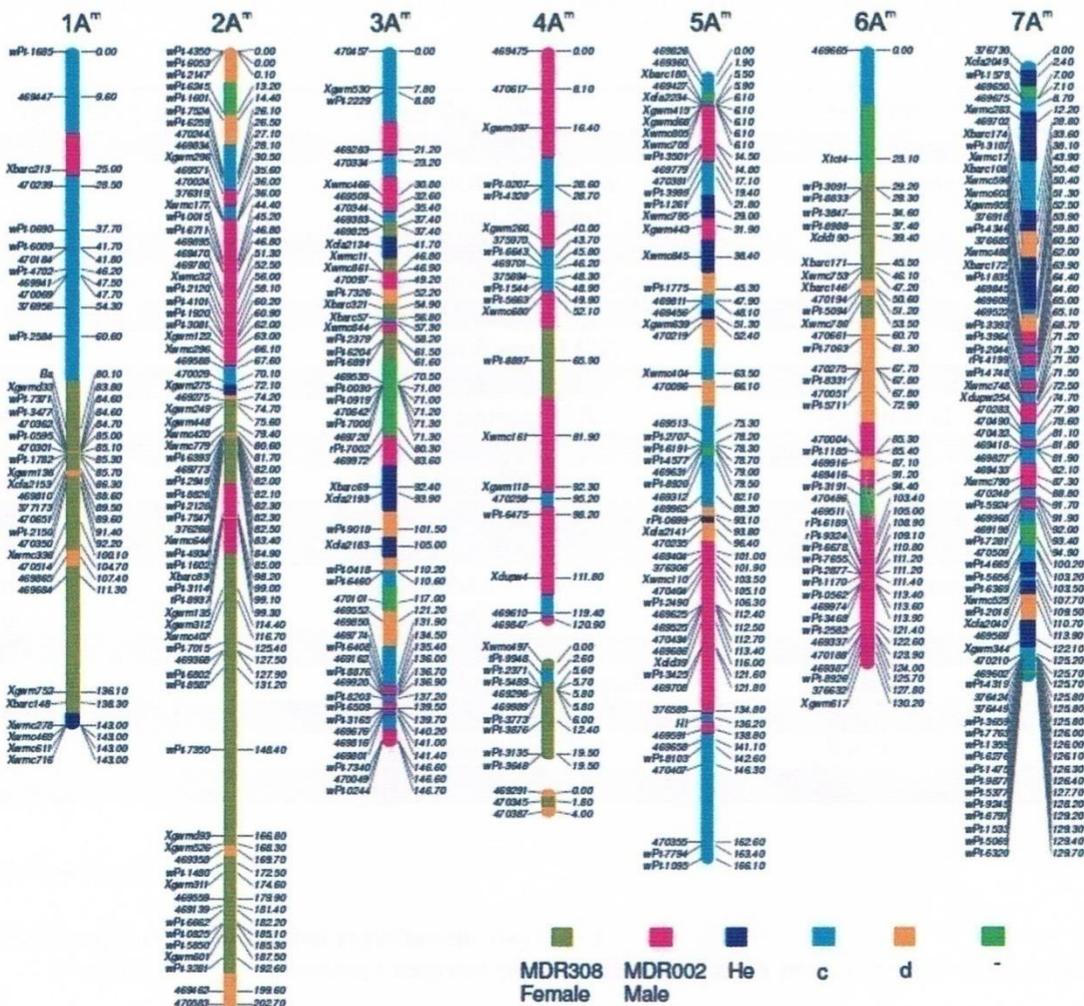


Figure 06: Exemple de réalisation Carte génétique réalisé par les SSR (génome A de *Triticum aestivum*) source : GrainGenes

Par exemple sur le chromosome 3B 751 SSR sont répertorié, ils sont issus des bases de données publiques et privées, de la banque BAC du chromosome 3B. (Paux *et al.*, 2008).

Parmi ceux-ci, 90 répartis de façon homogène sur l'ensemble du chromosome 3B

Tableau 09: Différents types de microsatellites connus chez le blé

source : GrainGenes= <http://wheat.pw.usda.gov/>;keller(université de Zurich,Suisse) ;
RAGT : Rouergue Auvergne Gévaudan Tarnais. *In* (Cyrille Saintenac 2009)

Désignation des SSR	Nom des SSR	Sources
AC	Répétition AC	GrainGenes
Barc	USDA-ARS Beltsville Agricultural Research Center	GrainGenes
Cfa	Clermont-Ferrand A Génome	Clermont-Ferrand
Cfb	Clermont-Ferrand B Génome	Clermont-Ferrand
Cfd	Clermont-Ferrand D Génome	Clermont-Ferrand
Cfe	Clermont-Ferrand EST	Clermont-Ferrand
Cfr	Clermont-Ferrand Riz	Clermont-Ferrand
cs-ssr	Chinese Spring-SSr	(Shen <i>et al.</i> , 2005)
Dw	NC	Syngenta
Gpw	Genoplante Wheat	Clermont-Ferrand
Gdm	Gatersleben D-Génome Microsatellite	GrainGenes
gwm ou wms	Gatersleben D-Génome Microsatellite	GrainGenes
Nw	NC	Syngenta
Swm	Swiss Weat Microsatellite	B.Keller
Wmc	Wheat Microsatellite Consortium	GrainGenes
Wmj	Weat Monsanto JIC	RAGT
Wmm	Wheat Monsanto Microsatellites	RAGT

NC= non connu

4.1.3.5.Exemple d'identification et recherche des SSR

De plus, il existe plusieurs moyens pour la détection et la recherche des SSR a partir des données de séquence des contigs, d'autre marqueurs SSR peuvent être identifié à l'aide du logiciel SSRdesign qui combine le logiciel SSRsearch pour la recherche des microsattellites et le logiciel primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) pour la réalisation des amorces.

D'autre recherche peuvent être effectué sur les séquences masquées, c'est-à-dire ou les éléments transposables sont éliminés

Chapitre 02

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Pour réaliser notre essai qui consiste à étudier le polymorphisme génétique chez les 14 génotypes de céréales à l'aide des marqueurs moléculaires SSR, nous avons choisie 10 lignées recombinantes obtenues par la méthode Bulk après une hybridation interspécifique entre la variété Oued Zenati 368 du blé dur \times *Aegilops geniculata* Roth. Ces lignées ont été obtenues au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, par l'équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes, Université des Frères Mentouri Constantine. Elles ont été comparées avec leurs parents Oued Zenati 368 et *Aegilops geniculata* Roth. Ainsi que deux variétés de référence de blé tendre : *Chinese spring* et Courtot couramment utilisées pour la génomique du blé. Le tableau suivant présente les origines des différents génotypes (Tableau 10).

Tableau 10: Origines des variétés étudiées de blé dur

Variétés	Codes	Origines
<i>Aegilops geniculata</i> Roth	Ae. gen	Campus université FMC1
<i>Chinese spring</i>	CS	INRA Clermont-Ferrand France
<i>Courtot</i>	Ct	INRA Clermont-Ferrand France
<i>Oued Zenati</i>	O.Z	ITGC El Khroub, Constantine
Hybrides (H)		
10	18	1818
1013	1814	1822
1022	1816	
1032	1817	

2. Mise en place de l'essai

L'expérimentation à été conduite dans la chambre de culture du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV), équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes à Chaabet El Rasses, Université des Frères Mentouri Constantine 1.

L'extraction de l'ADNg à été réalisée sur 150 mg de feuilles fraîches des 14 génotypes avec l'utilisation des Amorcees SSR.

L'essai s'est déroulé comme suit :

➤ **La Pré germination**

Les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri, ces dernières sont tapissées par une couches de papier filtre stérile humectés d'eau comme substrat. Dans notre cas, nous avons imbibé les boites contenant des graines avec de l'eau. L'arrosage de ces derniers a été effectué périodiquement selon la demande de la plante (Figure 07).



Figure 07 : Boites de pétri contenant les gnaines pré-germés des 14 variétés de blé dur

Après une bonne germination des graines, on a procédé à un transfert en pots sur un support terreau sable, l'arrosage est effectué chaque 03 jours jusqu'au stade 3 à 4 feuilles (Figure 08).



Figure 08 : Culture des graines de blé dur dans le sol

Au stade préconisé, les feuilles de chaque génotype est coupée avec un ciseau stérile et placée dans un tube Eppendorf stérile de 2ml. On a procédé à l'extraction d'ADN génomique total selon la méthode CTAB.

3. Caractérisation moléculaire des génotypes

1) L'extraction de l'ADN génomique

L'extraction a été effectuée selon la méthode CTAB (Saghai *et al.*, 1984), avec quelques modifications (Annexe 01).

a. Broyage des échantillons

Préchauffer le tampon CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol dans un bain Marie à 65°C. Ensuite, Broyer le matériel végétal (environ 150 mg) dans un mortier avec l'azote liquide (manipuler avec les gants) puis transférer le broyat dans un tube Eppendorf de 2 ml avec une spatule (mettez les tubes bien fermés dans l'azote liquide).

b. Déprotéinisation des échantillons

Ajouter 900 µl de tampon CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol préchauffé à 65°C et homogénéiser au vortex puis incubé 60 mn dans un bain marie à 65°C avec agitation. Centrifuger 15 mn à 10000 rpm à 4°C

Récupérer environ 800µl de surnageant dans un nouveau tube Eppendorf de 2ml. Ensuite, ajouter 800µl (1vol) de chloroforme/Alcool Iso amylique (24 :1) et agiter pendant 45 mn à vitesse lente (100 à 150rpm) sur une table d'agitation (Faire attention aux fuites).

Centrifuger 15 mn à 10000rpm à 4°C et récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube Eppendorf de 2 ml.

Puis ajouter 800µl (1vol) de chloroforme/Alcool Iso amylique (24 :1). Agiter pendant 45 mn à vitesse lente (100 à 150rpm) sur une table d'agitation (Faire attention aux fuites) et centrifuger 15 mn à 10000rpm à 4°C puis récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube Eppendorf de 1.5ml (éviter de prendre la couche blanche au milieu). Ajouter 3 à 5µl RNase (10mg/ml), agiter par inversion et incubé 30 mn à 37°C.

c. Précipitations d'ADN

Ensuite ajouter 540 μ l (2/3vol) d'isopropanol froid (-20°C) et inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche laisser précipiter à -20°C pendant 5 à 10 mn. Centrifuger 10 mn à 10000rpm à 4°C.

d. Rinçage du culot d'ADN

Eliminer le surnageant très délicatement avec une micropipette puis ajouter 500 μ l de solution de lavage 1 et incubé pendant 15 mn à température ambiante. Centrifuger 5 mn à 10000rpm à 4°C, ensuite éliminer le surnageant et ajouter 50 μ l de solution de lavage 2.

Ne pas incubé plus de 5 mn et centrifuger après 5 mn à 10000rpm à 4°C. Puis éliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 mn. Enfin suspendre le culot d'ADN dans 100 μ l de l'eau distillée ultra pure et stocker l'ADN pendant une nuit à 4°C avant dosage.

2) La Quantification de l'ADN et le contrôle de qualité

a. Quantification à l'aide du Nano drop

Le spectrophotomètre NanoDrop ND-2000 permet de réaliser des spectres d'absorbance en utilisant des petits volumes d'échantillons de l'ordre de μ l. Il permet des mesures sur une grande gamme de longueurs d'onde pour l'analyse des spectres dans le visible et l'U.V. Cet appareil est spécialement conçu pour évaluer la pureté et la quantité des acides nucléiques selon la longueur d'onde 280/260.

1 μ l de chaque échantillon étudié est déposé pour lecture. Sans oublier les blancs avant et après chaque dépôt (Figure 09).



Figure 09 : Dépôt d'un échantillon sur Nano drop

b. Contrôle de qualité par électrophorèse sur gel d'Agarose

Après coloration au Bromure d'éthidium dans un tampon TBE 10X, le gel d'agarose a été préparée, le support contenant se dernier est placé dans l'appareil de l'électrophorèse rempli par le tampon (Annexe 03).

Les dépôts sont effectués dans la cuve a raison de 12µl (10µl ADNg + 2µl Tampon de charge) par puits, avec 5µl de marqueur de taille (Annexe 06).

3) Les amorces SSR utilisées

15 marqueurs SSR à été utilisé dans cette étude. Les noms de ces marqueurs, leurs séquences et leur taille sont présentés dans le (Tableau 11).

Tableau 11 : Amorces Arbitraires utilisées dans les réactions PCR-SSR

Marqueur	Localisation sur chromosome	Amorces	Conditions d'amplification
Wmc24	1A	Forward gTgAgcAATTTTgATTATAcTg at 4 length 22 bases, Tm 54 Reverse TAcccTgATgcTgTAATATgTg at 134 length 22 bases, Tm 57	51C°
Gwm497	1A 3A	5' GTAGTGAAGACAAGGGCATT 3' 5' CCGAAAGTTGGGTGATATAC 3'	55 C°
Wms413	1A 1B	5' TGCTTGTCTAGATTGCTTGGG 3' 5' GATCGTCTCGTCCTTGGCA 3'	60 C°
Cfa2147	1A 1B	5' TCATCCCCTACATAACCCGA 3' 5'ATCGTGCACCAAGCAATACA 3'	60 C°
Wmc50	3A	Forward cTgccgTcAggccAggcTcAcA at 349 length 22 bases, Tm 76 Reverse cAAccAgcTAgcTgccgccgAA at 472 length 22 bases, Tm 74	61C °
Wmc169	3A	Forward TAcccgAATcTggAAAATcAAT at 2 length 22 bases, Tm 61 Reverse TggAAgcTTgcTAAcTTTggAg at 147 length 22 bases, Tm 62	61C°
Wmc322	3A 3B	Forward cgccccAcTATgcTTTg at 12 length 17 bases, Tm 61 Reverse cccAgTccAgcTAgccTcc at 88 length 19 bases, Tm 64	61C°
Gwm30	3A	5'ATCTTAGCATAGAAGGGAGTGGG 3' 5' TTCTGCACCCTGGGTGAT 3'	60 C°

Wms124	1B	5' GCCATGGCTATCACCCAG 3' 5' ACTGTTCGGTGCAATTTGAG 3'	60 C°
Barc81	1B	5' GCGCTAGTGACCAAGTTGTTATATGA 3' 5'GCGGTTCGGAAAGTGCTATTCTACAGTA A 3'	52 C°
Barc8	1B	5'GCGGGAATCATGCATAGGAAAACAGA3' 5'GCGGGGGCGAAACATACACATAAAAC3'	50 C°
Gwm493	3B	5' TTCCATAACTAAAACCGCG 3' 5'GGAACATCATTCTGGACTTTG 3'	60 C°
Wmc307	3B	Forward gTTTgAAgAccAAgcTccTccT at 81 length 22 bases, Tm 63 Reverse AccATAAccTcTcAAgAAcccA at 204 length 22 bases, Tm 62	61C°
Wmc419	1B 6B	Forward gTTTcggATAAAAaccggAgTgc at 36 length 22 bases, Tm 65 Reverse AcTAcTTgTgggTTATcAccAgcc at 153 length 24 bases, Tm 65	61C°
Wmc105	6B	Forward AATgTcATgcgTgTAgTAgccA at 6 length 22 bases, Tm 62 Reverse AAgcgcAcTTAAcAgAAgAggg at 176 length 22 bases, Tm 64	61C°

Ces marqueurs moléculaires ont été utilisés pour examiner la diversité génétique des 14 variétés. Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur *Applied Biosystems*.

4) Les réactions d'amplification

Les réactions SSR ont été réalisées dans un volume final de 20µl pour chaque génotype. On a procédé à réaliser l'amplification de l'ADN dans des plaques de 96 puits. La composition du mélange réactionnel est présentée dans le tableau suivant:

Tableau 12 : Les réactifs du mélange réactionnel du PCR

Réactifs	Quantité (µl)
Ampli Taq ADN polymérase	10
ADNg	2
Amorce SSR	1
H2O	7

Les dilutions des amorces ainsi que de l'ADNg ont été faites après extraction et stockées à -20°C (Annexe 05).

Les 15 amorces SSR ont été utilisées pour la réaction PCR en utilisant un thermocycleur *Applied Biosystems*, programmé pour 40 cycles comme pour 4 PCR dans la température d'hybridation et différente (61°C ; 60°C ; 53°C ; 6°C) (Tableau 13).

Tableau 13 : Programme des PCR effectué sur les différents génotypes

	94°C	94°C	60°C	61°C	53°C	72°C	72°C	N°= cycle
P1	3min	30s	45s			1 min	10min	40
P2	3min	30s		45s		1 min	10min	40
P3	3min	30s			45s	1 min	10min	40
P4	3min	30s		45s		1 min	10min	40

5) La vérification des produits PCR et visualisation des résultats

Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 et 2% (Annexe 03).

Le gel est amené doucement à ébullition dans un four à microonde, ainsi il est refroidi, avant de verser le gel dans le support de la cuve, on ajoute 2ul de BET pour le gel à 1.5% et 6ul pour le gel de 2%. Lorsque le gel d'agarose est solidifié, le support contenant le gel est placé dans l'appareil de l'électrophorèse rempli par le tampon.

On a déposé 10ul de produits de PCR dans chacun des puits du gel submergé de tampon d'électrophorèse. Dans l'un des puits de chaque gel on a déposé 5ul de marqueur de taille pour le gel de 1.5% et 4ul pour le gel de 2%. La migration des échantillons est effectuée sous 100V pendant 45sec pour le gel 1.5% et pour le gel de 2%, (Voltage = 135V Ampérage = 153mA (à 12h15) Ampérage = 177mA (à 14h38) sont notés à la fin de la migration (Annexe 04).

6) Traitement des résultats

Lorsque la migration est terminée on a passé à la lecture des résultats. Les fragments d'ADN amplifiés sont visualisés sous lumière Ultra Violette et photographiés en utilisant le système *E-BOX VX2*. Ainsi le poids moléculaire de ces derniers est déterminé par rapport au marqueur de taille (Annexe 06). Pour faciliter l'analyse et l'archivage des gels, des prises de vue ont été effectuées.

Le logiciel MINI TAB 06 pour Windows, nous a permis la réalisation de dendrogramme pour l'établissement de la distance des hybrides et leur parents.

Chapitre 03

Résultats et discussion

Ce travail s'inscrit dans la recherche de polymorphisme des lignées recombinantes grâce aux marqueurs moléculaires les microsatellites SSR qui ont été sélectionné sur les chromosomes 1A, 1B, 3A, 3B, 6A et 6B ces chromosomes portes les caractères de la qualité du blé.

1. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN extrait

Les résultats sont prie comme suit :

1.1. Quantification de l'ADN

Après l'extraction de l'ADN, on a procédé à une quantification de nos extraits par spectrophotométrie en utilisant le *Nanodrop* pour connaître les concentrations de nos échantillons et leur pureté afin de réaliser l'amplification par PCR.

Tableau 14 : Quantités des ADN extraits et dilutions effectuées des génotypes étudiés.

Variétés	Concentration d'Acide Nucléique (ng/μl)	260/280	260/230	Quantité d'ADN à diluer (100 ng/μl)	H2O qsp 50μl
<i>Aegilops geniculata</i>	1232,9	1,89	2,24	2,03	47,97
Oued Zenati	2408,5	1,93	2,23	1,04	48,96
<i>Chinese spring</i>	551,1	1,85	1,98	4,54	45,46
<i>Courtot</i>	1763,2	1,9	2,23	1,42	48,58
H 10	2116,5	1,92	2,12	1,18	48,82
H 1013	407,4	1,9	1,98	6,14	43,86
H 1022	1059,1	1,91	2,24	2,36	47,64
H 1032	2312,7	1,91	2,21	1,08	48,92
H 18	1078,5	1,93	2,2	2,32	47,68
H 1814	1622,9	1,91	2,18	1,54	48,46
H 1816	91,4	1,86	2,02	27,35	22,65
H 1817	1800,9	1,92	2,17	1,39	48,61
H 1818	907,2	1,86	2,25	2,76	47,24
H 1822	350,2	1,93	2,09	7,14	42,86

On note que les concentrations obtenues sont largement suffisantes pour un bon déroulement d'une amplification d'ADN, les concentrations de nos échantillons varient entre 2408.5ng/μl et 91.4ng/μl, pour le parent Oued Zenati368 et l'hybride 1816 respectivement (Tableau 14).

Les mesures 280nm permet de contrôler la pureté de l'extraction et la longueur d'onde 260nm indique la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. En effet le rapport 260/280nm doit être compris entre 1.8 et 2, s'il est inférieur à 1.8 ou supérieur à 2, alors on a une contamination par des protéines et phénols.

La pureté des extraits d'ADN est évaluée par le rapport d'absorbance 260/280. Ce dernier est en moyenne de 1.85ng/μl (valeurs varient entre 1.80 et 1,95). Ce qui nous permet de dire que nos extraits d'ADN sont purs.

D'après le rapport d'absorbance 260/230nm on peut également dire que les extraits d'ADN sont contaminés par les composés phénoliques utilisés au cours d'extraction, avec une moyenne de 2.8ng/μl (valeurs varient entre 1.44 et 2.25).

L'analyse des rapports R1 (260/280) et R2 (260/230) montrent que la pureté des ADN de nos échantillons est assurée, pour cette évaluation nous avons utilisé les normes suivantes (**Nolan et al., 2006**)

- ⇒ $1,8 \leq R \leq 2$ ADN est pur
- ⇒ $R < 1,8$ Contamination par les protéines
- ⇒ $R > 2$ Présence d'ARN

1.2. Qualité d'extraction

A partir des résultats d'électrophorèse effectuée sur les extraits d'ADN des différents génotypes étudiés, on note que la qualité des extraits d'ADN est bonne et ceci ce rapporte à l'obtention d'une seule bande de taille commune et d'intensité variable pour l'ensemble des individus avec l'existence d'une partie d'ADN dégradé, visible sous forme de trainés sur le gel d'électrophorèse, et ceci pour la majorité des génotypes à l'exception d'*Aegilops geniculata* et l'hybride 1816 (Figure 10).

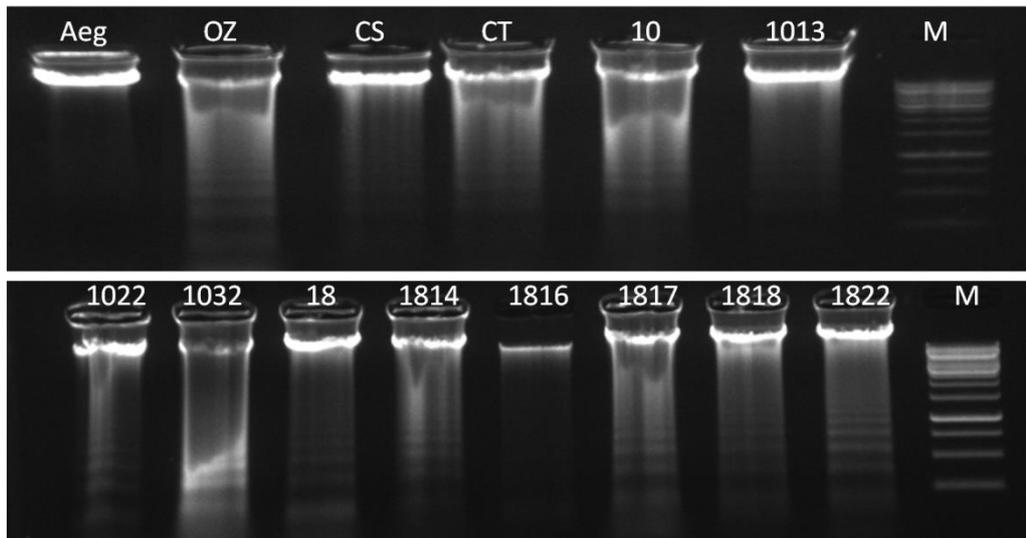


Figure 10 : Analyse de la qualité d'extraction d'ADN génomique des échantillons étudiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%

Par conséquent, la quantification des ADN par le nanodrope est cohérente avec la qualité des ADN extraits, où on remarque que la quantité d'ADN des génotypes *Aegilops geniculata*, *Chinese spring* et l'hybride 1022 reflète la bonne qualité de ces derniers.

2. Polymorphisme des marqueurs étudiés

2.1.Locus Xwmc24 (1A)

A partir de ce gel (Figure11), on a obtenu une variabilité génétique pour l'ensemble des génotypes étudiés. Le profil électrophorétique des lignées est commun pour une seule bande alors qu'il est variable pour le reste. La variété témoin CS de blé tendre a marquée la présence d'une bande ainsi que la variété CT a huit bandes (Figure 11).

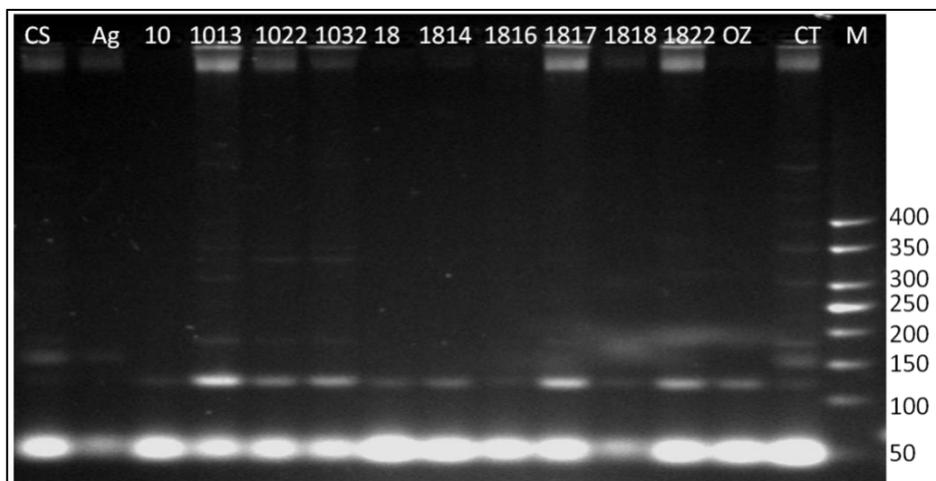


Figure 11: Vérification de l'amplification du locus Xwmc24 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 génotypes étudiés

L'ensemble des hybrides partagent avec leur parent OZ une bande commune de taille 130 pb. Quelques génotypes H1013, H1022, H1032 et H1817 ont montré d'autres bandes de tailles variables, celles-ci sont absentes chez les deux parents OZ et *Ae.geniculata* ainsi que le témoin CS. La variété Courtot a un profil électrophorétique chargé composé de huit bandes. On suppose que ces amplifications ne sont pas spécifiques à ce locus.

Cependant le parent sauvage *Aegilops geniculata* a enregistré une bande de taille 150 pb pareille avec celle amplifiée chez le témoin CS.

Kumar et al. (2010) ont rapporté que ce locus Xwmc24 est porté par le bras court du chromosome 1A.

Ce résultat nous indique que les descendants sont homozygotes pour ce marqueur et l'origine de cet allèle est le parent cultivée OZ.

2.2.Locus Xgwm497 (1A / 3A)

Le profil électrophorétique de ce marqueur a montré l'existence d'un polymorphisme remarquable pour l'ensemble des génotypes à l'exception des hybrides H1817, H1818 et H1822 aucune amplification n'a été enregistrée (Figure 12).

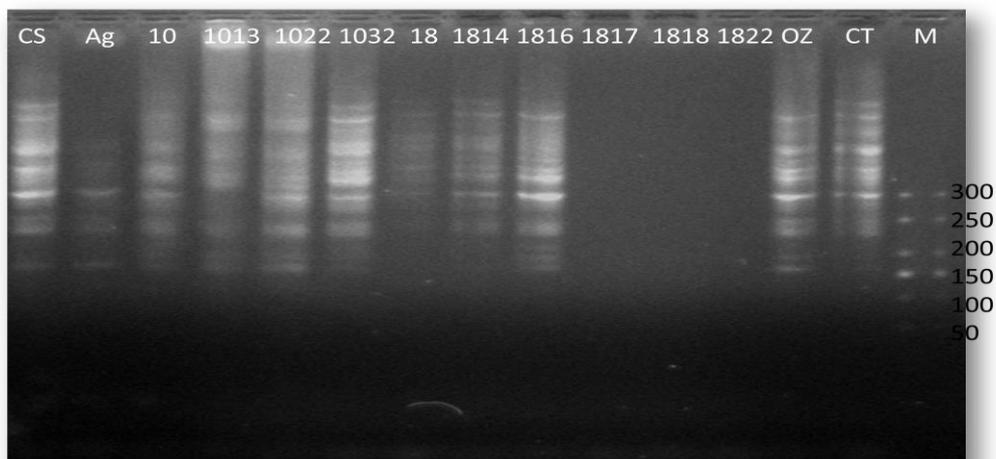


Figure 12: Vérification de l'amplification du locus Xgwm497 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 génotypes étudiés

Les résultats de l'amplification de ce marqueur montrent différents états alléliques, où on note un nombre de bandes variable de 3 et 10 chez l'ensemble des génotypes. Les lignées H1032 et H1814 présentent le nombre des bandes le plus élevé (8 bandes) avec un polymorphisme pour 3 bandes par rapport au parent Oued Zenati 368. Contrairement aux descendants H1013 et H18 qui montrent un nombre de bandes plus faible (03 bandes polymorphes).

Les hybrides H10, H1022, et H1816 présentent un nombre variable de bandes amplifiées de 05 à 07 bandes, dont la majorité sont originaire du parent cultivé OZ. Ainsi, l'absence d'amplification pour les hybrides H1817, H1818 et H1822 peut être expliquée par l'absence d'ADN de ces individus lors de la préparation des réactions PCR.

Cette variabilité nous indique sur la présence de deux emplacements ou loci pour ce marqueur *gwm497*, originaires de parent Oued Zenati 368 car les trois bandes amplifiées chez *Aegilops geniculata* ont les mêmes tailles que celles de la variété OZ.

Il est à noter que ce marqueur est porté par le bras long du chromosome 1A avec le motif répété (GT) \times 29 Somers et *al.*, (2004) et (Marion et *al.*, 1998).

Chez les variétés témoins de blé tendre le profil électrophorétique est similaire entre eux avec une légère différence pour une seule bande. Cependant, chez les hybrides on a observé la présence d'une variation dans le nombre et la taille des amplifiats, on peut conclure que ces individus sont hétérozygotes pour ce locus par comparaison avec leurs parents Oued Zenati 368 et *Aegilops geniculata*.

2.3.Locus Xgwm413 (1A / 1B)

Pour ce locus on a enregistré une amplification d'une seule bande de taille commune de 100 pb chez toutes les lignées à l'exception de H1816 qui a enregistré deux bandes de 100 et 170 pb, cette bande peut être obtenue après une duplication de ce marqueur ou insertion au sein duquel. Ainsi le parent cultivé OZ a noté aussi une seule amplification. Alors que chez l'*Aegilops geniculata* pas d'amplification (Figure 13).

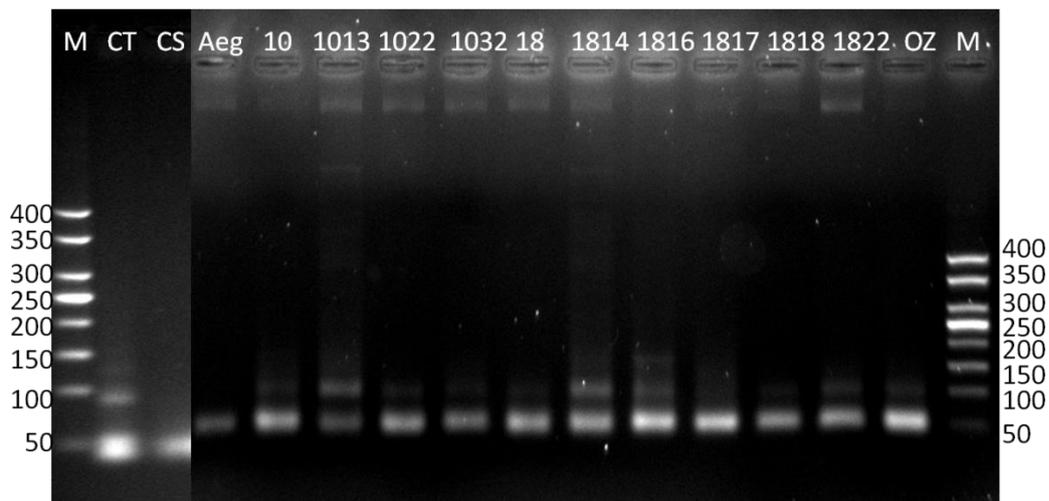


Figure 13 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm413 sur gel d'agarose à 1.5% chez les 14 géotypes étudiés

Par comparaison avec les deux variétés témoins du blé tendre, une amplification spécifique d'une bande de 100 pb a été enregistrée chez Courtot alors que pour *Chinese Spring* aucune amplification n'a été observée.

Le locus de ce marqueur figure sur le bras long du chromosome 1B et sur le chromosome 1A dont le motif répété (GA) \times 18 Roder MS et *al.*, (1998) et (Marion et *al.*, 1998).

La présence d'une seule bande signifie que les individus sont homozygotes et le donneur de cet allèle est le parent cultivé OZ.

2.4.Locus XCFA2147 (1A / 1B)

Les résultats d'électrophorégramme des amplifias spécifiques de ce marqueur Cfa2147 ont permit de déceler l'existence de polymorphisme chez l'ensemble des lignées à l'exception des hybrides H1032 et H1816. Par comparaison avec leurs parents *Aegilops geniculata* et Oued Zenati 368, une bande seulement a été enregistré chez le parent sauvage (Figure 14).

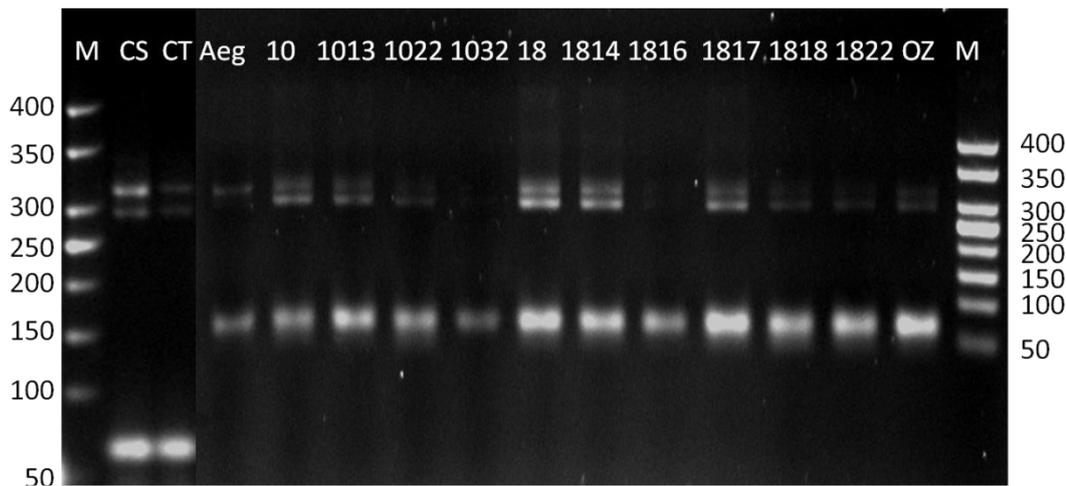


Figure 14 : Vérification de l'amplification du locus XCfa2147 sur gel d'agarose à 1.5% chez les 14 génotypes étudiés

Cependant, les hybrides H1013, H18, H1022, H1817, H1818, H1822 H18 et H1814 ont présenté 2 bandes de taille 300 pb et 320 pb ces deux bandes sont enregistré chez les le parent cultivée Oued Zenati 368 alors que le parent sauvage *Aegilops geniculata* n'a présenté qu'une seule bande de taille 320 pb. Par comparaison avec les deux variétés témoin de blé tendre, on a enregistré deux bandes de même taille 300 pb et 320 pb.

Néanmoins, pour les hybrides H1032 et H1816 aucune amplification n'est enregistrée. Ceci peut être expliqué par l'existence d'ADN dégradé pour H1032 et la faible quantité pour la lignée 1816.

Sourdille et *al.*, (2001) rapportent que ce locus XCFA2147 existe sur le chromosome 1A et 1B, dont le motif répété est de (CATC) \times 4. En effet, ce locus existe aussi sur l'un des chromosomes des deux génomes de l'*Aegilops geniculata* (U ou M).

La présence de deux bandes signifie que la majorité des individus sont hétérozygotes, en supposant que l'allèle des *Aegilops* de taille 320 pb a été amplifié chez l'ensemble des lignées au même temps que le deuxième allèle chez la variété cultivée OZ de tailles 300 pb.

Pour plus d'affinité il est préférable de refaire la migration sur gel d'acrylamide.

2.5.Locus Xwmc50 (3A)

A partir de cet électrophorégramme on observe que chez le parent *Aegilops geniculata*, CT et les hybrides H10, H1013, H1032, H1814, H1816 et H1818 la présence d'une bande commune de taille 100 pb alors que chez les individus Oued Zenati 368, blé tendre CS, H1022, H18, H1817 et H1822 il n'y a aucune amplification. Cependant, les hybrides H10, H1013, H1814 et H1818 ont montré une deuxième bande de 200 pb qui est absente chez les deux parents. Cette dernière peut être donnée par le parent OZ car on n'a pas pu obtenir une amplification pour ce génotype à cause d'erreur de manipulation (Figure15).

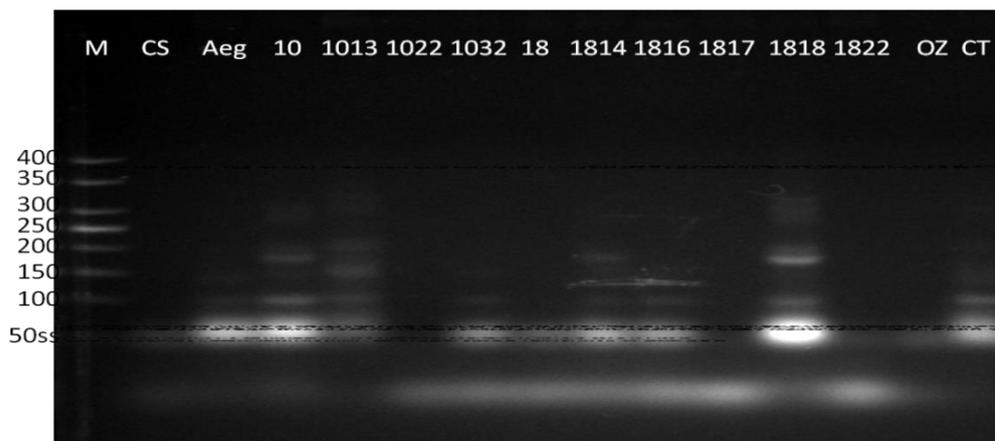


Figure 15 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc50 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 génotypes étudiés

Il est à noter que le locus Xwmc50 existe sur les chromosomes 3A selon Somers and Isaac (2004), il existe aussi sur l'un des chromosomes des deux génomes de l'*Aegilops geniculata* U ou M.

Par l'absence d'information sur le parent cultivé OZ, on ne peut pas déduire l'origine exacte du polymorphisme de ce locus chez les descendants.

2.6.Locus Xgwm169 (3A)

L'amplification de ce marqueur nous a permis de noter chez certains descendants (H1013, H1032, H1816, H1817 et H1822) un profil électrophorétique commun. Deux bandes ont été enregistré pour la variété cultivée OZ et le descendant H10. Par contre il n'y a pas d'amplification pour le parent sauvage *Aegilops geniculata* et les hybrides H1022, H18, H1814 et H1818, et la variété CT du blé tendre. Alors que la variété témoin CS a présenté une bande (Figure16).

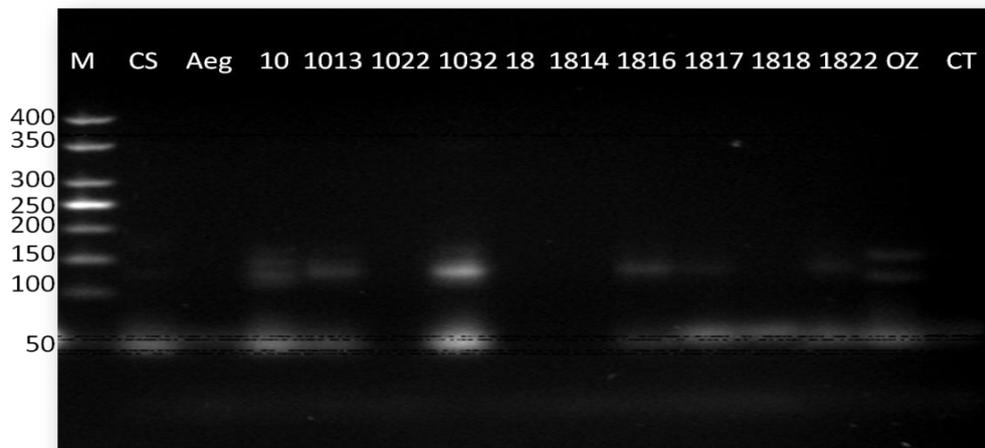


Figure 16 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm169 sur gel d'agarose à 1.5% chez les 14 génotypes étudiés

A partir de ce profil électrophorétique on a noté l'existence d'un polymorphisme entre les lignées recombinantes. Ces dernières présentent une bande de taille 100 pb par comparaison avec leurs parents. Cependant, la variété OZ possède deux bandes de 90 pb et 110 pb, alors qu'*Ae. geniculata* a marqué une absence d'amplification.

Ce marqueur gwm169 est attribué au bras long du chromosome 3A selon Somers et *al.*, (2004).

En effet, la présence d'une seule bande chez la plupart des individus indique que le donneur de cet allèle est le parent cultivé OZ, à l'exception du descendant H10 qui a montré le même profil que le parent cultivé.

2.7.Locus Xwmc322 (3A / 3B)

Les résultats d'électrophorégramme des amplifiats de ce marqueur wmc322 ont permis de déceler l'existence de polymorphisme entre les 10 lignées ainsi que leurs parents. Bien que le parent sauvage *Aegilops geniculata* n'a aucune amplification pour ce marqueur. La même bande a été enregistrée chez les deux variétés témoins *Chinese spring* et Courtot (Figure 17).

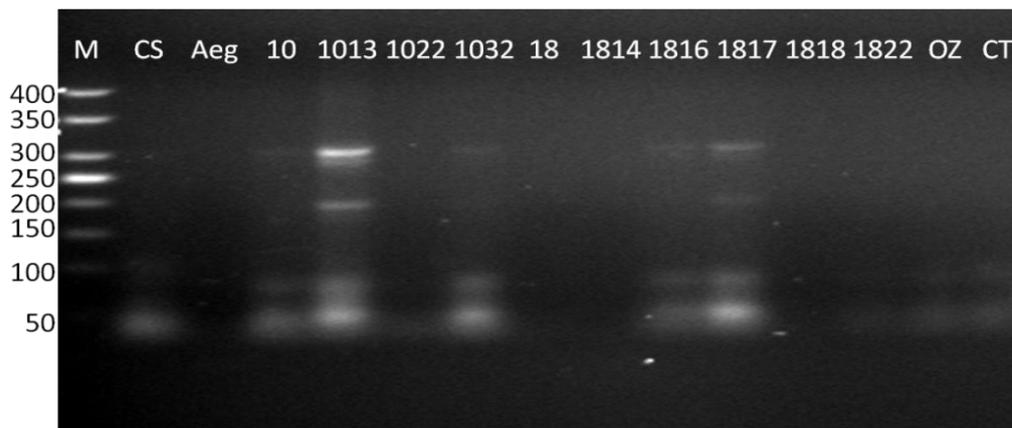


Figure 17: Vérification de l'amplification du locus Xwmc322 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 géotypes étudiés

En faite, on a remarqué que pour certains géotypes, tels les hybrides H1022, H18, H1814 et H1818 ont n'a pas d'amplification du tout et ceci peut être dû à la qualité des amorces utilisées. Pour le reste des individus deux géotypes H1013 et H1817 ont présenté une amplification de trois bandes de tailles différentes 95 pb, 200 pb et 300 pb, ainsi les lignées H10, H1032 et H1816 ont montré deux bandes de tailles distinctes 100 pb et 300 pb. Pour les variétés témoins CT et CS on a enregistré une seule bande de 100 pb.

L'absence d'amplification chez les parents nous ne permet pas de déceler sur l'origine du polymorphisme qui existe chez H1013, H1032, H1816 et H1817.

Somers and Isaac (2004), ont signalé que ce marqueur est porté par les chromosomes 3A et 3B.

2.8. Locus Xgwm30 (3A)

A partir de ce profil électrophorétique on observe qu'il n'y a aucune amplification chez l'ensemble des géotypes et ça peut être dû à la perte d'activité des amorces utilisées lors de l'amplification de ce marqueur (Figure 18).

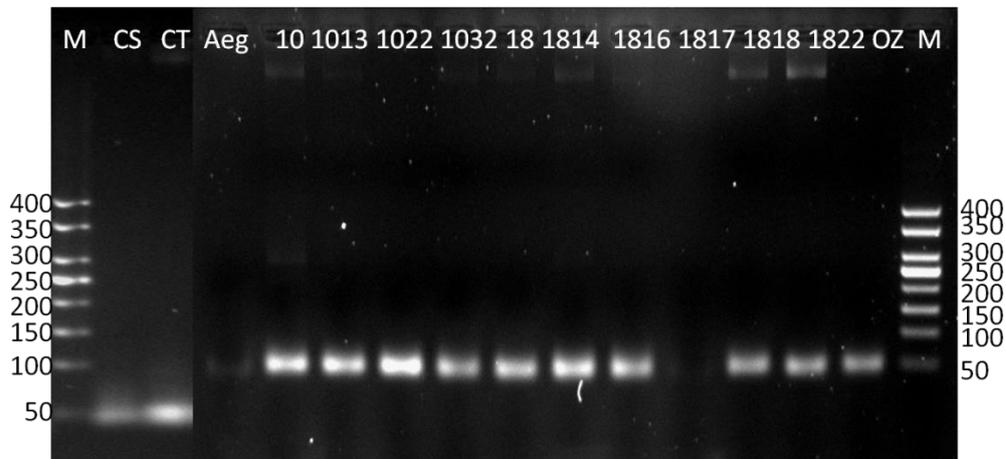


Figure 18 : Vérification de l'amplification du locus Xgwm30 sur gel d'agarose à 1.5% chez les 14 génotypes étudiés

Une amplification non spécifique a été enregistrée chez quelques génotypes. Mais elle est de taille très élevée et qui se trouve loin de l'intervalle d'amplification de notre marqueur.

Ce locus a été répertorié sur le bras long du chromosome 3A dont les motifs répétés sont (AT) \times 19 (GT) \times 15. Roder et *al.*, 1998, Somers et *al.*, (2004) et (Marion et *al.*, 1998).

2.9.Locus Xwms124 (1B)

A partir de ce gel (Figure 19), on note qu'il ya une amplification spécifique chez l'ensemble de lignée. Alors que chez les hybrides on a enregistré deux bandes de tailles variables ainsi que chez H18 trois bandes ont été enregistrées. Chez le parent sauvage *Aegilops geniculata* on a noté la présence de deux bandes distinctes. Alors qu'on a marqué aussi une amplification positive d'une seule bande chez le parent cultivé Oued Zenati 368.

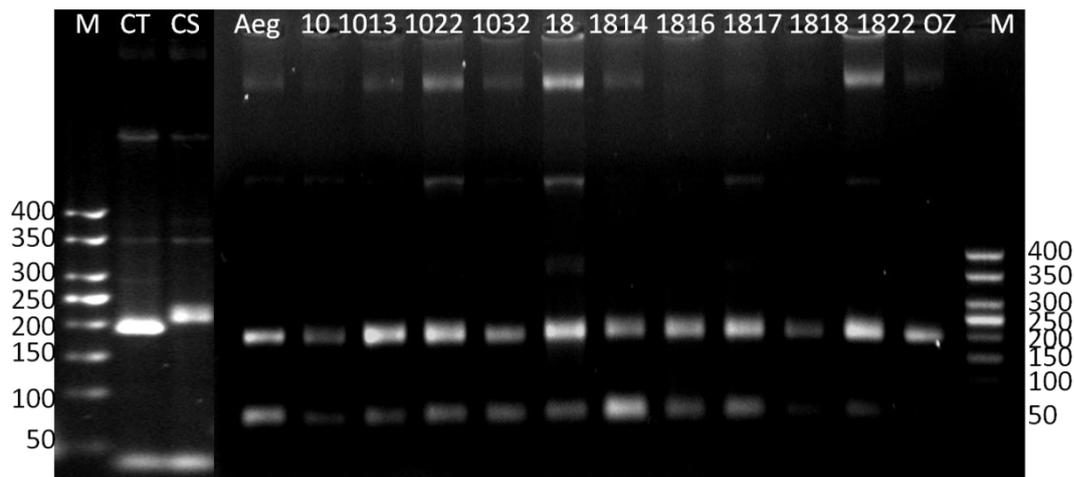


Figure 19 : Vérification de l'amplification du locus Xwms124 sur gel d'agarose à 1.5% chez les 14 génotypes étudiés

Les hybrides H18, H1817 et H1022 ont présenté 2 bandes de tailles 200 pb et 650 pb ces deux bandes sont enregistré chez le parent sauvage *Aegilops geniculata* alors que le parent cultivé Oued Zenati 368 n'a présenté qu'une seule bande spécifique de taille 200 pb. Par comparaison avec les deux variétés témoins de blé tendre on a enregistré la présence de trois bandes de tailles différentes de 200 pb, 350 et 650 pb pour Courtot et 220 pb 350 et 650 pb pour *Chinese spring*.

Cependant, chez l'ensemble des hybrides on a enregistré qu'il y a une amplification d'une seule bande spécifique au locus et de taille de 200 pb c'est la même bande qui est enregistrée chez les deux parents.

Roder et *al.*, 1998 in : Anonyme 2017 ont montré que ce marqueur est porté par le bras long du chromosome 1B dont le motif répété est $(CT) \times 27 (GT) \times 18$. En effet, ce locus existe sur l'un des chromosomes des deux génomes de l'*Aegilops geniculata* U ou M.

Ainsi, l'obtention d'une seule bande pour l'ensemble des descendants ne nous a permis pas de détecter sur l'état des génotypes des hybrides. Alors que l'amplification des deux autres bandes non spécifiques, pour certaines lignées, nous ont permis de dire que ces derniers sont hétérozygotes.

2.10. Locus Xbarc81 (1B)

A partir de ce profil électrophorétique on a enregistré l'amplification d'une bande commune de taille 200 pb chez l'ensemble des lignées et le parent OZ, ainsi que les deux variétés témoins CS et CT, à l'exception de l'hybride H1032 qui n'a pas montré cette bande par contre il a une amplification d'une autre bande pareille à celle du parent *Aegilops geniculata* de taille 95 pb (Figure 20).

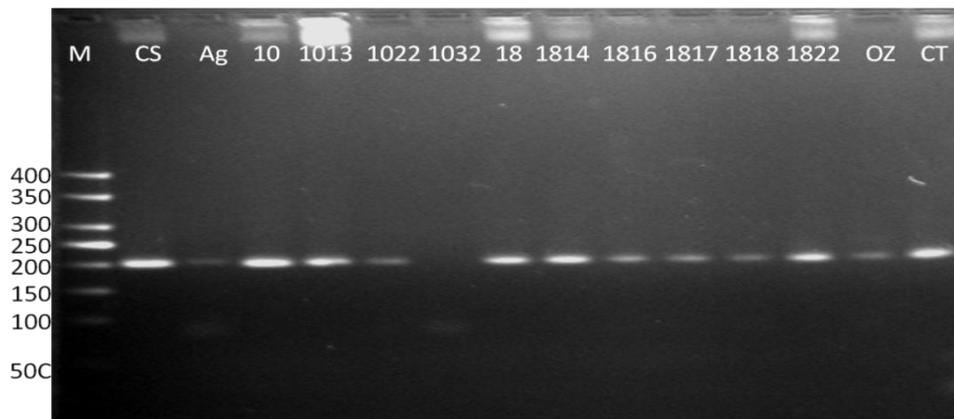


Figure 20: Vérification de l'amplification du locus Xbarc81 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 génotypes étudiés

On ne peut pas décider sur l'état d'hétérozygotie des descendants car les deux parents partagent le même allèle. Ainsi l'origine de la bande amplifiée chez l'hybride H1032 est le parent sauvage *Aegilops geniculata*.

Ce marqueur figure sur le bras court du chromosome 1B dont le motif répété est $(ATG) \times 8 + 2$ (Annama'ria Schneider et al, 2010)

En effet, l'amplification positive d'une bande chez *Aegilops geniculata* nous indique que ce locus existe aussi sur l'un des chromosomes des deux génomes U ou M.

2.11. Locus Xbarc8 (1B)

Le profil électrophorétique de ce marqueur nous a permis de déceler un polymorphisme remarquable chez les parents et leurs descendants. Trois bandes ont été enregistré chez les hybrides (H18, H1814, H1022, H1013, H10, H1032 et H1022) à l'exception de H1816, H1817 et H1818 une seule bande de taille 230pb a été observée. Le parent cultivé OZ a montré deux bandes (250 et 650 pb) dont celle de taille 250 pb est aussi présente chez le parent sauvage *Aegilops geniculata* (Figure 21).

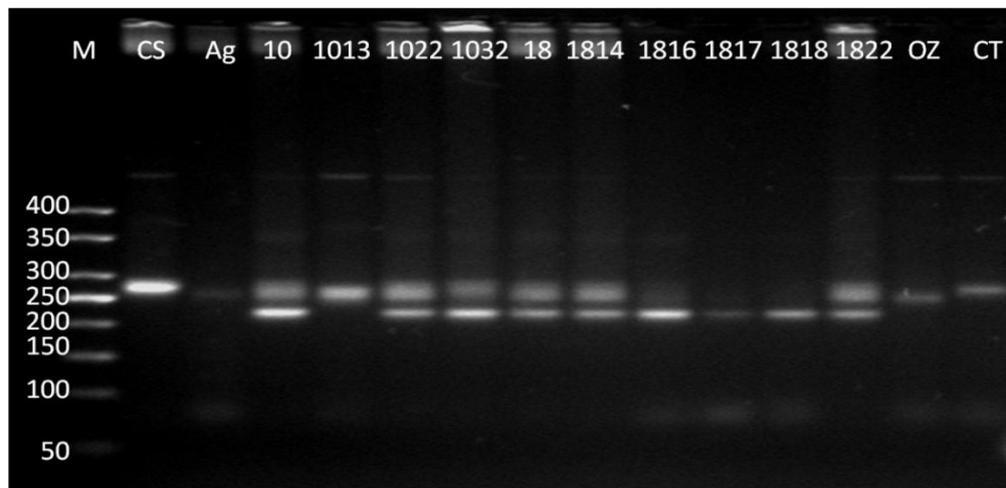


Figure 21 : Vérification de l'amplification du locus Xbarc8 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 génotypes étudiés

L'ensemble des lignées ont montré une bande de 230 pb différente de leurs parents et des deux variétés témoins de blé tendre et ceci peut être dû à une mutation (par délétion) pour ce locus. Cette bande est absente chez l'hybride H1013. Ainsi *Aegilops geniculata* a une seule bande de taille 250 pb.

Ce locus a été cartographié sur les chromosomes 1B dont le motif répété est (TTA) \times 15+11 (Somers et *al.*, 2004).

L'amplification positive chez *Aegilops geniculata* nous informe sur la présence d'un locus sur l'un des chromosomes des génomes U ou M.

En peut conclure que la majorité des descendants sont hétérozygote pour ce marqueur, puisque ils partagent les deux allèles de leurs parents.

2.12. Locus Xwmc493 (3B)

A partir de ce profil électrophorétique on a enregistré chez l'ensemble des lignées et le parent cultivée OZ une amplification spécifique d'une seule bande commune de taille 150 pb à l'exception de l'hybride H1816 aucune amplification n'a été attribuée. Alors que chez le parent sauvage *Aegilops geniculata* on a noté l'apparition d'une bande de taille 210 pb comparable à celles obtenues chez les deux variétés témoins de blé tendre CT et CS (Figure22).

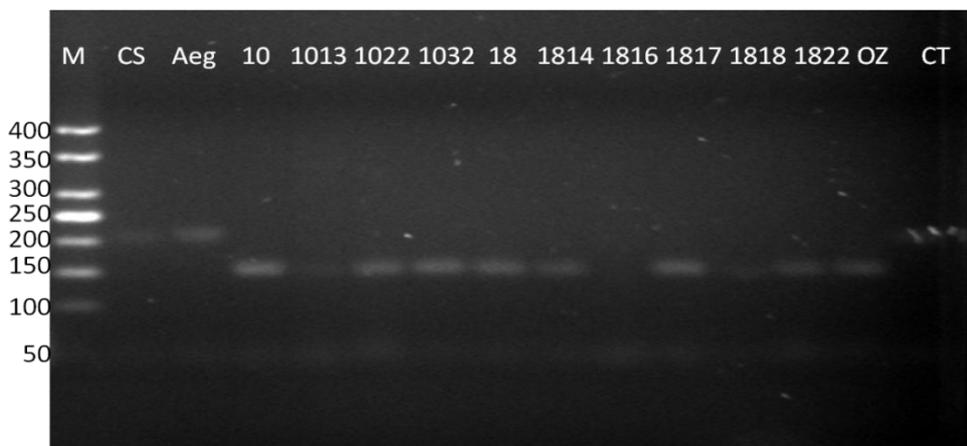


Figure 22 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc493 sur gel d'agarose à 1.5% chez les 14 génotypes étudiés

Exceptionnellement, chez l'hybride H1816 aucune amplification n'est enregistrée. Ceci peut être expliqué par la faible concentration d'ADN qu'il a présenté après l'extraction.

Ce locus a été répertorié sur le bras courts de chromosome 3B (Lowe *et al.*, 2011) et (Marion *et al.*, 1998). En effet, l'amplification d'une seule bande chez toutes les lignées nous indique que les descendants sont homozygotes et ils ont hérité cet allèle de la variété OZ.

2.13. Locus Xwmc307 (3B)

Il est à noter que pour ce marqueur aucune amplification n'est observée chez l'ensemble des individus à l'exception de l'hybride H1013 qui a montré une seule bande de taille 100 pb. Probablement il peut être dû à une amplification non spécifique (Figure 23).

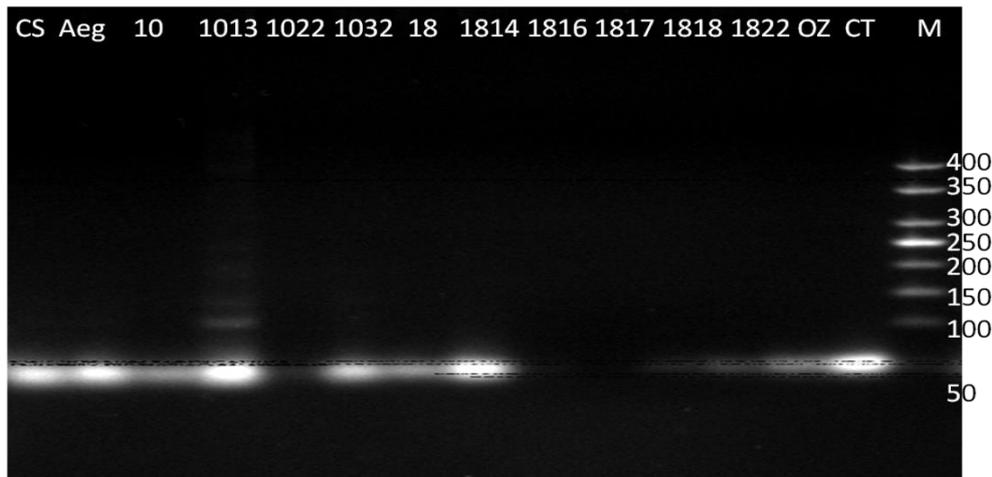


Figure 23: Vérification de l'amplification du locus Xwmc307 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 géotypes étudiés

Pour plus d'information sur ce marqueur, il est recommandé de refaire la PCR en changeant les conditions dans les quelles la PCR s'est déroulé, or Somers and Isaac P (2004) ont rapporté que ce locus existe sur le chromosome 3B.

2.14. Locus Xwmc419 (1B / 6B)

A partir de ce profil électrophorétique on a enregistré l'amplification d'une bande commune de taille 170 pb chez l'ensemble des lignées et le parent OZ, ainsi que les deux variétés témoins CS et CT.

Chez les hybrides H10, H1013, H1022, H18, H1818 et H1822 ont n'a pas enregistré de bandes car l'ADN de ces échantillons a été diffusé lors des dépôts (Figure 24).

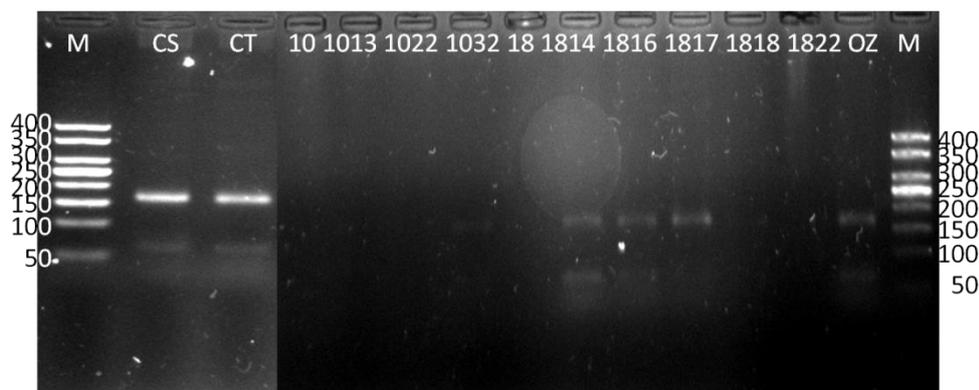


Figure 24 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc419 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 géotypes étudiés

On ne peut pas décider sur l'origine de la bande amplifiée par manque d'information sur le parent sauvage *Aegilops geniculata*.

Ce marqueur figure sur les chromosomes 1B et 6B (Somers DJ et *al.*, (2004) et (Marion et al., 1998).

2.15. Locus Xwmc105 (6B)

L'amplification de ce locus a montré une seule bande commune de 200 pb chez les individus CS, H10, H1032 et H1816, par contre chez le reste des individus aucune amplification n'a été enregistré (Figure 25).

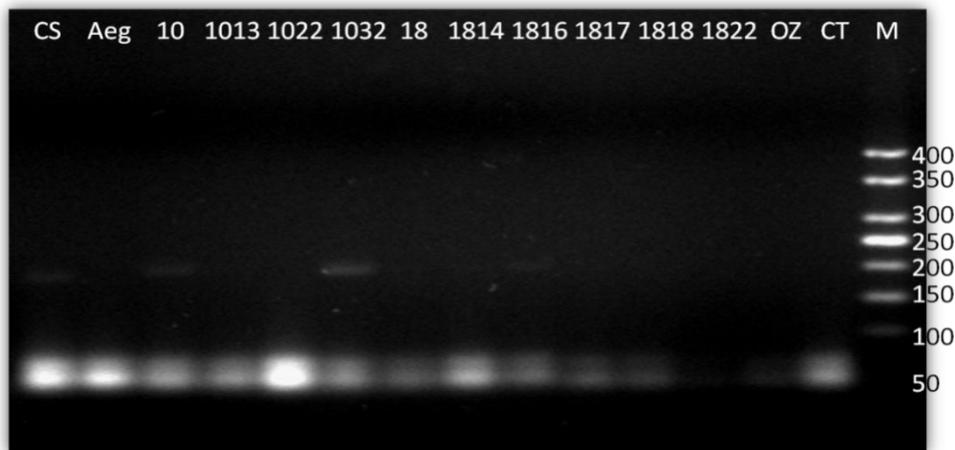


Figure 25 : Vérification de l'amplification du locus Xwmc105 sur gel d'agarose à 2% chez les 14 génotypes étudiés

L'absence d'amplification chez la plupart des génotypes nous n'indique pas l'absence de ce marqueur chez eux, elle peut être due à la qualité ou la quantité d'ADN utilisé lors de la révélation de ce marqueur, ou le programme de la PCR qui n'est pas bien adapté avec le couple d'amorces de ce marqueur. Ce qui nous oblige de le refaire pour mieux valoriser ce résultat.

Ce locus est porté sur le bras court du chromosome 6B (Ellis et *al.*, (2002)).

3. Classification Ascendante Hiérarchique (CAH)

La classification CAH permet le regroupement des objets ou autres dans des groupes homogènes, sur la base de leur similarité. Cette méthode statistique permet d'effectuer des typologies empiriques. En effet, la procédure s'effectue en utilisant une mesure de la distance Euclidienne.

Nos résultats indiquent l'obtention de deux grands groupes de génotypes. Les deux groupes (G1 et G2) se distinguent par l'ensemble des marqueurs amplifiés chez les génotypes étudiés. La présentation des groupes en fonction des variables est illustrée en figure 26.

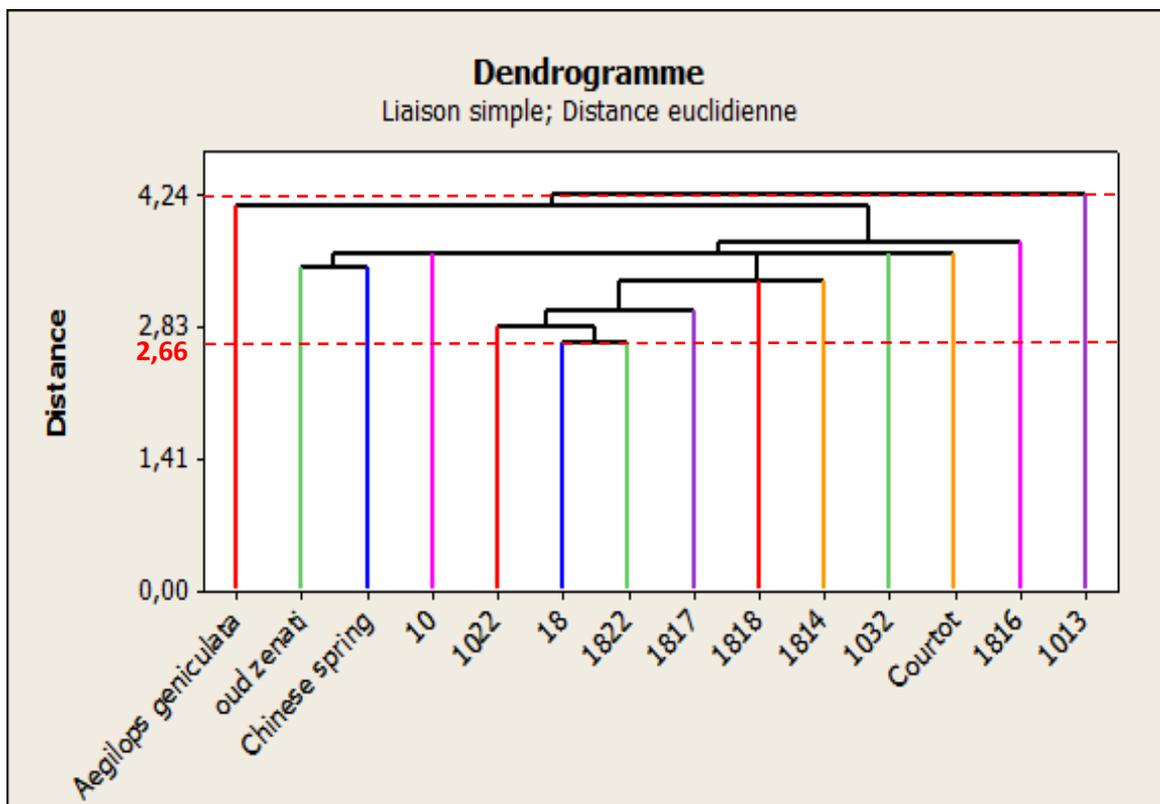


Figure 26 : Dendrogramme des marqueurs SSR basé sur la distance Euclidienne des 14 génotypes étudiés.

Le dendrogramme est construit sur la base des distances génétiques ou des bandes des profils électrophorétiques obtenus pour les marqueurs SSR étudiés. Les liens hiérarchiques apparaissent sur le dendrogramme présenté ci-dessus montrent que le groupe G1 s'est dégagé avec un seul génotype qui est l'hybride H1013 ainsi que le groupe G2 réuni le reste des 13 génotypes restants avec les témoins du blé tendre CS et CT pour une distance de 4,24.

En se basant sur la classification des groupes de génotypes par cluster (ou sous classes) qui est fondée sur les similarités génétiques pour les 15 marqueurs SSR étudiés et la distance Euclidienne minimale (de 2,66) entre les 13 génotypes du groupe 2. Les génotypes sont regroupés similairement en huit sous classes (ou clusters) selon la hauteur des branches qui nous indique sur leur niveau de proximité.

En effet, avec la distance Euclidienne, il est plus aisé de repérer à quel moment une variété ou un groupe de variétés est regroupé avec une autre variété ou groupe de variété au niveau d'un nouveau nœud dans le dendrogramme. Ainsi, le nombre de clusters est défini par une coupure tracée (en pointillés) pour séparer les différents niveaux d'agrégation.

- Le premier cluster est présenté par le parent sauvage *Aegilops geniculata* Roth.
- La deuxième sous classe inclut l'hybride H1816, qui est caractérisé par l'absence d'amplification pour certains marqueurs SSR.
- Le troisième cluster enferme les hybrides H10, H1032 ainsi que le témoin Courtot du blé tendre, qui sont très proches du quatrième cluster selon la hauteur de la branche ou le nœud.
- La quatrième sous classe regroupe les deux variétés ; Oued Zenati 368 du blé dur et *Chinese spring* du blé tendre. Cela peut être dû aux différents allèles similaires entre les deux.
- Le cinquième cluster comprend les deux hybrides H1814 et H1818.
- La sixième sous classe est présentée par le seul hybride H1817.
- Le septième cluster enferme un seul hybride H1022.
- En fin, les hybrides H18 et H1822 se sont dégagés seuls en huitième et dernier cluster.

En fait, selon le classement hiérarchique du dendrogramme, les hybrides ont hérité plus de caractères ou d'allèles du parent cultivé (variété Oued Zenati 368) que l'espèce sauvage *Aegilops geniculata* Roth.

Il est à signaler que pour l'ensemble des lignées recombinantes les marqueurs SSR ciblés sur les chromosomes 1A, 1B, 3A et 3B sont polymorphes, sur un nombre total de 51 amplifiats, 35 sont polymorphes.

Dans notre étude, nous avons remarqué que les variétés du blé tendre Cs et CT se trouvent à l'intérieur du deuxième grand groupe avec une similarité élevée au parent Oued Zenati 368. La plupart des marqueurs SSR utilisés semblent spécifiques à ces variétés.

Conclusion

L'étude du polymorphisme génétique par l'utilisation des microsatellites pour l'étalonnage d'une population de lignées recombinantes dont le but est d'évaluer la variabilité génétique qui existe chez cette population en comparaison avec leurs parents, cultivé et sauvage, a permis de mettre au point une technique d'extraction d'un ADN de bonne qualité à partir des feuilles et aussi d'optimiser la technique PCR. L'utilisation des Microsatellites (ou SSR) cartographiés a pour objectif de déterminer le polymorphisme génétique qui existe chez l'ensemble d'individus étudiés.

Au terme de cette étude on a pu mettre en évidence un polymorphisme génétique entre les différents génotypes étudiés. On a conclu que les microsatellites sont apparus polymorphes.

Par conséquent, on a pu constater que les hybrides qui ont présenté deux bandes sont hétérozygotes pour les *loci* (XGWM497, XWMS124, XBARC8, XCFA2147). Ainsi la présence d'une seule bande signifie que les individus sont homozygotes pour les *loci* (XWMC24, XGWM413, XWMC493).

Ce travail nous a permis de retenir que les *loci* qui ont été amplifiés chez les deux parents sont (XGWM497, XCFA2147, XWMS124, XBARC8) alors qu'ils sont portés par les chromosomes (1A, 3A, 1B et 1B) respectivement.

Néanmoins, les *loci* (XWMC24, XGWM413, XWMC419, XGWM169, XBARC81, XBARC8, XWMC493) se sont attribués aux blés seulement. Ainsi, les *loci* (XWMC50, XWMC24, XWMC322, XWMC493, XBARC81, XBARC8) sont enregistrés aussi chez le parent sauvage *Ae. geniculata* et ses descendants. Ils sont attribués à l'un des chromosomes des génomes D, U et M pour ces marqueurs.

On peut considérer que l'absence d'amplification pour les *loci* (XGWM30, XWMC307, XWMC105) est due aux erreurs de manipulations, surtout pour la quantité d'ADN qui est un facteur limitant pour le bon déroulement de la PCR.

En effet, les hybrides ont hérité plus de caractères ou d'allèles du parent cultivé (variété Oued Zenati 368) que l'espèce sauvage *Aegilops geniculata* Roth.

Il est à signaler que les SSR ciblés sur les chromosomes 1A, 1B, 3A et 3B sont polymorphes, sur un nombre total de 51 amplifiés, 35 sont polymorphes.

Dans cette étude, on a pu conclure que la plupart des marqueurs SSR utilisés sont spécifiques aux variétés du blé tendre Cs et CT, elles présentent une grande similarité avec la variété Oued Zenati 368.

Perspectives :

- Il est préférable de reprendre l'amplification de certains marqueurs et d'effectuer un criblage profond de la descendance du croisement interspécifique.
 - L'électrophorèse sur gel d'acrylamide, pour les marqueurs polymorphes, peut nous permettre de repérer beaucoup de *loci* pour les marqueurs étudiés.
 - Introduire d'autres marqueurs moléculaires spécifiques qui pourraient être liés à l'adaptation, au rendement et à la qualité.
 - Il faut passer directement au séquençage pour mettre en évidence le polymorphisme qui existe entre les génotypes étudiés.
- Enfin, pour pouvoir mettre en évidence un polymorphisme quelconque chez le *Triticum*, ou d'autres espèces, il serait préférable d'augmenter le nombre de microsatellites ainsi que l'effectif des échantillons étudiés.

Références Bibliographiques

- Aggarwal RK, Hendre PS, Varshney RK, Bhat PR, Krishnakumar V, Singh L (2007)**
Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theoretical and Applied Genetics* 114: 359- 372
- Andersson, MS., Schultze-Kraft, R., Peters, M., Hincapie, B., Lascano, CE., (2006).**
Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research* 96: 387-406.
- Annama'ria Schneider., (2010) in DJOUABLIA B (2013)** Caractérisation moléculaire par lesSSR des lignées intergénériques Blé dur X *Aegilops geniculata*. Page : 27.
- Auriau. P, (1967):** Amélioration de blé dur. Annales de l'INA de Tunisie. n° 40. V. 5. 344 p.
- Belkadi,(2003)**in Analyse de la diversité génétique de lignées interspécifiques Blé dur (*Triticum durum* Desf)/ *Aegilops geniculata* par les microsatellites (SSR) Présenté et soutenu par : Saoula Zohra
Le : 21/06/2016
- LesBarashkova, E.A. (1981).** Role of the D genome in increasing the frost resistance of winter wheat. *Referativnyi Zhurnal*, 2: 65-124.
- Barashkova, E.A. and Vavilov, N. (1991).** Physiological-genetic aspects of frost resistance in winter wheat. Relationship of frost hardiness with genome composition in wheat. In: *Proc. International Symposium: Wheat Breeding - Prospects and Future Approaches*. Institute for Wheat and Sunflower, Albena, Bulgaria, pp. 379-384.
- Bonjean A. (2001).**Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle du blé tendre (*triticum aestivum* L.) . In S.Le perchec , p. Guy , A. Fraval : Agriculture et biodiversité des plantes . Dossier de l'environnement de l'INRA , n°21 , 29-37.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. Davis. (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*. 32 : 314-331
- Boyko, E., Kalender, V. Korzun, J. Fellers, A. Korol, A. H.Schulman & Gill B.S. (2002).**A high-density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense-related genes: insights into cereal chromosome structure and function. *Plant Molecular Biology.*, 48: 767-790.

- Pedraza, F., Baenziger, PS., Cregan, PB., Dweikat, I., (2003).** Development and utilization fo SSR to estimate genetic diversity in a collection of pearl millet germplasm. *Crop Sci.* 43:2284-2290.
- Clerget Yves., février (2013).** La biodiversité des céréales : origine et évolution en ligne : http://artic.ac-besancon.fr/svt/fra_com/exp_mus/cereales/biodiversite_cereales.pdf
- Cui, Z., Carter, TE, Jr., Burton, JW., Wells, R., (2001).** Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *Crop Sci* 41: 1954-1967.
- Damania, A.B., Altunji, H. and Dhaliwal, H.S. (1992).** Evaluation of *Aegilops* spp. for drought and frost tolerance. *Genetic Resources Unit Annual Report 1992, ICARDA*, pp. 45-46.
- De Moraes, P.L.R., Nhme, C.J., Alves, M.C., Teresa, M., Derbyshine, M.T., Cavaleiro, A.J., (2007).** Chemical composition of flavonoids and styrylpyrones ans the genetic variability of isozymes in natural populations of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). *Biochemical systematics and Ecology* 35: 233-244.
- Dekkers JCM., Hospital F.(2002).** The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations (Review) . *Natl . Rev . genet . 3 (1)*, P. 22-32.
- Eaglesl HA., Bariana HS., Ogonnaya FC.,Rebetzke GJ., Hollamby GJ., Henry RJ., Henschke PH., Carter M . (2001).** Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Aust . J . Agric. Res.* 52(11-12) ,p 1349-1356.
- Ellis M.H., Spielmeier W., Gale K.R., Rebetzke G.J., Richards R.A. (2002)** “Perfect” markers for the Rht-D1b dwarfing genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 105: 1038–1042
- FAO.(2016/2017).**Perspective alimentaires. Analyse des marches mondiales. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr> <http://fr.actualitix.com/pays/wld/ble-pays-producteurs.php>
- FAO.(2016/2017).** Perspective alimentaires. Statistiques du production du blé en Algérie <http://fr.actualitix.com/pays/dza/algerie-ble-production.php>
- Farooq, S. (1994).** Wild species germplasm: A vital source for creation of genetic variability. *IPGRI WANA Newsletter*, 4: 1-2.
- Farooq, S., Niazi, M.L.K., Iqbal, N. and Shah, T.M. (1989).** Salt tolerance potential of wild resources of the tribe *Triticeae*. II. Screening of species of genus *Aegilops*. *Plant and Soil*, 119: 255-260.

- Gallais, A., (2003).** Quantitative genetics and breeding methods in autopolyploid plants. INRA Editions, Paris, France, pp.
- Gallais. A (2011) :** « Méthodes de création de Variétés en Amélioration des Plantes » .*Quae* Edition. p280.
- Gallais. A (2013) :** Evolution des outils pour l'amélioration des plantes . De la Domestication a la Transgénèse . *Quae* Edition . p184.
- Gomez, OJ., Blair, MW., Frankow-Lindberg, BE., Gullberg, U.,(2004).** Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces From Nicaragua. *Crop Sci 44: 1412-141*
- Gorham, J. (1990).** Salt tolerance in the *Triticeae*: K/Na discrimination in *Aegilops* species. *J. Exp. Bot.,41: 615-621.*
- Gupta PK., Roy JK., Prasad M. (2001).** Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants [Review]. *Curr. Sci. 80* (4), p. 524–535.
- Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan HS (2003)** Transferable ESTSSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Molecular Genetics and Genomics 270: 315-323*
- Gupta PK., Varshney RK., Sharma PC., Ramesh B. (1999).** Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed. 118*, p. 369–390.
- Gupta, PK, Varshney, PK., (2000).** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica 113:163-185*
- Hamdi O., (2003).** Etude biochimique et génétique de la diversité des sous unités gluténines de huit espèces du genre *Aegilops*. Thèse de magistère. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Mentouri Constantine.
- Hammer K.,(1980).** Vorarbeiten zur monographischen Darstellung von wild planzeln Sortimenten: *Aegilops L.kulturplanze.*, **28: 33-180.**
- Harry. M., (2001).** Génétique moléculaire et évolutive. *Editions Maloine., Paris. p39.*
- Hartl, D.L. et Jones E.W. (2003).** Génétique. Les grands principes. *3é Edition. Dunod, Paris. 609p.*

- HERNANDEZ J.A.Z., SANTIVERI F., MICHELENA A. and PENA R.J. (2004).** Durum wheat (*Triticum turgidum* L.) carrying the 1BL/1RS chromosomal translocation : agronomic performance and quality characteristics under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* 30.
- Hospital F. (2001).** Size of donor chromosome segments around introgressed loci and reduction of linkage drag in marker-assisted backcross programs. *Genetics* 158 (3), p. 1363-1379.
- Ingvarson, PK., Garcia, MV., Luquez, V., Hall, D., Jansson, S., (2008).** Nucleotide polymorphism and phenotypic associations within and around the phytochrome B2 locus in European Aspen (*Populus tremula*, Salicaceae). *Genetics* 178: 2217-2226.
- J. Šafař et al.,** Development of chromosome-specific BAC resources for genomics of bread wheat. *Cytogenet. Genome Res.* 129, 211–223 (2010). *doi: 10.1159/000313072; pmid: 20501977*
- Johnson, B. L., 1975** Identification of the apparent B-genome donor of wheat. *Can. J. Genet. Cytol.* 17: 21-39.
- Kacem in Zouaoui I., (2016).** Sélection assistée par marqueur liée aux contraintes biotiques et abiotiques chez le blé dur. *Algérie, p 19.*
- Kerby K., Kuspira J., (1987).** The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat). *Genome*, 29, 722-737.
- Kihara, H. (1937).** Genomanalyse bei *Triticum* and *Aegilops*. VII. Kurze Übersicht über die Ergebnisse der Jahre 1934-36. (In German.) *Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ.* 41:1-61.
- Kihara, H. (1946).** Genomanalyse bei *Triticum* and *Aegilops*. IX Systematischer Aufbau der Gattung *Aegilops* auf genomanalytischer Grundlage. *Cytologia*, 14: 135-144.
- Kihara, H. (1954).** Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analysis-method. *Cytologia (Tokyo)* 19:336-357.
- Kimber, G. & Abu-Bakar, M. (1981).** The genomic relationships of *Triticum dichasians* and *T. umbellatum*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 87: 265-273.
- Kumar, J., R. Mir, N. Kumar, A. Kumar, A. Mohan, K. Prabhu, H. Balyan, and P. Gupta (2010).** Marker-assisted selection for pre-harvest sprouting tolerance and leaf rust resistance in bread wheat. *Plant Breed.* 129: 617-621.

Lagziel, A., S. DeNise, O. Hanotte, S. Dhara, V. Glazko, A. Broadhead, R. Davoli, V. Russo and M. Soller. (2000). Geographic and breed distribution of an Msp I PCRRFLP in bovine growth hormone (bGH) gene. *Animal Genetics*. 31 : 210-213.

Langridge P., Lagudah E., Holton TA., Appels R., Sharp PJ., Chalmers KJ. (2001). Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 52, 1043-1077.

Limin, A.E. and Fowler, D.B. (1981). Cold hardiness of some wild relatives of hexaploid wheat. *Can. J. Bot.*, 59: 572-573.

Marion S. Röder, Victor Korzun, Katja Wendehake, Jens Plaschke, Marie-Hélène Tixier, Philippe Leroy and Martin W. Ganal GENETICS August

Monneveux P, Zaharieva M et Rekika D. (2000). The utilisation of *Triticum* and *Aegilops* species for the improvement of durum wheat. *CIHEAM- options méditerranéennes*, pp 72-81.

Moreau L., Charcosset A., Gallais A. (2001). Efficiency of marker-assisted selection compared with conventional selection. *OCL-Ol. Corps Gras Lipides* 8 (5), p. 496-501.1, 1998 vol. 149 no. 4 2007-2023

Moule.C (1980) : Les céréales. *Ed. Maison rustique. Paris. 318p.*

Ollivier L., Chevalet C. et Fouley J.-L (2000). Utilisation des marqueurs pour la caractérisation des ressources génétiques. *INRA Prod. Anim.*, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et application aux populations animales », 247-252.

Ollivier L., Sancristobal M., Fouley J.L., Legault C., Laval G., Milan D., Caritez J.C., Burgaud G., Gruand J., Boscher M.Y., Amigues Y., Barret J., Hassenfratz C., Luquet Laboroue M., et Chevalet C. (2004). Analyse de la diversité de quelques races et lignées européennes. *Journées Recherche Porcine*. 36, 265-274.

Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., ... Feuillet, C. (2008). A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5898), 101-4. doi:10.1126/science.1161847.

Peterson G., Seberg O., Yde M., Berthelsen K., (2006). Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular and Phylogenetics and Evolution.*, 39: 70-82.

- Prat. D , Faivre Rampant. A , Prado. (2006)** : « Analyse du Génome et Gestion des ressources génétique forestières » . *INRA* Edition. p456
- Rafalski JA. (2002a)**. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches [Review]. *PlantSci.* 162(3), p. 329–333.
- Rafalski JA. (2002b)**. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics [Review]. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2), p. 94–100.
- Raskina O., Belyayev A et Nevo E. (2004)**. Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *PNAS.*,**101**: 14818-14823.
- Rayburn A.L and Gill B.S.,(1987)**. Molecular analyses of the D genome of Triticeae. *Theor. Appl. Genet.*, 73: 358-388.
- Rekika, D., Zaharieva, M., Stankova, P., Xu, X., Souyris, I. and Monneveux, P. (1998b)**. Abiotic stress tolerance in *Aegilops* species. In: *Durum Wheat SEWANA Workshop*, Nachit, M.M., Baum, M., Porceddu, E., Monneveux, P. and Picard, E. (eds). *ICARDA, Aleppo, Syria*, pp. 113-128.
- Riley R., Unrau. J, & Chapman V.(1958)**. Evidence on the origin of The B genome of wheat. *J.Heredity.*, 49:91-98.
- RODER, M. S., V. KORZUN, K. WENDEHAKE, J. PLASCHKE, M. H. TIXIER, P. LEROY, and M. W. GANAL. (1998)**. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007–2023.
- Rognon X. et Verrier E. (2007)**. Caractérisation et gestion des ressources génétiques. Les outils et méthodes de la génétique pour la caractérisation, le suivi et la gestion de la variabilité génétique des populations animales. UMR INRA/AgroParisTech « Génétique et Diversité Animales », Rabat, 12-15 mars 2007.
- Rosignol. J.L; Berger. R; Deutsch. .J; Fellous. M ; Lamour Isnard. O ; Ozier Kalageropoulos. O ; Picard. M et Devienne. D.N (2000)**: Génétique, Gènes et génomes. Dunod. Paris.p 229 .
- Rustenholz, C., Choulet, F., Laugier, C., Safár, J., Simková, H., Dolezel, J., ... Paux, E. (2011)**. A 3,000-loci transcription map of chromosome 3B unravels the structural and functional features of gene islands in hexaploid wheat. *Plant Physiology*, 157(4), 1596 -1608. doi:10.1104/pp.111.183921

Rustenholz, C., Hedley, P. E., Morris, J., Choulet, F., Feuillet, C., Waugh, R., & Paux, E. (2010). *Specific patterns of gene space organisation revealed in wheat by using the combination of barley and wheat genomic resources.* (Vol. 11). Consulté à l'adresse

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3019236&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Santoni S., Faivre- Rampant P., Prado E. et Prat D. (2000). Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cah. Agri.* 9(4): 3311-3327.

Sarkar, P., and G. L. Stebbins, (1956). Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Amer. J. Bot.* **43**: 297-304.

sequence-based microsatellite markers and placement in the physical and genetic maps of soybean. *Theoretical and Applied Genetics* **114**: 1081-1090.

Serre J.L., (2006). Génétique des populations. *Edition Dunos, Paris.p56.*

Sharma PC, Grover A, Kahl G (2007). Mining microsatellites in eukaryotic genomes. *Trends in Biotechnology* **25**: 490-498.

Sharma, C.H. (1999). Embryo rescue following wide crosses. In: **Hall, R.D.** (eds), *Methods in molecular biology*, vol. 111. Plant cell culture protocols. Human press Inc., Totowa, NJ. Pp. 293-307.

Shultz JL, Kazi S, Bashir R, Afzal JA, Lightfoot DA (2007) The development of BAC

Somers DJ and Isaac P (2004) SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium.

Somers DJ et al. (2004) A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 109:1105-1114.

Souilah N., (2005)- Contribution à l'étude de l'effet de la densité de peuplement sur les composantes de rendement chez deux génotypes de blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone humide (El-Harrouch). Mémoire d'ingénieur d'état en Agronomie. *Univ Skikda.* 61p.

Sourdille P et al. (2001) Improvement of the genetic maps of wheat using new microsatellite markers *Plant & Animal Genome IX Abstracts* 167.

- Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Kondo M, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Hirai M, Matsumoto S (2006)** Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics* **173**: 309-319.
- Toth, G., Gaspari, Z., et Jurka, J., (2000).** Microsatellites in different eukaryotic genomes :survey and analysis. *Genome Res.* (7): 967-81.
- Van Slageren MW., (1994).** Wild wheat: A monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopurum* (Jaub. & Spach.) Eig.(poaceae). Wageningen Agricultural University, International Center for Agricultural Research in the Dry Areas: Veenman Drukkers, Wageningen, 512pp.
- Waines, J.G., Rafi, M.M. and Ehdaie, B. (1993).** Yield components and transpiration efficiency in wild wheats. In: *Biodiversity and Wheat Improvement*, Damania A.B. (ed.). John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 173-186.
- Wang J.R., Yan Z.H., Jiang Q.T., Wie Y.M., Baum B.R., Zheng Y.L., (2007).** Sequence variation and molecular phylogenetic analyses of the HMW-GS genes from different genomes in Triticeae. *Biochemical Systematics and Ecology.*, **35**, 421-433.
- Yan Z.,Wan Y.,Liu K.,Zheng Y.,Wang D.,(2002).** Identification of a novel HMW glutenin subunit and comparison of its amino acid sequences with those of homologous subunits. *Chin Sci Bull.*,**47**:220-225.
- Zadri. F. (2009) :** Obtention d'hybrides F1 issus du croisement *Aegilops* X Blé dur (*Triticum durum* Desf) : Amélioration à la tolérance à la sécheresse. Thèse de magistère. Université Constantine. p 23-24.
- Zaharieva M, Monneveux P (2006)** Spontaneous hybridization between bread wheat (*Triticum aestivum*L.) and its wild relatives in Europe. *Crop Sci* **46**:512–527.
- Zaharieva M, Monneveux P, Henry M, Rivoal. R, Valkoun J, Nachit MM (2001)** Evaluation of a collection of wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth and identification of potential sources for useful traits. *Euphytica* **119**:33–38
- Zhang H., Reader S.M., Liu X., Jia J.Z., Gale M.D. (2001).** Comparative genetic analysis of the *Aegilops longissima* and *Aegilops sharonensis* genomes with common wheat. *Theo. App. Genet*, **103**: 518-525.

Anonyme(2017):

- http://www.leconews.com/fr/actualites/nationale/agriculture/ecart-spectaculaire-entre-production-et-consommation-de-ble-17-03-2016-177023_291.php
- <http://www.planetoscope.com/cereales/191-production-mondiale-de-ble.html>
- <https://www.passioncereales.fr/dossier-thematique/les-c%C3%A9r%C3%A9ales-dans-le-monde-en-europe-et-en-france>

Annexes

Annexe 01 : Mode opératoire de la méthode CTAB**Préparation solution et tampon****a) Tampon CTAB 2X**

	Concentration finale	PM (g/mol)	1 litre	200ml	100ml
CTAB	2% (P/V)	364.45	20g	4g	2g
Tris de base	100mM	121.14	12.11g	2.42g	1.21g
Na₂EDTA	20mM	372.24	7.44g	1.49g	0.75g
NaCl	1.4M	58.44	81.8g	16.36g	8.18g
PVP 40	1% (P/V)		10g	2g	1g
H₂O up			Qsp 1 litre	Qsp 200ml	Qsp 100ml

- Commencer par dissoudre le CTAB à la chaleur (50°C) dans 800ml d'eau up, puis ajouter dans l'ordre les autres produits.
- Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCL 1M.
- Compléter le volume à 1 litre.
- Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120°C.
- Stocker à température ambiante.

a) Chloroforme /Alcool isoamylique (24 :1)

- Pour 25ml : Ajouter 24ml Chloroforme +1ml Alcool isoamylique.
- Pour 100ml : Ajouter 69ml Chloroforme + 4ml Alcool isoamylique

Conserver à température ambiante.

a) Solution lavage 1

	Concentration finale	PM (g/mol)	1 litre	100ml	50ml
Acétate d'ammonium	200 mM	82.03	16.46g	1.6g	0.8g
H₂O istillée			240ml	24ml	12ml
Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol					
Ethanol 100%	76%		760ml	76ml	38ml

b) Solution lavage 2

	Concentration finale	PM (g/mol)	1 litre	100ml	50ml
Acétate d'ammonium	10 mM	77.08	0.8g	0.08g	0.04g
H2o istillée			240ml	24ml	12ml
Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol					
Ethanol 100%	76%		760ml	76ml	38ml

Utilisez de l'éthanol 100% et non pas de 96%.

c) TE 1X (pH 8)

	Constatation finale	PM (g/mol)	1 litre	500ml	100ml
Tris de base	10 mM	121.14	1.21g	0.6g	0.12g
Na2 EDTA	1mM	372.24	0.38g	0.19g	0.04g
H2O up			Qsp 1 litre	Qsp 500ml	Qsp 100ml

- Ajouter de l'H2O up jusqu'à 90% du volume.
- Ajuster le PH à 8.0 avec l'HCL fumant.
- Compléter le volume.
- Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120°C.
- Stocker à température ambiante.

d) TE 0.1X (pH 8)

	Concentration finale	1 litre	500ml	100ml
TE 1X	0.1X	100ml	50ml	10ml
H2O up		Qsp 1 litre	Qsp 500ml	Qsp 100ml

- Ajouter de l'H2O up jusqu'à 90% du volume.
- Vérifier que le pH de la solution est à 0.8
- Compléter le volume.
- Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120°C.

- Stocker à température ambiante.

Annexe 02 : Composition de Mix 2x

Réactifs du Mix 2X	Quantité
Tampon 2X	2 μ l
DNtp	2 μ l
MgCl ₂	3.5 μ l
Taq	0.25 μ l
Solution S	1 μ l
H ₂ O	1.25 μ l

Annexe 03 : Préparation des gels d'Agarose.

Gel d'Agarose à 1 %

- 1.5 g Agar
- 100 ml TBE
- 2 μ l BET (Pour favoriser la révélation)

Gel d'Agarose à 2 %

- 7.5g Agar
- 300 ml TBE
- 6 μ l BET (Pour favoriser la révélation)

Annexe 04 : Voltage et Ampérage des gels.

⇒ Réglage pour gel 1

- Voltage = 135V
- Ampérage = 153mA (à 12h15)
- Ampérage = 177mA (à 14h38)

⇒ Réglage pour gel 2

- Voltage = 135V
- Ampérage = 150mA (à 16h15)

Annexe 05 : Les dilutions d'ADN

Les dilutions d'ADN sont faites selon ce tableau :

$$V_f = 50\mu l$$

$$C_1.V_1 = C_2.V_2 \quad V_1 = \frac{C_2.V_2}{C_1} = \frac{50 \times 50}{1232.9} = 2.03$$

$$H_2O = 50 - 2.03 = 47.29$$

Tableau : Quantités des ADN extraits et dilutions effectuées des génotypes étudiés.

Variétés	Concentration d'Acide Nucléique (ng/μl)	Quantité d'ADN à diluer (100 ng/μl)	H ₂ O qsp 50μl
<i>Aegilops geniculata</i>	1232,9	2,03	47,97
Oued Zenati	2408,5	1,04	48,96
<i>Chinese spring</i>	551,1	4,54	45,46
<i>Courtot</i>	1763,2	1,42	48,58
H 10	2116,5	1,18	48,82
H 1013	407,4	6,14	43,86
H 1022	1059,1	2,36	47,64
H 1032	2312,7	1,08	48,92
H 18	1078,5	2,32	47,68
H 1814	1622,9	1,54	48,46
H 1816	91,4	27,35	22,65
H 1817	1800,9	1,39	48,61
H 1818	907,2	2,76	47,24
H 1822	350,2	7,14	42,86

Annexe 06 : Les fiches techniques des réactifs de PCR et des marqueurs utilisés

Solis BioDyne
Data Sheet

FIREPol® DNA Polymerase

Cat. No.	Pack Size	Conc.
01-01-0000S	100 U SAMPLE	5 U/µl
01-01-00500	500 U	5 U/µl
01-01-01000	1000 U	5 U/µl
01-01-02000	2000 U	5 U/µl

For *in vitro* use only

Description:

FIREPol® is a highly processive, thermostable DNA polymerase. Due to its genetic modifications FIREPol® has an enhanced stability at room temperature with no activity loss for up to 1 month. The enzyme has 5'→3' polymerization-dependent exonuclease replacement activity but lacks 3'→5' exonuclease activity.

Source:

Purified from an *E.coli* strain that carries an overproducing plasmid containing a modified gene of *Thermus aquaticus* DNA Polymerase.

Applications:

- Suited for a wide range of PCR assays
- TA cloning

Reagents Provided:

- FIREPol® DNA Polymerase
- 10 x Reaction buffer B (Mg²⁺ free)
0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄, 0.2% w/v Tween-20
- 10 x Reaction buffer BD (Mg²⁺ and detergent free)
0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄
- 25 mM MgCl₂
- 10 x Solution S
Additive that facilitates amplification of difficult templates (e.g. GC-rich DNA templates). This solution should be used at a defined working concentration (1x, 2x or 3x solution).
Solution S is NOT a reaction buffer and should be used ONLY IF non-specific amplifications occur.

Concentration:

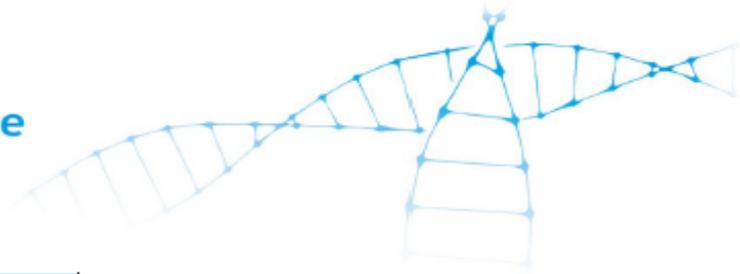
5 U/µl

Unit definition:

One unit is defined as the amount of enzyme required to catalyze the incorporation of 10 nmol of dNTPs into an acid-insoluble form in 30 minutes at 74°C.

Storage and Dilution buffer:

50% glycerol (v/v), 20 mM Tris-HCl pH 8.7 at 25°C, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA and stabilizers.

**Quality control:**

The enzyme is free of nicking and priming activities, exonucleases and non-specific endonucleases. SDS/PAGE - 95 kD band, >98% pure. Activity and stability tested via thermo-cycling. The error rate per nucleotide per cycle is ~ 2.5 x 10⁻⁶; the accuracy is ~ 4 x 10⁴. Estimated half life at 95°C is 1.5 hours.

Shipping and Storage conditions:

Routine storage: -20°C

Shipping and temporary storage for up to 1 month at room temperature has no detrimental effects on the quality of FIREPol® DNA Polymerase.

Recommended PCR reaction mix:

Component	Volume	Final conc.
FIREPol® DNA Polymerase (5 U/µl)	0.4-1.0 µl	0.02-0.05 U/µl (2-5 U)
10 x Buffer B or BD	10 µl	1x
25 mM MgCl ₂	6-10 µl	1.5-2.5 mM
20 mM dNTP mix	1 µl	200 µM
Primer Forward (10 pmol/µl)	1-3 µl	0.1-0.3 µM
Primer Reverse (10 pmol/µl)	1-3 µl	0.1-0.3 µM
DNA template	5-20 µl	5-100 ng/µl
10 x Solution S Not for standard PCR	0, 10, 20 or 30 µl	1x, 2x or 3x
H ₂ O PCR grade	Up to 100 µl	
Total	100 µl	

Recommended PCR cycles:

Cycle step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	95°C	3-5 min	1
Denaturation	95°C	30-60 s	26-35
Annealing	50-68°C	30-60 s	
Elongation	72°C	1-4 min	
Final elongation	72°C	5-10 min	1

IMPORTANT: Annealing temperature should be 2-6°C lower than the primer melting temperature. Elongation time should be ~1 min/1 kb.

Safety warnings and precautions:

This product and its components should be handled only by persons trained in laboratory techniques. It is advisable to wear suitable protective clothing, such as laboratory overalls, gloves and safety glasses. Care should be taken to avoid contact with skin or eyes. In case of contact with skin or eyes, wash immediately with water.

Some applications this product is used in may require a license which is not provided by the purchase of this product. Users should obtain the license if required.

Solis BioDyne

Riia 185a, 51014 Tartu, Estonia, tel: +372 740 9960, fax: +372 740 2079, e-mail: solis@sbd.ee, www.sbd.ee

**thermo
scientific**

PRODUCT INFORMATION

Thermo Scientific

**O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder,
ready-to-use**

Pub. No. MAN0013033
Rev. Date 30 November 2016 (Rev. B.00)

Lot: _ Expiry Date: _

Components	#SM1163
O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, 0.1 µg/µL	250 (5 × 50) µg (for 500 applications)
6X Orange DNA Loading Dye	2 × 1 mL

Store: at room temperature or at 4°C for periods up to 6 months. For longer periods store at -20°C.

www.thermofisher.com

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Description

Thermo Scientific™ O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to-use, is designed for sizing and approximate quantification of wide range double-stranded DNA fragments on agarose gel. The ladder is composed of fourteen chromatography-purified individual DNA (in base pairs): 10000, 8000, **6000**, 5000, 4000, 3500, **3000**, 2500, 2000, 1500, **1000**, 750, 500, 250. It contains three reference bands (6000, 3000 and 1000 bp) for easy orientation.

The ladder is ready to use – it is premixed with 6X Orange DNA Loading Dye for direct loading on gel.

Storage and Loading Buffer

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM EDTA, 0.025% orange G, 0.005% xylene cyanol FF and 10% glycerol.

6X Orange DNA Loading Dye

10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.15% orange G, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol and 60 mM EDTA.

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Well-defined bands are formed during agarose gel electrophoresis.

The absence of nucleases is confirmed by a direct nuclease activity assay.

Quality authorized by:  Jurgita Zilinskiene

Rev.9



Protocol for Loading

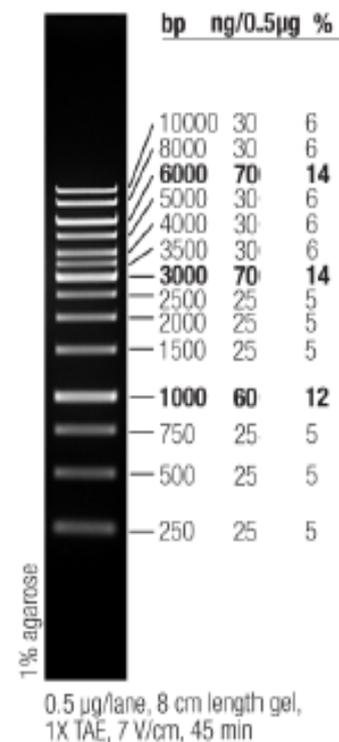
Step 1: Mix gently

Step 2: Load 1 µL per 1 mm gel lane

Recommendations

- Do not heat before loading.
- Dilute your DNA sample with the 6X Orange DNA Loading Dye (#R0631, supplied with the ladder): mix 1 volume of the dye solution with 5 volumes of the DNA sample;
- Load the same volumes of the DNA sample and the DNA ladder;
- For quantification, adjust the concentration of the sample to equalize it approximately with the amount of DNA in the nearest band of the ladder.
- For DNA band visualization with SYBR™ Green and other intercalating dyes, do not add the dyes into the sample, use gel staining after electrophoresis or include dyes into agarose gel to avoid aberrant DNA migration.
- **Important note:** For DNA bands visualization with GelRed™ use gel staining after electrophoresis to avoid aberrant DNA migration.

O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use



LIMITED USE LABEL LICENSE: Internal Research and Development Use Only.

The purchase of this product conveys to the buyer the limited, non-exclusive, non-transferable right (without the right to resell, repackage, or further sublicense) to use this product for internal research and development purposes. No other license is granted to the buyer whether expressly, by implication, by estoppel or otherwise. In particular, the purchase of the product does not include or carry any right or license to use, develop, or otherwise exploit this product commercially and no rights are conveyed to the buyer to use the product or components of the product for purposes including but not limited to provision of services to a third party, generation of commercial databases or clinical diagnostics. This product is sold pursuant to authorization from Thermo Fisher Scientific and Thermo Fisher Scientific reserves all other rights. For information on purchasing a license for uses other than internal research and development purposes, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing, Life Technologies Inc., 5781 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

PRODUCT USE LIMITATION

This product is developed, designed and sold exclusively for research purposes and in vitro use only. The product was not tested for use in diagnostics or for drug development, nor is it suitable for administration to humans or animals.

Please refer to www.thermofisher.com for Material Safety Data Sheet of the product.

© 2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries.



Blomatik

Tel: (519) 489-7195, (800) 836-8089

Fax: (519) 231-0140, (877) 221-3515

Email: Info@blomatik.com

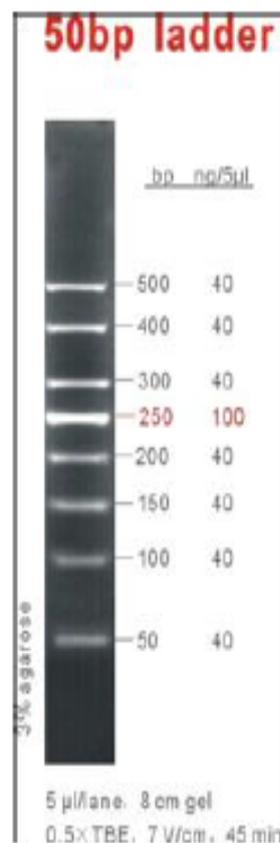
<http://www.blomatik.com>

Product Information

Version 6.2, Revision 2015-01-21

50bp DNA Ladder, Quantitative, Ready to Use

Code-Size:	M7507-100 Loads (500µl), M7507-5x100 Loads (5x500µl)
Contents:	8 DNA Fragments (bp): 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, and 500
Concentration:	380ng/5µl
Band Concentration:	250bp Band: 100ng/5µl; Other Bands: 40ng/5µl



Description:

50bp DNA Ladder (Quantitative) is ideal for determining the size of double-stranded DNA from 50 to 500 base pairs. The ladder consists of 8 linear double-stranded DNA fragments, chromatography-purified. The intensity of the 250bp has been increased to serve as a reference for easy identification. All fragments are precisely quantified and mixed during the production. For 5µl loading, all fragments except 250bp are at 40ng. The 250bp fragment is at 100ng. This ladder is pre-mixed with loading dye and is ready to use.

Recommended Loading: 5µl/Lane.

Add 5µl ladder directly to each well. You may need more or less than 5µl of ladder, depending on well size and level of intensity needed to visualize the bands.

Recommended Electrophoresis Condition:

5µl/Lane, 8 cm 3 % Agarose Gel, 0.5xTBE, 5V/cm, 1h.

Storage: 1 year at room temperature; for long term storage, please keep at -20 °C.

Important Notes:

Do not heat before loading.

For quantification, adjust the concentration of the sample to equalize.

Visualize DNA by staining with ethidium bromide or with SYBR Green I.

This material is for laboratory research purpose and/or in vitro use only and is not to be used in humans or animals.

Année universitaire : 2016/2017

Présenté par : BOULAHROUF Sara
MERDJANA Nessrine

UTILISATION DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES LIÉS AUX GÈNES CIBLES: UNE NOUVELLE APPROCHE POUR AMÉLIORER LES STRATÉGIES DE SÉLECTION DU BLÉ DUR (*TRITICUM DURUM* DESF.)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en biologie et génomique végétale

Les marqueurs moléculaires directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'amélioration des plantes. Parmi les marqueurs moléculaires, les microsatellites ou SSRs sont réputés être les plus performants pour des analyses de diversité dans de vastes collections de blé.

L'objectif de Cette étude est basé sur la recherche de variabilité génétique au sein de 10 lignées recombinantes issues de croisement interspécifique *Triticum durum* Desf. (Var. Oued Zenati 368) × *Aegilops geniculata* Roth., en utilisant des marqueurs moléculaires de type SSR (Simple Sequence Repeat) ou microsatellites, l'ensemble est ainsi comparé avec deux variétés de blé tendre (*Chinese spring* et *Courtot*) très utilisées en cartographie du génome de blé. Ce travail a été réalisé au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale, université des Frères Mentouri Constantine. Au cours de cette étude on a consacré la première partie à la recherche des amorces les plus polymorphes et les bien réparties sur les chromosomes 1A, 1B, 3A, 3B, 6A et 6B du génome de blé et ceci à partir de la base de données Graingene disponible sur Internet. A la deuxième partie de cette étude on a testé les 15 marqueurs SSR sélectionnés sur 14 individus. En effet, les hybrides ont hérité plus de caractères ou d'allèles du parent cultivé (variété Oued Zenati 368) que l'espèce sauvage *Aegilops geniculata* Roth. Il est à signaler que les SSR ciblés sur les chromosomes 1A, 1B, 3A, 3B, 6A et 6B sont polymorphes car sur un nombre total de 51 amplifiats, 35 sont polymorphes. Ce large spectre de polymorphisme peut être exploité pour la recherche des QTLs et leur utilisation dans la sélection assistée par marqueurs des blés cultivés.

Mots clés : Blé, *Aegilops geniculata*, locus, microsatellites et polymorphisme.

Laboratoire de recherche : Génétique biochimie et Biotechnologie Végétale

Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Constantine 1.

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme. BOUSBA Ratiba MCA. Université Frères Mentouri Constantine

Rapporteur : Mr. KELLOU Kamel MAA. Université Frères Mentouri Constantine

Examineur : Mlle. MOUELLEF Adra MAA. Université Frères Mentouri Constantine

Date de soutenance : 19/06/2017