



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
1
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : *Biotechnologie et Génomique Végétal*

Intitulé :

Caractérisation moléculaire et étude du polymorphisme génétique chez le blé

Présenté et soutenu par : *HOUMER Bouchra*

Le : 07/07/2021

Jury d'évaluation

Présidente du jury : *KACEM Sandra Nadia* (Maitre de conférence B).

Encadrant : *BOUSBAA Ratiba* (Maitre de conférence A).

Examinatrice : *BOUCHEMAL Karima* (Maitre de conférence B).

*Année universitaire
2020 - 2021*

Dédicace

A ma très chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher père

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A toi ma grand-mère ACEF Kelthoum,

Ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce travail soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A mes très chers frères Imed, Chouaib, Sofiane, Hichem, Mounder et Adim Lotfi qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite.

A mes belles sœurs, ma tante Zina et mes chers cousins Khouala, Imen et Anis.

A une Brave personne qui a été toujours là pour moi.

Remerciement

Je remercie Dieu, pour sa Bonté et sa bénédiction, les quelles ont été d'un soutien moral et une source d'inspiration et de lucidité pour l'accomplissement de mon travail.

Je voudrais remercier Docteur BOUSBA Ratiba, Maitre de conférence A à l'Université des Frères Mentouri Constantine. De m'avoir facilité le travail dans la réalisation de ce projet, pour son encadrement, ses capacités scientifiques et ses compétences étaient mon grand support. Faire mon projet sous sa direction était pour moi un grand honneur et un immense bonheur.sa gentillesse dans les moments difficiles, et surtout pour m'avoir confié ce sujet.

Je tiens à exprimer ma gratitude et mes remerciements à KACEM Sandra Nadia Maitre de conférences B à l'Université des Frères Mentouri Constantine. Pour avoir accepté de faire partie des membres de jury.

Je tiens à remercier tout particulièrement Mme BOUCHEMAL Karima Maitre de conférences B à l'Université des Frères Mentouri Constantine. Pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Mes Enseignants de la spécialité Biotechnologie et Génomique Végétale pour leurs pertinence, patience et disponibilité en qualité d'enseignants d'une abnégation inouïe.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Résumé

Les ressources phytogénétiques constituent la base biologique de la sécurité alimentaire mondiale. Les diverses espèces locales et la diversité génétique qu'elles renferment jouent un rôle primordial dans le développement économique, social et culturel. Dans cette étude, quatre variétés de blé dur ont été choisies (améliorées, ancienne et introduites à savoir : Ain lahma, djenah khotifa, *Triticum dicoccum* et Waha. Dont l'objectif est d'évaluer les germoplasmes de blé dur en utilisant des marqueurs moléculaires de type SSRs, afin de sélectionner des accessions performantes pour le développement de ce secteur. Nos résultats montrent Un niveau élevé de polymorphisme généré par les amorces utilisées et chez l'ensemble des variétés étudiées. Un total de 51 bandes a été noté par toutes les amorces, le nombre élevé de 16 bandes a été donné par l'amorce WMC25. Ainsi que la variété locale Ain lahma et le blé emmer *Triticum dicoccum* ont été marqué par la présence d'un grand nombre de polymorphismes 17 et 13 allèles observés chez la variété Ain lahma et *Triticum dicoccum* respectivement, par rapport aux deux variétés waha et Djenah khotifa. Les amorces utilisées dans cette étude, sont choisies suivant leur fiabilité et leur polymorphisme. Ce sont des loci très informatifs de fait qu'ils montrent dans la même espèce un nombre élevé d'allèles.

Mots clés : Blé, Marqueurs moléculaires, diversité génétique, polymorphisme, SSR

Abstract

Plants' genetic resources are the biological basis for the global food security. The various local species and the genetic diversity contain and play an important role in economics, social and cultural development. In this study, four varieties of durum wheat were selected (improved, old and introduced): Ainlahma, djenah khotaifa, *Triticum dicocum* and Waha. The present work consists in evaluating durum wheat germplasm using SSRs molecular markers, with the objective of selecting efficient accessions for the development of this sector. Our results show a high level of polymorphism generated by the primers used and in all the varieties studied. A total of 51 bands were noted by all the primers, the high number of 16 bands was given by the primer WMC25. As well as the local variety Ain lahma and emmer's wheat *Triticum dicocum* were marked by the presence of a large number of polymorphisms, 17 alleles by the variety Ain lahma and 13 alleles by the variety *Triticum dicocum*, compared to the two varieties waha and Djnah khotifa . The primers used are chosen according to their reliability and polymorphism. These are very informative loci because they show in the same species a high number of alleles.

Key words: wheat, molecular markers, genetic diversity, polymorphism, SSR.

ملخص

الموارد الوراثية النباتية هي الأساس البيولوجي للأمن الغذائي العالمي. تلعب الأنواع المحلية المختلفة والتنوع الجيني الذي يحتويه دورًا أساسيًا في التنمية الاقتصادية والاجتماعية والثقافية. في هذه الدراسة تم اختيار أربعة أصناف من القمح الصلب (محسن، قديم، محلي) وهي: Waha, *Triticum dicoccum*, djenah khotifa, Ain lahma، والهدف منها تقييم البلازما الجرثومية للقمح الصلب باستخدام المؤشرات الجزيئية. اختيار المدخلات عالية الأداء لتطوير هذا القطاع. أظهرت نتائجنا مستوى عالٍ من تعدد الأشكال الناتج عن البادئات المستخدمة وفي جميع الأصناف المدروسة. من البادئة WMC25 وكذلك الصنف المحلي Ain lahma وزمر القمح *Triticum dicoccum* تميز بوجود عدد كبير من الأشكال 17 و 13 أليلات لوحظ في الصنفين Ain lahma و *Triticum dicoccum* إلى الصنفين Waha, djenah khotifa، تم اختيار SSRs المستخدمة في هذه الدراسة وفقاً لموثوقيتها وتعدد أشكالها. هذه المواقع مفيدة للغاية لأنها تظهر عددًا كبيرًا من الأليلات في نفس النوع.

الكلمات المفتاحية: القمح الصلب، مؤشرات جزيئية، التنوع الجيني، تعدد الأشكال، SSR

Liste des figures

Figure 1 Représentation schématique de l'histoire évolutive des espèces de Tritium et Aegilops. D'après Feuillet et al. (2008).	4
Figure 2 Evolution de la production mondiale de blé (dur et tendre) (CIC ; 2016).	5
Figure 3 les superficies emblavées et récoltées en blé dur (MADRP ; 2015)	6
Figure 4 : Le Rendement blé dur (q/ha) en Algérie ces cinq dernières années	7
Figure 5 évolution des importations algériennes de blé (tendre et dur) Source : élaboration propre à partir de données collectées à l'OAIC (Ammar ; 2014).	8
Figure 6 Un trait majeur de domestication : rachis fragile de T. diccoides (a) et rachis non fragile de T. dicoccum.	10
Figure 7 Triticum dicoccum Schuebl (Photo par Y.J. Jabbour)	13
Figure 8 Schéma représentant les diverses étapes de la réaction en chaîne de polymérisation de l'ADN (PCR) (Moulet et al. 2008)	26
Figure 9 Exemple d'un marqueur de type microsatellite SSR (Moulet et al. 2008)	27
Figure 10 Développement et application des microsatellites SSR (Varshney et al. 2005)	28
Figure 11 Pré-germination des graines des quatre variétés étudiées	31
Figure 12 Pré-germination des graines des quatre variétés étudiées	32
Figure 13 Etapes de l'Extraction de l'ADNg des quatre génotypes étudiés au CTAB	33
Figure 14 Dépôt d'un échantillon sur Nano drop	36
Figure 15 préparation pour déposer les échantillons sur deux gels	37
Figure 16 Protocole de préparation des deux gels d'électrophorèse	38
Figure 17 Dépôt des échantillons sur gel	38
Figure 18 Migration des échantillons par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%,40 mn à 100V.	39
Figure 19 Electrophorèse sur gel d'agarose à 2%,40mn à 100 V pour vérification de la qualité de l'ADNg extrait des quatre variétés étudiées avec le marqueur de taille 1K	39
Figure 20 Profil électrophorétique généré par les Amorceurs wmc25 wmc168 (les variétés : Ain lahma, T.dicoccum, Djnah khotifa, Waha,)	42
Figure 21 Profil électrophorétique généré par les Amorceurs wmc44 wmc161 (les variétés : Ain lahma, T.dicoccum, Djnah khotifa, Waha)	42

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Classification des techniques de marquage moléculaire _____	20
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des marqueurs moléculaires les plus utilisés pour l'étude de la diversité (Lamara ,2010) _____	21
Tableau 3 : Avantages et inconvénients des marqueurs SSR _____	25
Tableau 4 : Code et origines des variétés étudiées de blé dur _____	30
Tableau 5 : Noms de marqueurs SSR, leurs séquences et leurs températures. _____	34
Tableau 6 : Préparation de Mélange réactionnel (Mix) _____	35
Tableau 7 : Les tubes d'ADN dilués _____	35
Tableau 8 : ADN délié + H2O up _____	36
Tableau 9 : Présence (1) /Absence (0) des bandes qu'ont été réalisées pour l'amorce WMC 25 et WMC 168. _____	45
Tableau 10 : Présence (1) /Absence (0) des bandes qu'ont été réalisées pour l'amorce WMC 44 et WMC 161. _____	46
Tableau 11 : chromosomes des marqueurs _____	48

Listes des Annexes

Annexe 01: marqueur de taille 1 Kb

Annexe 02: système d'imagerie E-BOX VX2.

Liste des Abréviations

- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **BET** : Bromure d'Ethidium
- **CIC** : Conseil international des céréales
- **MADRP** : Ministère de l'Agriculture du développement rural et de la pêche
- **OAIC** : Office Algérien Interprofessionnel des Céréales
- **CPD** : Continuing Professional Development.
- **H2O up** : Eau distillée stérile ultra pure
- **I.T.G.C.** : Institut technique des grandes cultures.
- **ICARDA**: International Center for Agricultural Research in Dry Areas.
- **Mix** : Mix réactionnel de la PCR
- **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- **Ng/μl** : Nano gramme/microlitre
- **AFLP**: Amplified Fragment Length Polymorphism; Polymorphisme de longueur de fragments d'amplification
- **Amorce F** : Amorce Forward; Amorce sens.
- **Amorce R** : Amorce Reverse; Amorce anti-sens
- **CTAB**: Cetyl-Trimethyl Ammonium Bromide.
- **EDTA** : Éthylène Diamine Tétra-Acétique.
- **RAPD**: Randomly Amplified Polymorphic DNA; l'amplification aléatoire d'un ADN polymorphe.
- **RFLP**: Restriction Fragment Length Polymorphism; Polymorphisme de longueur de fragments de restriction
- **SSR**: Simple Sequence Repeat; Répétition de séquence simple ou Microsatellites.
- **SNP** : Polymorphisme nucléotidique
- **TBE** : Tris-Hcl, Boric acid et EDTA.
- **Kb** : kilobase
- **Pb** : Paire de bases.
- **ha** : Hectare.
- **qx** : Quintaux

Sommaire

Introduction.....	1
<i>Chapitre I</i>	1
<i>Synthèse Bibliographique</i>	1
I. Le blé.....	4
1-Origin et histoire.....	4
2- Production et importance.....	5
A l'échelle mondiale.....	5
A l'échelle de nationale.....	6
3- Evolution des importations et de la consommation céréalière en Algérie.....	7
4-Domestication, sélection et premières améliorations.....	8
5- Le blé est une série polyploïde.....	9
6- La contribution de l'archéologie.....	10
7- Importance économique et sanitaire.....	10
8- Rôle de la biotechnologie.....	11
II. Blé Emmer (<i>T. turgidum subsp. dicoccum</i>):.....	12
Caractérisation du <i>Triticum dicoccum</i>	13
III. La diversité biologique.....	14
1. La diversité génétique.....	14
2. Marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité génétique avec SSR :.....	14
3. Polymorphisme de l'ADN : les marqueurs biologiques.....	15
IV. Marqueurs moléculaires.....	15
1. Historique.....	15
2. Marqueurs moléculaires.....	16
3. Marqueurs morphologiques.....	16
4. Les marqueurs biochimiques.....	16
5. Marqueurs génétiques.....	16
6. Les caractéristiques d'un bon marqueur génétique.....	17
7. Le principe du marquage moléculaire.....	17
8. Marqueurs génétiques moléculaires.....	17
9. Les différents types de marqueurs moléculaires.....	18
V. Les principales sources de marqueurs moléculaires.....	19
1. Critères de classification.....	19
2. Marqueurs RFLP.....	21

3. Marqueurs RAPD.....	22
4. Marqueurs AFLP.....	22
5- Marqueurs minisatellites.....	22
6- Marqueurs SNP (Polymorphisme de simple nucléotide).....	23
7- Les marqueurs Microsatellites ou SSR.....	23
Technique PCR-SSR	26
Matériel et méthodes	30
I. Mise en place de l'essai.....	30
1. La stérilisation :	30
2. La Pré germination	31
3. Le repiquage	31
II. Caractérisation moléculaire.....	32
1. L'extraction de l'ADN génomique	32
2- Les amorces SSR utilisées	34
3- Les réactions d'amplification	34
4- Préparation des amorces.....	35
5- Les dilutions d'ADN	35
II. Quantification de l'ADN et contrôle de qualité	36
1. Quantification à l'aide du Nano drop :	36
3. Vérification des produits PCR et Visualisation des Résultats.....	37
4. Analyse des données.....	40
<i>Chapitre III</i>	41
<i>Résultats et discussions</i>	41
I. Analyse de la diversité et polymorphisme génétique.....	42
Conclusion et perspectives.....	51
References bibliographique	

Annexe

Introduction générale
Objectifs et contexte
du travail

Introduction

Les céréales occupent à l'échelle mondiale une place primordiale dans le système agricole. Les céréales sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine et animale (Slamaet al. 2005),

La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grain dont 95% sont produits par les cultures céréalières. Ces cultures céréalières sont la base des programmes de recherches agricoles et d'amélioration génétique. Le blé dur constitue la première ressource en alimentation humaine et la principale source de protéines, il fournit également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et de multiples applications industrielles. Le blé dur prend mondialement, la cinquième place après le blé tendre, le riz, le maïs et l'orge avec une production de plus de 30 millions de tonnes (Amokrane, 2001).

Le terme biodiversité est défini par la variabilité des organismes vivants de toutes origines y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie (Fontaubert et al. 1996). En agriculture, la biodiversité a été très largement enrichie par l'homme à partir d'espèces sauvages qu'il a domestiquées depuis la préhistoire. L'homme a ainsi créé des variétés pour les plantes. Il a sans cesse amélioré l'expression du patrimoine génétique des plantes cultivées pour leurs différents usages. (GNIS, 2006). La biodiversité est la base de l'agriculture, son maintien est indispensable à la production de denrées alimentaires et d'autres produits agricoles ainsi que les avantages qu'ils procurent à l'humanité, y compris la sécurité alimentaire, la nutrition et les moyens de subsistance (CDP, 2008).

Le blé d'Emmer cultivé, *Triticum turgidum* L. var. *dicoccum* (AABB, 2n/4x/28) est l'ancêtre du blé panifiable et du blé dur qui poussent dans la marge de la région méditerranéenne (PFLU'GER et al. 2001). L'emmer est considéré comme l'une des premières anciennes céréales cultivées. L'emmer cultivé a apporté un certain nombre de gènes importants dans le pool génétique du blé, comme la résistance à la tache foliaire *Septoria nodorum*, la résistance au puceron russe du blé et la résistance à la punaise verte.

Les marqueurs utilisés dans ce travail sont les microsatellites, grâce à leurs caractéristiques (neutralité sélective, hypervariabilité, codominance, et leurs reproductibilités) se révèlent être des outils de choix pour identifier et chercher un polymorphisme chez le blé.

Introduction générale

L'objectif de ce travail est d'évaluer les germoplasmes de blé dur en utilisant des marqueurs moléculaires de type SSRs , afin de sélectionner des accessions performantes pour le développement de ce secteur.

Chapitre I
Synthèse
Bibliographique

I. Le blé

1-Origine et histoire

Le blé est une céréale autogame appartenant au groupe des angiospermes monocotylédones, de la famille des Poaceae, tribu des Triticées et genre *Triticum*. Sont des herbacées annuelles produisant un fruit sec indéhiscent, le caryopse. Le blé dur (*Triticum durum*) est parmi les espèces les plus cultivées dans le monde et en Algérie.

Selon Mckee (1968), l'origine génétique du blé dur remonte au croisement entre deux espèces ancestrales *Triticum monococcum* et une graminée sauvage du nom *Aegilops speltoides*. Le blé dur *Triticum durum*, appelé ainsi en raison de la dureté de son grain. Le nombre chromosomique de base est de $2n = 4x = 28$, hérité du genre *Triticum monococcum* est désigné par A et celui dérivé de l'*Aegilops* est dénommé B, de sorte que *Triticum durum* a une garniture chromosomique désignée par AB (Figure.01). L'aire de distribution de cette espèce est le sud-ouest de l'Asie et les Balkans. Sa domestication, suite aux découvertes archéologiques, remonterait au VIIe millénaire avant JC. Il était cultivé comme mélange avec l'orge et l'engrain dans l'ancienne Egypte. (Mekhlouf,2009).

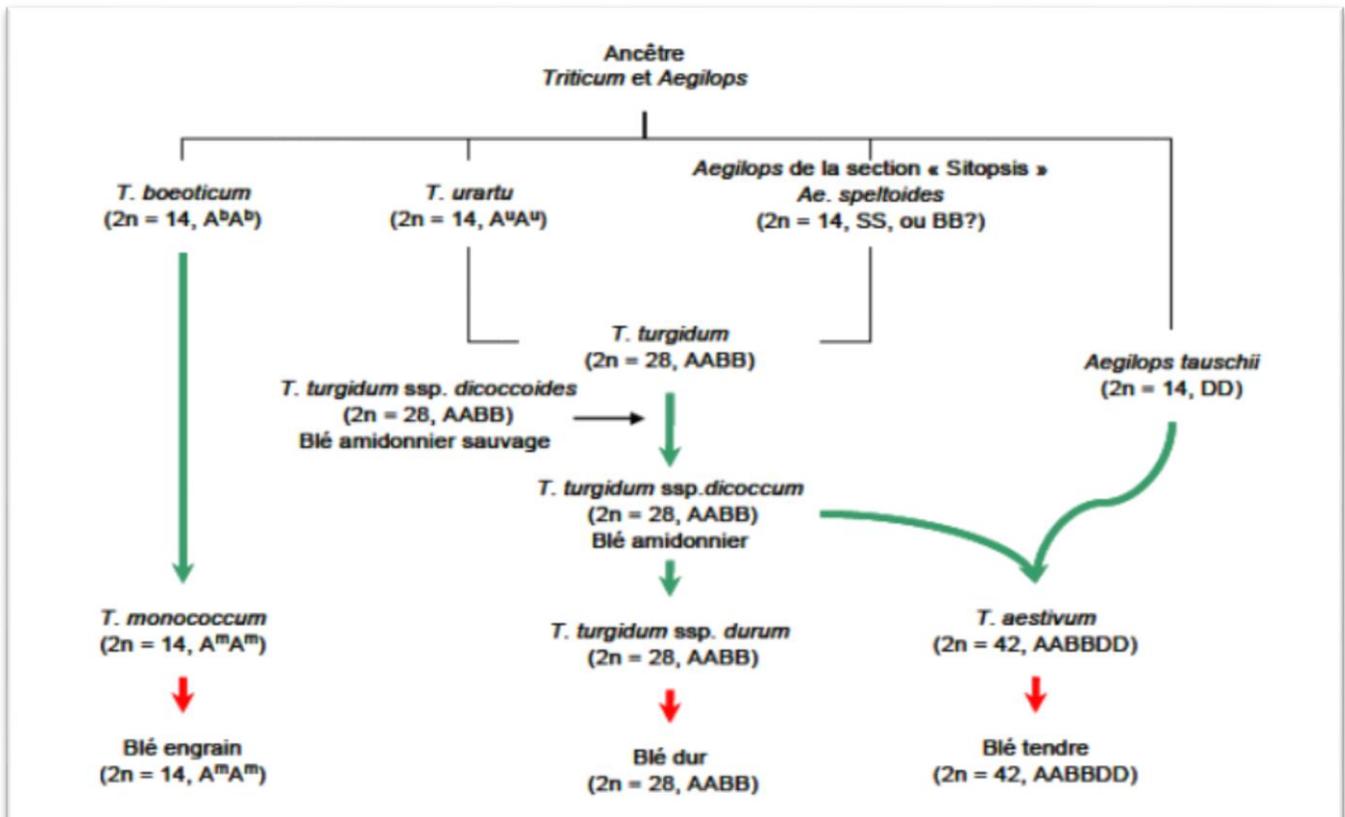


Figure 1 Représentation schématique de l'histoire évolutive des espèces de *Triticum* et *Aegilops*. D'après Feuillet et al. (2008).

2- Production et importance

A l'échelle mondiale

Depuis longtemps, les céréales, notamment le blé est devenu un produit de première nécessité à l'échelle mondiale. Son importance dépasse le rôle traditionnel considéré comme aliment, il a aujourd'hui, un rôle social, économique et politique dans la plupart des pays dans le monde.

La production mondiale de blé (blé tendre et blé dur) s'inscrit sur une pente croissante au cours de la dernière décennie et progresse de 14 %. Qui plus est, les trois dernières années ont enregistré trois records de production consécutifs (Figure.02). Expliqué par les efforts déployés en matière de techniques culturales et de sélection génétique, ce qui conduit à une amélioration significative des rendements (CIC ; 2016).

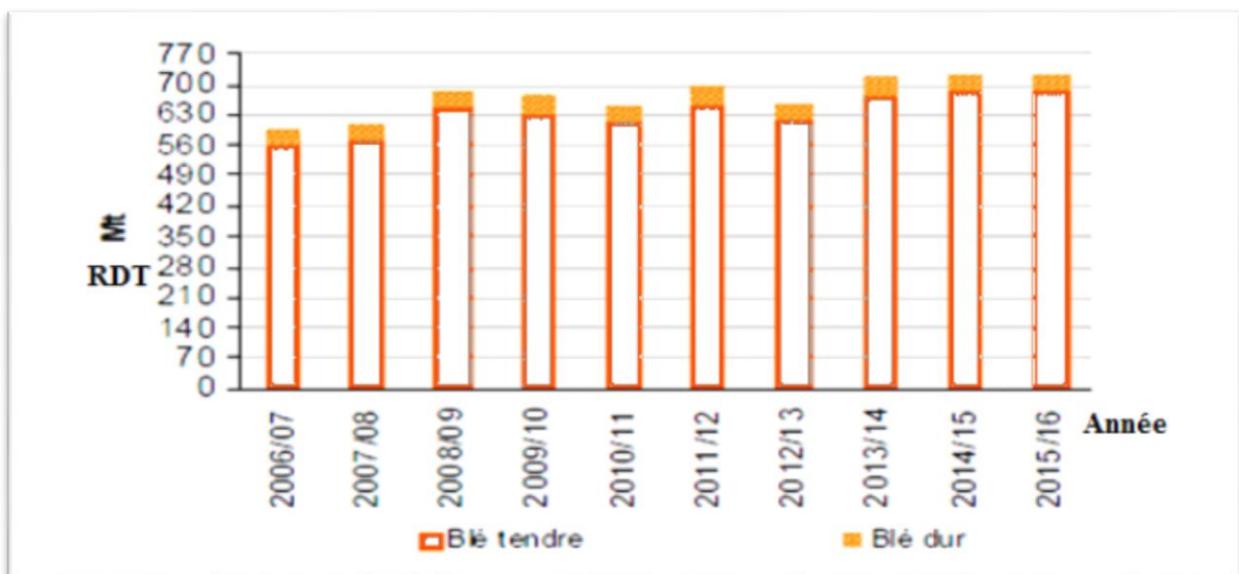


Figure 2 Evolution de la production mondiale de blé (dur et tendre) (CIC ; 2016).

En termes d'échanges commerciaux des céréales (import/export), l'Afrique s'accapare le quart des échanges mondiaux, dont plus de la moitié (55%) est destinée aux pays du Nord (Algérie, Maroc, Tunisie et Egypte). Les fournisseurs de ce continent sont essentiellement : l'Union Européenne, les Etats-Unis et le Canada. L'Algérie l'un des pays du Maghreb où la consommation des céréales notamment le blé demeure une base essentielle de l'alimentation, affiche une consommation élevée de blé avec une moyenne de consommation céréalière de 8

millions de tonnes par an dont plus de 5,5 millions tonnes de consommation de blé (Ammar ; 2014).

A l'échelle de nationale

La population algérienne est caractérisée par un mode alimentaire basé essentiellement sur la consommation des céréales sous toutes ses formes (pain, pâtes alimentaires, couscous, galettes de pain, etc.). Malgré l'amélioration des productions des céréales en général et du blé en particulier, le secteur agricole est souvent incapable de faire face à la croissance de la demande en blé. Cette croissance de demande est liée essentiellement aux changements des habitudes alimentaires et à l'élévation des niveaux de vie. Avec plus de 203 kg/personne et par ans, l'agriculture algérienne est structurellement inapte à satisfaire une demande de plus en plus importante (Bousard et al ; 2011).

Les superficies emblavées et récoltées en blé dur ont connu une augmentation de 2,4% et 10,05% respectivement en 2014/2015 comparativement à la campagne 2013/2014.

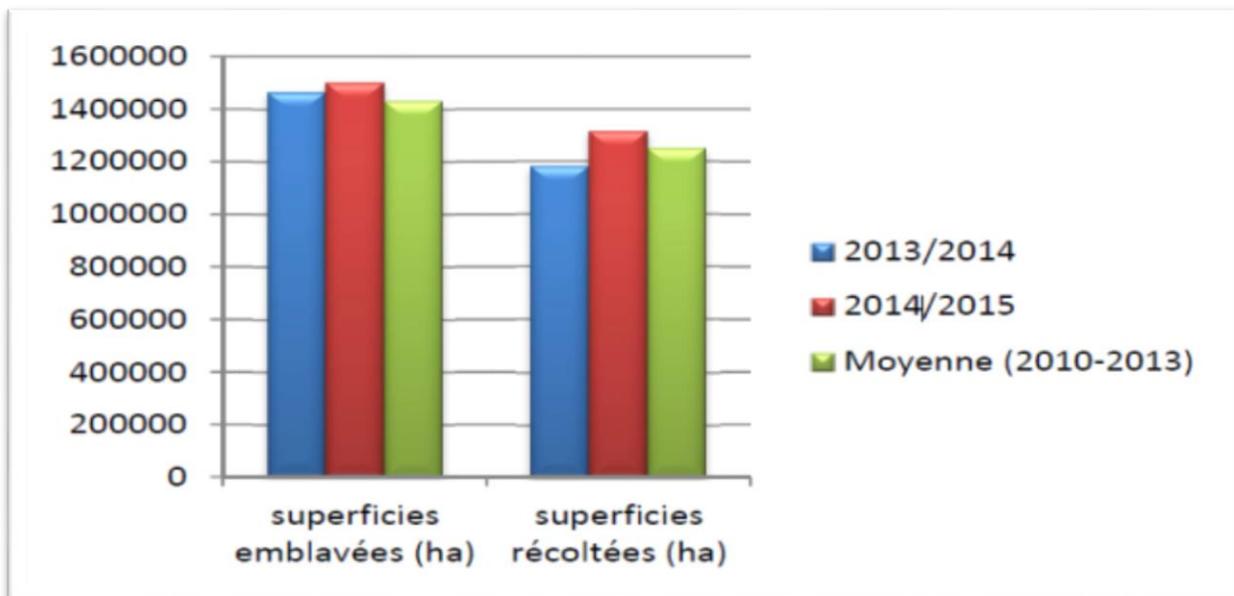


Figure 3 les superficies emblavées et récoltées en blé dur (MADRP ; 2015)

Les rendements en blé dur ont diminué de 1,2% en 2014/2015 (soit 15,4 q/ha) par rapport à la campagne précédente (soit 15,6q/ha). Depuis la production record qui a été enregistrée lors de la campagne 2008-2009 où il a été moissonné 61,2 millions de q. Cette dernière a chuté à 36 millions de q en 2015 (Figure.04). Les céréales restent en grande partie tributaire des conditions

climatiques qui n'ont pas été très favorables notamment en période critique qui s'étale entre le mois d'Avril et le mois de Mai.

Par ailleurs, devant cette tendance à la baisse de la production céréalière et l'impératif de réduire les volumes d'importations, notamment du blé dur et tendre, les pouvoirs publics ambitionnent d'augmenter progressivement la production céréalière pour la porter à 70 millions de quintaux en 2019. Cette progression devrait se réaliser à travers, notamment, l'extension des surfaces irriguées, l'intégration de la fertilisation, des semences certifiées et du renforcement de la mécanisation.

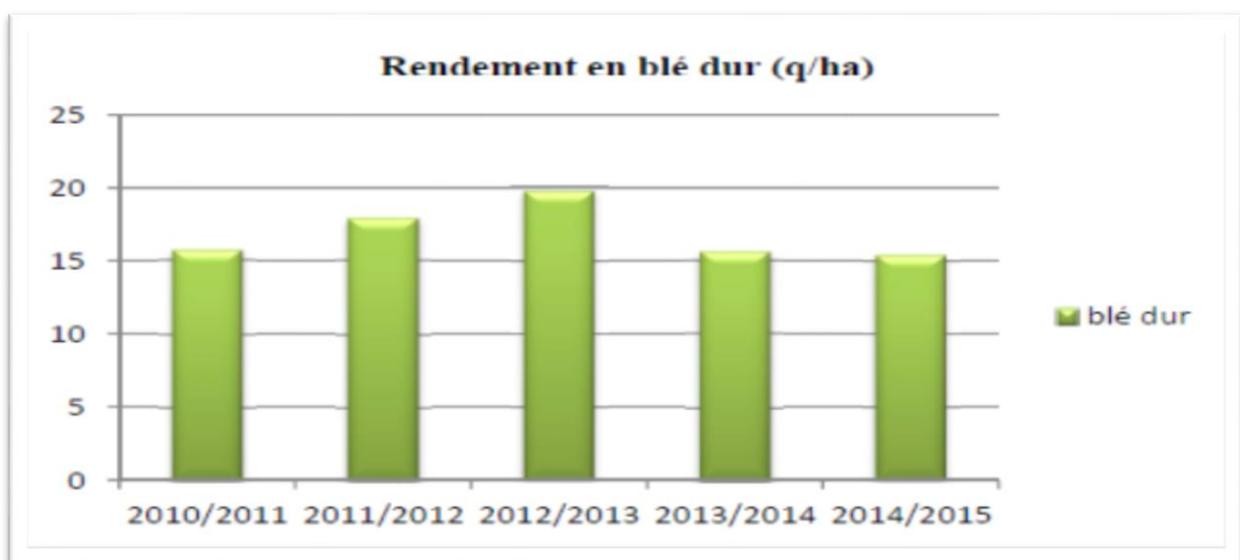


Figure 4 : Le Rendement blé dur (q/ha) en Algérie ces cinq dernières années

3- Evolution des importations et de la consommation céréalière en Algérie

L'Algérie est l'un des plus importants pays importateur de céréales avec une moyenne d'importation qui atteint 10 millions de tonnes, et le blé représente la moitié des importations. La consommation annuelle par habitant de céréales, bien qu'elle reste importante, a connu un recul ces dernières 40 années, (Figure.05) passant de 250 kg/an par habitant dans les années 70 à environ de 230 kg/an par habitant. La consommation animale des céréales est assurée essentiellement par l'orge et le maïs utilisés pour la fabrication des aliments de bétail et de ses dérivés. Les besoins de l'Algérie en céréales sont estimés à environ 8 millions de tonnes par an⁶. L'Algérie est l'un des premiers importateurs de blé au monde, notamment de blé tendre, la demande locale reste importante.

Dans les filières stratégiques telles que les céréales, l'augmentation de la production et des rendements est une priorité pour les pouvoirs publics afin de répondre à la demande croissante. Dans cette optique le défi pour la production algérienne de céréales est de hisser le rendement à l'hectare à au moins 30 quintaux/ha durant les cinq prochaines années contre 18 qx/ha en moyenne actuellement et 6 qx/ha en 1962 (Ammar ; 2014).

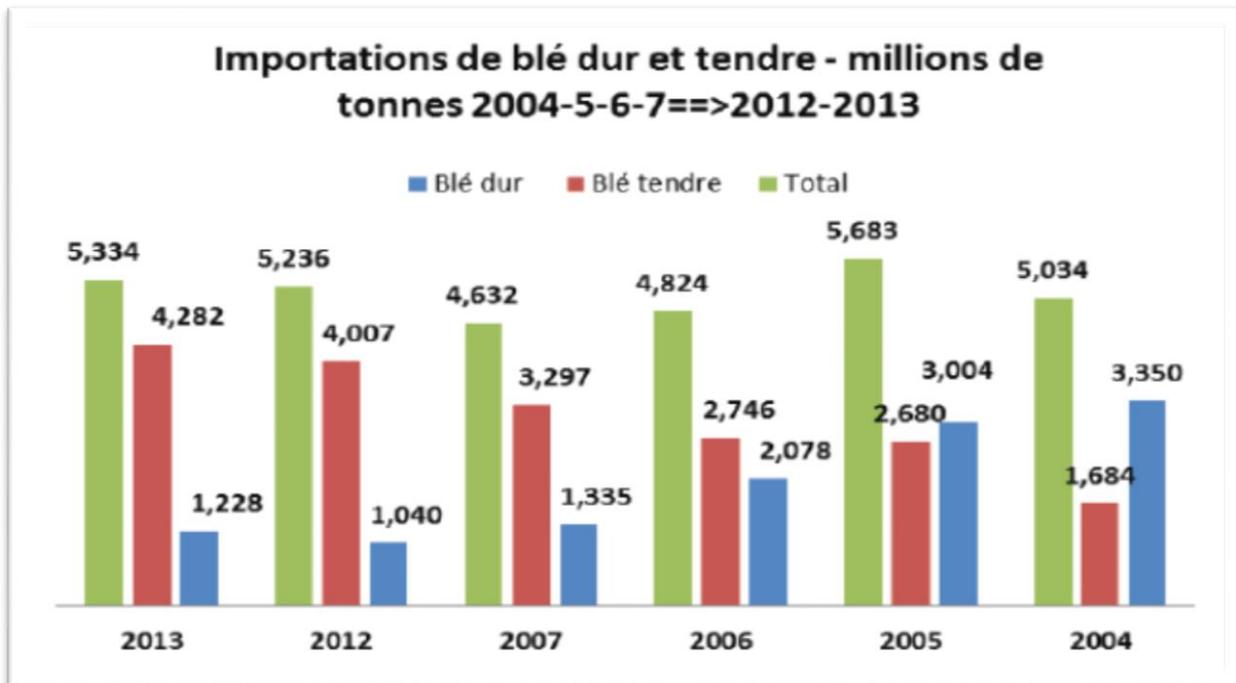


Figure 5 évolution des importations algériennes de blé (tendre et dur) Source : élaboration propre à partir de données collectées à l'OAIC (Ammar ; 2014).

4-Domestication, sélection et premières améliorations

Les modifications génétiques des espèces sauvages qui guident la gestion organisée de leur sélection et de leur reproduction peuvent être considérées comme une domestication des espèces. L'une des premières espèces domestiquées est l'épeautre. L'espèce s'est répandue en tant que culture domestique dans tout le Croissant fertile, puis dans les régions les plus proches comme le sud de la mer Caspienne ou en direction de la vallée du Nil, puis dans le monde entier, en particulier en Asie centrale et orientale et en Europe. À la même époque, les cultures étaient partagées entre les cultivateurs habitants et aussi avec les agriculteurs migrants transportant leurs récoltes. Le blé emmer a évolué à partir de l'emmer sauvage et a été domestiqué dans le Croissant fertile il y a environ 9 500 à 9 000 ans. Deux populations d'émeutiers sauvages se

trouvent dans le nord et le sud du Croissant fertile. Sur la base de l'analyse génétique et des variations microsatellites de l'ADN chloroplastique, on soupçonne que la population septentrionale de l'émeu sauvage (sud de la Turquie, Iran et Irak et certaines parties du Croissant fertile) est une véritable progéniture de l'émeu cultivé et que le lieu de leur domestication correspond au point focal où l'agriculture a commencé, la région de Karaganda dans le sud-est de la Turquie. La fragilité du rachis est le principal trait qui a été modifié par la domestication, ainsi l'épeautre cultivé à un rachis fragile qui permet de garder les épillets intacts sur l'épi jusqu'à la récolte manuelle. L'épeautre cultivé est plus facile à battre que l'épeautre sauvage, mais il ne peut toujours pas être battu librement, car il est également décortiqué. La culture de l'emmer s'est largement répandue à travers et au-delà du Proche-Orient. Elle s'est étendue vers l'est jusqu'en Inde et vers l'ouest à travers l'Anatolie jusqu'en Europe et dans la région de la côte méditerranéenne, et elle a été l'une des cultures les plus importantes dans ces régions pendant environ six mille ans. Le blé dur (*T. turgidum* subsp. *durum*) pourrait être dérivé du blé emmer domestiqué dans la région méditerranéenne orientale. Le blé persan pourrait être le résultat de la ségrégation d'un croisement hybride entre le blé emmer domestiqué et *T. aestivum*.

5- Le blé est une série polyploïde

Dès la fin du XIXe siècle, les premières études sur la biogéographie des plantes cultivées ont permis d'identifier des régions spécifiques appelées centres d'origine. Pour le blé, l'orge, le pois et la lentille, ce centre d'origine est situé dans le Croissant fertile, et plus particulièrement dans les régions montagneuses qui entourent les plaines alluviales fertiles du Tigre et de l'Euphrate. Les enseignements de la botanique, de l'archéologie et plus récemment de la génétique moléculaire ont fourni des idées plus élaborées et plus précises sur la géographie et la chronologie des différents événements, qui seront synthétisées dans le présent article. Le cas du blé est cependant beaucoup plus complexe que celui de l'orge ou du maïs puisque le genre *Triticum* est composé de plusieurs espèces avec différents niveaux de ploïdie, de 2 (14 chromosomes) à 6 (42 chromosomes).

L'ancêtre commun de la famille des graminées (*Poaceae*), avec cinq paires de chromosomes, a produit un ancêtre diploïde de la sous-tribu des *Triticeae* avec sept chromosomes. Le premier événement de polyploïdisation s'est produit entre 500 000 et 150 000 ans avant notre ère.

6- La contribution de l'archéologie

Les archéologues font des déductions à partir de la datation des restes fossilisés des cultures, principalement des céréales qui sont les plus facilement conservées. Les principaux sites archéologiques sont situés dans la vallée du Jourdain et la haute vallée du Tigre et de l'Euphrate, ainsi que dans les régions montagneuses du sud-est de la Turquie. Cependant, les sites archéologiques qui ont été découverts ne représentent peut-être qu'un petit échantillon biaisé des villages néolithiques existants, où la domestication aurait pu avoir lieu. En outre, la plupart des sites anciens ont connu une longue période d'occupation, parfois en plusieurs vagues, au cours de laquelle les types sauvages de grains de blé, d'orge, de lentille et de pois ont été progressivement remplacés par des formes domestiquées. Les différences morphologiques permettent de distinguer les rachis cassants (c'est-à-dire sauvages) des rachis non cassants (c'est-à-dire domestiqués), et les grains décortiqués des grains à battage libre (Figure 06).

Il est généralement difficile de différencier les restes de blé dur et de blé panifiable à battage libre.



Figure 6 Un trait majeur de domestication : rachis fragile de *T. diccoides* (a) et rachis non fragile de *T. dicoccum*.

7- Importance économique et sanitaire

L'intérêt pour les blés anciens et les variétés de meilleure qualité (concernant la nutrition) a augmenté dans certains pays, notamment en Allemagne. Le blé emmer peut être récolté dans des conditions environnementales modérées, telles que des sols pauvres et un manque d'eau, il est donc recommandé avec d'autres types de blés anciens pour la production biologique, où aucun engrais ou pesticide synthétique n'est utilisé pour soutenir la plante. Un autre avantage La motivation est

la production d'une nourriture saine, principalement des produits alimentaires à base de céréales complètes. Les chercheurs ont annoncé que l'un des moyens de réduire l'hypertension artérielle est de consommer des aliments à base de blé complet. Les produits à base de céréales complètes font généralement référence aux blés anciens, car ils jouent un rôle important dans la santé par rapport aux aliments à base de farine blanche. Les sélectionneurs essaient continuellement d'exploiter la diversité génétique pour trouver des génotypes riches en minéraux nécessaires à la nutrition des humains, car la plupart des nouvelles variétés de blé (contrairement aux blés anciens) sont nettement plus pauvres en minéraux, notamment en phosphore, magnésium, zinc, cuivre, sélénium, manganèse et fer. Le blé polonais, qui est planté dans de petites zones d'Europe, d'Asie et d'Afrique, en est un bon exemple et doit faire l'objet d'une considération exceptionnelle de ce point de vue. La valeur nutritive du blé polonais en concurrence avec le blé dur et le blé panifiable a été examinée.

8- Rôle de la biotechnologie

Dans les années 1990, l'augmentation de l'intérêt pour les produits naturels et biologiques a conduit à une " redécouverte " du blé mondé, qui présente des caractéristiques sanitaires associées à une forte résistance à l'amidon. De plus, il a la capacité de pousser à basse température, dans des sols à fertilité limitée, et utilise des techniques à faibles intrants. Elle est également une source de gènes pour la sélection du blé. L'intérêt porté à *Triticum dicoccum* a été d'évaluer le germoplasme disponible, de sélectionner des souches parmi les anciennes variétés locales et de développer de nouveaux génotypes par des croisements interspécifiques. Pour ces raisons, il est devenu intéressant de connaître la quantité de diversité existant à la fois entre et au sein des populations d'emmer. De nombreuses difficultés dans la récupération des plantes transgéniques et la livraison des gènes sont encore rencontrées dans la transformation du blé. En utilisant la méthode boulistique, a obtenu le premier blé transgénique résistant aux herbicides, puis la fréquence des essais s'est améliorée pour atteindre environ 16,7%. La qualité du grain de blé a été améliorée en modifiant les profils d'amidon et de protéines par l'application de méthodes transgéniques, qui complèteront la sélection végétale conventionnelle. Certaines particules, comme l'or, sont recouvertes de gènes cibles et injectées dans les cellules de blé par bombardement de particules ou de micro-projectiles, une technique de transfert de gènes largement utilisée pour le blé, a mentionné que l'expression transitoire du gène de la β -glucuronidase après le bombardement de suspensions cellulaires a été obtenue par la technique des particules biolistiques (comme vecteur de gènes). La transformation du blé médiée par *Agrobacterium* est une autre technique qui a connu

moins de succès que la technique biolistique. Les scientifiques ont amélioré l'efficacité et la répétabilité de la transformation du blé après avoir pris en compte les facteurs qui affectent la transformation médiée par *Agrobacterium*, et étendu les génotypes de blé. Ont fait référence aux tentatives réussies de transformation du blé par *Agrobacterium tumefaciens* en utilisant le blé *Triticum emmer*. Dicocum nommé (DDK1001, DDK1009).

II. Blé Emmer (*T. turgidum subsp. dicocum*) :

Triticum dicocum, le blé décortiqué, est l'une des plus anciennes espèces au monde. Au début du XXe siècle, des souches de blé à rendement plus élevé ont remplacé l'épeautre presque partout. Sa culture a été réduite à quelques milliers de mètres carrés dans les régions montagneuses d'Europe et d'Asie. Cependant, on constate un regain d'intérêt pour le blé dicocum, principalement de la part des producteurs et des consommateurs, en raison de sa meilleure valeur organoleptique et de ses avantages pour la santé par rapport aux autres espèces (Fares et autres, 2008). Il a été signalé comme étant organoleptiquement, nutritionnellement et thérapeutiquement supérieur par rapport au blé panifiable et au blé dur disponibles dans le commerce (Lachman et autres 2012 ; Hammed et Simsek 2014). C'était le blé le plus utilisé pour la fabrication du pain dans l'Égypte ancienne (Shewry 2009 ; Peng et autres 2011). En raison des bienfaits suggérés pour la santé et de son aptitude à l'agriculture biologique, le blé dicocum fait un retour en force. Le pain d'emmer est disponible en Suisse et en Italie, Il est riche en composés bioactifs, élevé en FD, et son amidon aurait une digestibilité lente (Mohan et Malleshi 2006 ; Lachman et autres 2012). Cependant, le contenu et la composition des composés bioactifs varient en fonction de l'emplacement géographique et des variétés.

Triticum dicocum a été étudié en particulier comme une céréale altérable à faible rendement qui convient aux zones marginales et à l'agriculture biologique en raison de sa grande résistance aux maladies, de ses faibles besoins en azote et en eau, et de sa grande capacité concurrentielle contre les mauvaises herbes par rapport à *T. aestivum* (Marino et autres 2009, Konvalina et autres 2012a, 2012b).



Figure 7 Triticum dicoccum Schuebl (Photo par Y.J. Jabbour)

Caractérisation du *Triticum dicoccum*

Blé tétraploïde, considéré comme l'une des premières anciennes céréales cultivées. Avec deux types d'habitude hiver et printemps, ont généralement une feuille pubescente, très dense et épis aplatis. Les épillets comprennent généralement deux fleurs et sont normalement aplatis. Les grains sont rouges ou blancs après avoir été battus ensemble dans les glumes. Ils sont petits et pointus aux deux extrémités (figure 07). En 1996, *Triticum dicoccum* a occupé seulement un pour cent de la superficie mondiale totale cultivée. L'émmer est cultivé dans certains pays et régions comme l'Éthiopie, l'Iran, l'est de la Turquie, l'Europe centrale, l'Italie, l'Espagne, la Transcaucasie, l'ex-Yougoslavie, le bassin de la Volga. L'émmer était autrefois cultivé aux États-Unis pour l'alimentation animale sur une superficie limitée, mais il a ensuite pratiquement disparu de la culture. En Éthiopie, l'émmer est toujours une culture essentielle, alors qu'elle est peu importante en Inde, en Italie et en Turquie. Le blé panifiable est né du croisement entre l'émmer cultivé (*Triticum dicoccum*, AABB) et l'herbe à chèvre (*Aegilops*). L'émmer cultivé a également apporté un certain nombre de gènes importants dans le pool génétique du blé, comme la résistance à la tache foliaire *Septrotrianodorum*, la résistance au puceron russe du blé et la résistance à la punaise verte.

Le blé emmer domestiqué (*T. turgidum ssp. dicoccum*, $2n = 4x = 28$, AABB) présente des caractéristiques primitives, par exemple un rachis relativement fragile et un mode de battage non libre. Sur la base des preuves biologiques et archéologiques, le blé emmer a été considéré comme le premier blé tétraploïde AABB domestiqué. Avec d'autres céréales domestiquées, comme le blé einkorn et l'orge, le blé emmer a joué un rôle majeur dans les débuts de l'agriculture et représente

une avancée importante dans la transformation vers un mode de vie agricole dans l'histoire de l'humanité.

III. La diversité biologique

La diversité biologique ou biodiversité désigne la variété des formes de vie comprenant les plantes, les animaux et les micro-organismes, les gènes qu'ils contiennent et les écosystèmes qu'ils forment. Elle englobe à la fois la diversité au sein des espèces (diversité génétique), entre les espèces (diversité d'espèces) et entre les écosystèmes (diversité d'écosystèmes) (Parizeau, 1997).

1. La diversité génétique

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité (Parizeau, 1997). C'est la diversité intraspécifique (polymorphisme génétique) qui représente le potentiel et la capacité à répondre aux changements environnementaux, à la fois sur le court terme (faculté d'adaptation) et sur le long terme (potentiel d'évolution). La richesse des espèces est la mesure d'évaluation de la biodiversité la plus largement utilisée (Lewin, 1992).

2. Marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité génétique avec SSR :

La valeur phénotypique d'un individu dépend du génotype (facteurs génétiques) mais aussi des conditions environnementales. La génétique quantitative a permis de modéliser la transmission génétique de caractères ayant une distribution quantitative. L'utilisation de marqueurs moléculaires liés aux facteurs génétiques contrôlant l'expression de caractères d'intérêt agronomique, et le développement de cartes génétiques à haute densité permettent d'accéder à des informations précises : le nombre et l'effet des gènes intervenant dans l'expression d'un caractère, leur localisation sur les chromosomes et leur mode d'action. Un marqueur moléculaire est un locus génétique qui renseigne sur le génotype de l'individu (utilisation en génétique des populations) ou sur le génotype des locus voisins (utilisation en sélection assistée par marqueurs). Il existe plusieurs types de marqueurs, que l'on peut classer en fonction du polymorphisme qu'ils détectent.

Ces marqueurs présentent l'avantage d'être indépendants à l'environnement d'où la possibilité de les caractériser à différents stades de développement de la plante. Ces marqueurs ont été aussi adoptés pour toutes les études de génétique des populations et d'écologie permettant l'analyse de la structure et du niveau de la diversité des populations; l'élaboration d'hypothèses sur le flux des gènes et la sélection des espèces. Les marqueurs moléculaires sont actuellement très utilisés pour la caractérisation des germplasmes et l'identification génétique des espèces en particulier dans le but de la traçabilité. (Haig, 1998)

3. Polymorphisme de l'ADN : les marqueurs biologiques

Pour répondre aux problèmes de la diversité dans le génome, il n'est pas suffisant de mesurer la diversité enzymatique. Les techniques issues de la biologie moléculaire permettent de rechercher des variations dans les séquences nucléotidiques de l'ADN (codant et non codant). Ces techniques sont de plus en plus utilisées pour étudier le fonctionnement génétique des populations. Cette variabilité peut être recherchée dans des régions codantes de l'ADN et non codantes qui composent la grande majorité des génomes (ADN non codant = 95% de l'ADN total des eucaryotes). Cette variabilité, qui n'est généralement pas exprimée au niveau phénotypique, est utilisée pour définir des marqueurs permettant soit de caractériser des individus (empreinte génétique ou finger print), soit de caractériser des populations, soit de cartographier des gènes. D'après Nevo, les estimations de la diversité moléculaire des microsatellites (short sequence repeats or SSR), des single nucléotides polymorphisme (SNP) et les comparaisons de séquences sont nettement plus fortes que la diversité enzymatique (Nevo, 2001).

Parmi l'ensemble des techniques disponibles, il faut distinguer celles qui permettent de mettre en évidence une variabilité dispersée dans tout le génome. Les marqueurs révélés sont alors multi locus et dominants. D'autres techniques permettent de révéler une variabilité à des endroits plus limités du génome. Les marqueurs sont qualifiés de monolocus et souvent Co dominants. (Hubert-Vincent, F. 2007).

IV. Marqueurs moléculaires

1. Historique

Historiquement, les premiers marqueurs disponibles ont été les marqueurs morphologiques. Chez les légumineuses, la couleur des fleurs chez la luzerne (*Medicago sativa*), le trèfle violet (*Trifolium pratense*) et le lotier cornicule (*Lotus corniculatus*), le nanisme chez la luzerne, le sens

d'enroulement des gousses chez *M.truncatula*, les taches foliaires chez le trèfle violet et chez *M.truncatula* servent de marqueurs. Puis les marqueurs biochimiques (ou isoenzymes) basés sur des différences de poids moléculaires de protéines ayant une activité enzymatique ont été mis au point. Ils ont l'avantage d'être codominants et l'inconvénient d'être peu nombreux (Julier et al., 2003). Durant les années 80, les marqueurs moléculaires (marqueurs génétiques) liés à l'ADN ont remplacé progressivement les marqueurs visuels ou enzymatiques. Ils offrent en effet plusieurs avantages : ils peuvent être utilisés tout le long de l'expérimentation et sont observable à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe (Vedele et Loudet, 2001).

2. Marqueurs moléculaires

Diverses techniques basées sur des empreintes ADN ont été utilisées, ces dernières années, pour mettre en évidence l'existence de différents allèles pour un locus donné.

3. Marqueurs morphologiques

Dans les programmes de sélection des plantes, les caractères morphologiques sont les premiers à être observés. Ces caractères intéressent diverses parties de la plante, par exemple longueur des tiges, surface foliaire, initiation de la floraison (Cui et al., 2001 ; Gomez et al., 2004). Ces caractères sont utilisés également pour estimer la variation intra et inter- populations. Ils sont généralement limités en nombre de caractères relevés et directement influencés par l'environnement. Néanmoins, ils fournissent des informations utiles pour décrire et identifier le matériel biologique (Andersson et al. 2006).

4. Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (Harry, 2001).

5. Marqueurs génétiques

On appelle un marqueur génétique tout marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme. L'analyse biochimique des protéines ou moléculaire du gène donne accès à des polymorphismes sans traduction perceptible à l'échelle morphologique ou physiologique et permet de percevoir, à cette échelle, un polymorphisme

génétique non perceptible à l'échelle de l'organisme (Serre, 2006). L'identification de formes de polymorphismes dans les espèces peut aider à comprendre leur distribution et leur évolution historique et aussi bien leurs mécanismes d'interaction et leurs coévolutions avec les autres espèces (De Moraes et al. 2007).

6. Les caractéristiques d'un bon marqueur génétique

Un marqueur génétique « idéal » doit être polymorphe (la matière première du généticien est la variabilité), multialléliques, codominants (l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes), non épistatique (son génotype peut être lu à partir de son phénotype quel que soit le génotype des autres locus), neutre (les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques), insensible au milieu (le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu) (De vienne, 1998).

7. Le principe du marquage moléculaire

Dans tous les cas, une méthode de marquage doit satisfaire deux objectifs : premièrement, cibler une ou plusieurs positions sur le génome, à laquelle on souhaite détecter du polymorphisme, c'est ce que l'on peut appeler la spécificité de locus, et deuxièmement, pouvoir ensuite distinguer les différentes séquences qui caractérisent les allèles a ce locus chez différents individus. (Gallais. A, 2013)

8. Marqueurs génétiques moléculaires

Les marqueurs moléculaires correspondent à des différences nucléotidiques existant au niveau de la molécule d'ADN (d'où le terme moléculaire), des techniques de biologie moléculaire permettent de révéler ce polymorphisme de séquences. Ces différences entre allèles peuvent correspondre à des mutations ponctuelles (substitutions, insertion, délétion), des réarrangements chromosomiques, ou des mutations silencieuses (sans effet sur l'expression du locus), comme elles peuvent se trouver dans des régions codantes ou non codantes. Les possibles variations tissulaires temporelles ou environnementales de l'expression des séquences sont sans effet sur leur détectabilité. Elles sont en majorité sans effet phénotypique (Samouelian et al., 2009). Les caractères moléculaires sont de bons marqueurs génétiques : ils révèlent directement la nature génétique de l'information. Ceci les différencie des caractères morphologiques, physiologiques et

plus généralement de tous les caractères phénotypiques, dus à une addition d'effets génétiques et non génétiques.

Cet aspect génétique leur confère un avantage du point de vue de la reconstruction de la phylogénie, par rapport aux caractères classiques utilisés en systématique.

9. Les différents types de marqueurs moléculaires

Il existe plusieurs types de marqueurs que l'on peut classer en fonction du polymorphisme qu'ils détectent. Certaines techniques ont l'avantage de révéler de nombreux fragments simultanément, ce sont des techniques de révélation en « en masse » de polymorphisme. Il existe aussi des stratégies permettant de détecter du polymorphisme de façon individuelle. Elles nécessitent une certaine connaissance de la séquence d'ADN, comme pour la fabrication des sondes RFLP.

Les marqueurs moléculaires se divisent en deux catégories, indépendamment de la technique utilisée, les marqueurs dominants et les marqueurs codominants (Falque et Santoni, 2004).

➤ Marqueurs dominants révélés en masse (marqueurs anonymes)

Les marqueurs révélés en masse sont très utilisés puisque ils permettent de découvrir de nombreux locus sans nécessiter au préalable de connaissance concernant la séquence du génome. De plus, ils sont faciles et rapides à mettre en œuvre. Outre les marqueurs AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), basés sur le polymorphisme de position de sites de restriction d'enzymes (Colwyn et al., 1995), les plus utilisées sont les marqueurs RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), sont basés sur l'amplification PCR à partir d'une amorce arbitraire, révélant ainsi un polymorphisme de séquence (Williams, et al., 1990 ; Vroh Bi et al., 1997).

Les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) peuvent détecter un polymorphisme de séquence lié à l'emplacement de sites de restriction et ils nécessitent des techniques d'hybridation de sondes (Bodstein et al., 1980).

➤ Marqueurs codominants révélés individuellement

Les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) peuvent détecter un polymorphisme de séquence lié à l'emplacement de sites de restriction et ils nécessitent des techniques d'hybridations de sondes (Bodstein et al., 1980). Alors que les marqueurs SSR (Short Sequence Repeat) renferment les deux catégories de marqueurs, selon la technique utilisée pour

leur révélation. Un autre type de marqueur appelé SNP (single Nucleotide Polymorphisme) vient d'être mis en point et permet de rechercher un polymorphisme d'un seul nucléotide.

➤ **Marqueurs révélés par la technique PCR**

Le développement de la technique « réaction chaîne polymérase » ou PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, isoenzymes et RFLP). Parmi les marqueurs moléculaires qui peuvent être révélés par la technique PCR, on note les SSR ou bien les microsatellites qui font l'objet de ce travail.

V. Les principales sources de marqueurs moléculaires

1. Critères de classification

Sur le plan moléculaire, on peut classer le polymorphisme en trois catégories : Le polymorphisme de séquence, d'insertion-délétion, et de nombre d'unités de répétitions dans les régions répétées (De vienne, 1998)(Tableau 01).

Tableau 1 : Classification des techniques de marquage moléculaire

Critère génétique	Critère moléculaire			
	Séquence (et insertion-délétion ^a)		Nombre de répétitions dans les ADN répétés	
	Différence recherchée	Technique	Taille de l'unité de répétition	Technique
Codominants et révélés individuellement	Site d'enzyme de restriction (ER)	- RFLP - PCR ciblée puis CAPS	1 à 4 nucléotides (microsatellites)	PCR ciblée puis électrophorèse en acrylamide ou agarose
	Conformation	PCR ciblée puis SSCP		
	Stabilité	PCR ciblée puis D/TGGE		
Dominants et révélés « en masse » (« empreintes génétiques »)	Site d'hybridation d'une amorce arbitraire	MAAP : - RAPD - AP-PCR - DAF	1 à 4 nucléotides (microsatellites)	ISSR (amorce microsatellite + quelques bases arbitraires)
	Sites ER et amorce arbitraire	- AFLP - tec MAAP	5 à > 100 nucléotides (minisatellites)	Southern avec sonde minisatellit

En dehors du cas particulier des ADN répétés (colonne de droite), il n'y a pas de technique spécifique pour révéler le polymorphisme d'insertion-délétion : celui-ci est mis en évidence par les techniques de révélation des différences de séquences. Lorsqu'un polymorphisme est observé, on ne peut donc savoir quelle est son origine sans expériences complémentaires. Sur le plan génétique, cette ambiguïté n'a aucune importance, l'essentiel étant d'avoir accès à des locus polymorphes, quelle que soit l'origine de ce polymorphisme.

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des marqueurs moléculaires les plus utilisés pour l'étude de la diversité (Lamara ,2010)

Caractéristiques	RFLP	SSR	RAPD	AFLP	SNP
Qualité d'ADN	haute	moyenne	haute	moyenne	haute
PCR	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Codominance	Oui	Oui	Non	Non	Oui
Type de polymorphisme	Insertion- délétion- substitution	Insertion	Plutôt substitution- quelque insertion	Plutôt substitution	Insertions, délétions, duplications, réarrangements
Polymorphisme mis en évidence	Elevé	Elevé	Très élevé	Très élevé	Très élevé
Facilité	Difficile	Facile	Facile	Facile	Facile
Automatisation	Faible	Grande	Grande	Moyenne	Grande
Reproductibilité	Grande	Elevé	Faible	Elevé	Elevé
Cout par analyse	Elevé	Faible	Faible	Moyen	Faible

2. Marqueurs RFLP

La technique RFLP consiste en la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Les fragments générés par digestion enzymatique de l'ADN de deux individus sont séparés selon leur taille sur gel d'agarose, dénaturés et transférés par capillarité sur une membrane de nylon. La position relative des fragments d'ADN est conservée durant le transfert. La dernière étape consiste en l'hybridation moléculaire avec une sonde d'ADN marquée préalablement. La sonde employée permet de détecter une région du génome où la digestion donne des fragments de restriction identiques pour les deux individus. Les deux profils révélés après électrophorèse ne permettent donc pas de les distinguer. Avec le couple enzyme/sonde, aucun polymorphisme n'est mis en évidence entre ces deux individus. En revanche, pour l'enzyme, un individu présente une mutation au niveau d'un site de restriction, entraînant la perte de ce site. Ainsi,

dans un second cas de figure, la digestion avec cette enzyme et l'emploi de la même sonde met en évidence un fragment plus petit chez un individu que chez l'autre. Dans ce cas, le couple enzyme/sonde permet ainsi de mettre à jour le polymorphisme existant au niveau des sites de restriction dans cette région du génome.

3. Marqueurs RAPD

Cette technique développée par Williams et al. (1990) repose sur l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 pb). Une amorce RAPD permet généralement l'amplification d'une dizaine de fragments. Les fragments produits par cette amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose. Pour deux individus, si deux sites d'hybridation sont proches et sur deux brins complémentaires d'ADN, il y aura amplification. En revanche, si ces deux sites sont trop éloignés, il ne peut y avoir amplification. Le polymorphisme décelé est dû à des mutations soit dans les régions amplifiées soit au niveau des sites de fixation des amorces. Le polymorphisme révélé est un polymorphisme de sites d'hybridation d'amorce traduit par la présence ou l'absence de la bande.

4. Marqueurs AFLP

Développée par Vos et al. (1995), cette technique fait appel à la fois aux enzymes de restriction et à l'amplification par PCR. Après la digestion de l'ADN génomique par deux enzymes de restriction, des adaptateurs de séquence connue et spécifiques des deux sites de restriction sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction. Une fois que les fragments de restriction sont ainsi bordés de séquences connues, il devient possible de les amplifier par PCR. Grâce à l'emploi d'amorces sélectives qui ne peuvent amplifier qu'une petite portion des milliers de fragments de restriction obtenus, seule une centaine de fragments est amplifiée. Ces fragments sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le polymorphisme révélé (de type présence ou absence de bandes) est provoqué par des changements dans les sites de restriction ou les régions bordantes.

5- Marqueurs minisatellites

Les minisatellites hypervariables (Jeffreys et al, 1985) sont des marqueurs moléculaires polymorphes découverts au niveau du génome. Ces marqueurs sont constitués des répétitions

en chaîne d'un motif formé de 15 à 70 nucléotides. Les minisatellites appartiennent à la classe des VNTR (Variable Number Tandem Repeat), et présentent un polymorphisme de taille dû à la variation d'unités de répétition qui les constituent.

6- Marqueurs SNP (Polymorphisme de simple nucléotide)

Les SNP sont des marqueurs moléculaires constituant la forme la plus abondante de variations génétiques dans les génomes. C'est un type de polymorphisme de l'ADN dans lequel deux chromosomes diffèrent sur un segment donné par une seule paire de bases. L'inconvénient des SNP est leur faible degré de polymorphisme par rapport aux microsatellites, ce qui implique de tester plus de SNP que de microsatellites pour avoir la même information.

7- Les marqueurs Microsatellites ou SSR

Dans l'étude du polymorphisme de l'ADN, l'outil le plus récent est celui qui fait appel aux microsatellites ou bien STR (Short Tandem Repeats), SSR (Short Sequence Repeat). Ce sont des motifs simples, constitués de quelques paires de bases répétées en tandem, montrant une variation de leur longueur. Ces marqueurs sont dispersés de façon assez dense sur l'ensemble du génome des Procaryotes et Eucaryotes (Weber et al., 1990 ; Field et Wills, 1996).

Ils permettent de détecter un polymorphisme de répétition, au sein du génome, de répétitions en tandem dont le motif de base est très court de 1 à 6 nucléotides. Ils sont très présents dans le génome des plantes et des animaux, 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 successive lors de la réplication, la recombinaison ou bien la réparation de l'ADN (Ingvarsson et al, 2008). Les microsatellites de 2 nucléotides sont répartis tous les 30 à 100 kb dans le génome des végétaux supérieurs (Peakell, et al, 1998), alors que les microsatellites de 4 nucléotides sont plutôt localisés au niveau des centromères et des télomères.

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).

Les marqueurs RFLP, nécessite une certaine technicité et un coût élevé, et limitent le nombre d'individus analysés, alors que les microsatellites permettent d'analyser des populations dix fois plus grandes que celles couramment utilisées avec les RFLP (Ribaut et al., 1997).

Ces marqueurs ont été très utiles pour des recherches concernant la diversité génétique chez l'orge (Struss et Plieske, 1998), la construction de cartes génétiques chez le pois chiche (Hüttel et al., 1999), le blé (Roder et al., 1998), le pommier (Maliepaard et al., 1997), la canne à sucre (Rae et al., 2000), le riz (Temnykh et al., 2000), le kiwi (Testolin et al., 2001) et le tournesol (Tang et al., 2002, 2003b ; Mokrani et al., 2002 ; Yu et al., 2002, 2003; Micic et al., 2005 ; Poormohammad et al., 2007).

On les a également utilisé dans l'identification de marqueurs liés à des gènes de résistance, comme le gène Yr15, conférant la résistance à la rouille chez le blé (Chargué et al., 1999)(Tableau 03).

Avantage des marqueurs SSRs :

- La méthode est relativement simple et peut être automatisée.
- La plupart des marqueurs sont monocus et montrent une hérédité Mendélienne.
- Les marqueurs SSR sont hautement informatifs.
- Un grand nombre des paires d'amorces SSR sont disponible.
- Rentable par génotype et amorce (similaire à ceux des RAPD).(Viktor Korzun, 2002)

Tableau 3 : Avantages et inconvénients des marqueurs SSR

Marqueur	Avantages	Inconvénients
SSR	<ul style="list-style-type: none"> - les microsatellites sont des marqueurs Co-dominants. - Ils sont très largement utilisés. - Il y a une grande fréquence de SSR dans le génome. - Les microsatellites sont bien répartis à travers tout le génome. - Ils sont reproductibles. - Les microsatellites sont faciles à manipuler. - On observe un polymorphisme élevé de SSR dans la population humaine. 	<p>la répartition des microsatellites est assez lourde car il faut cribler une banque génomique enrichie avec une sonde microsatellite, séquencer les clones positifs, synthétiser les amorces oligonucléotidiques et tester les paires d’amorces dans un échantillon d’individus.</p>

Technique PCR-SSR

Grâce à la technique PCR et l'automatisation de cette dernière, l'utilisation de ces marqueurs SSR a considérablement augmenté, ainsi que leur détection (Schlotterer, 2004) (Figure 08).

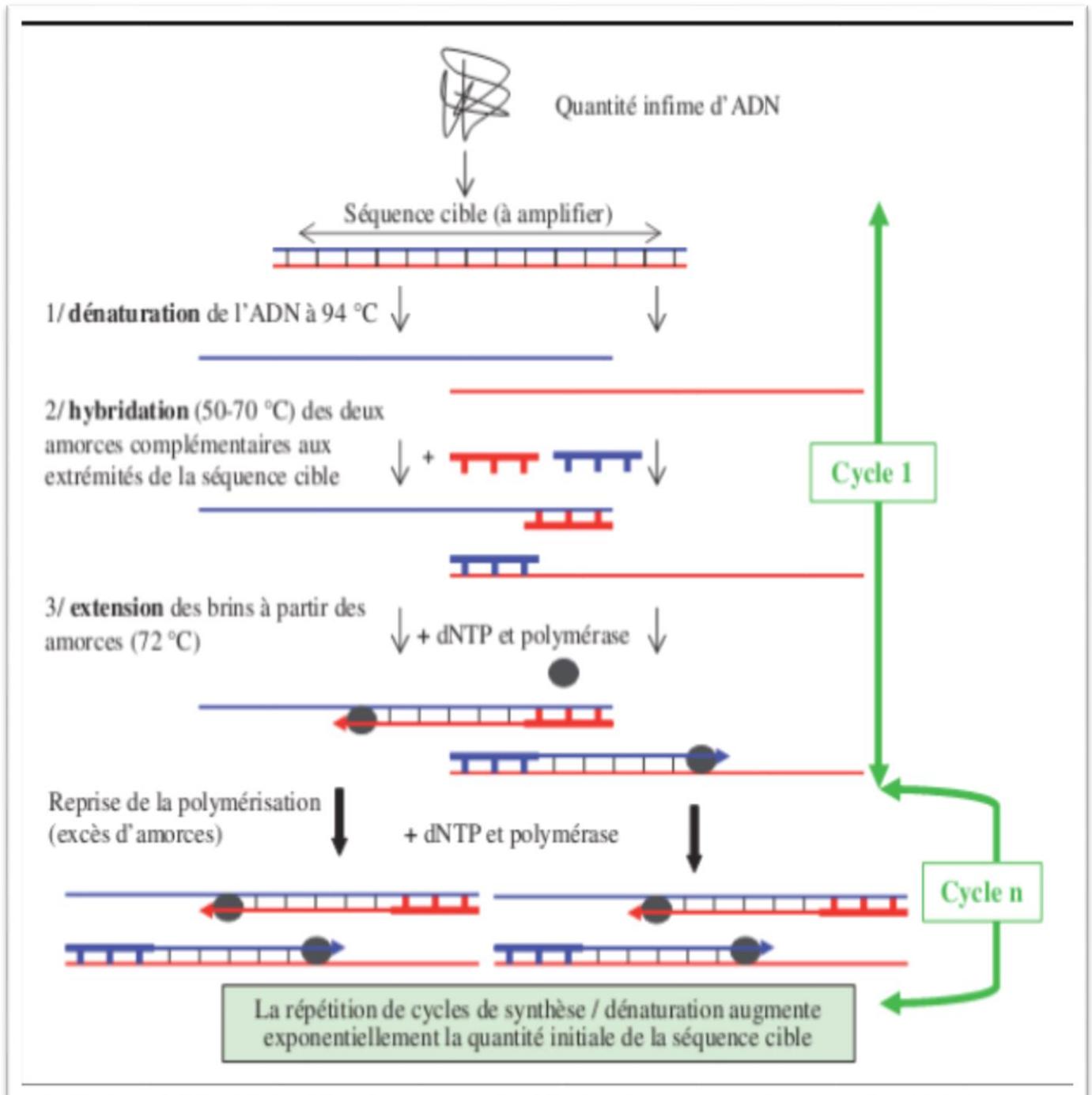


Figure 8 Schéma représentant les diverses étapes de la réaction en chaîne de polymérisation de l'ADN (PCR) (Moulet et al. 2008)

La plupart du temps, des polymorphismes de séquence sont révélés au sein d'un fragment d'ADN amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique total de l'individu à analyser, à l'aide d'une paire d'amorces spécifiques des extrémités de la région à étudier. La PCR, est basée sur l'utilisation d'une enzyme l'ADN polymérase thermorésistante.

Un très grand nombre de copies d'un fragment d'ADN est synthétisé si l'enzyme dispose de petits morceaux d'ADN simple brin (amorces) complémentaires des deux extrémités de la séquence que l'on veut copier. La réaction est rendue cyclique grâce à des variations de température, et chaque brin néoformé peut servir de matrice pour synthèse au cycle suivant. L'amplification de cette séquence est donc exponentielle.

Ces éléments sont uniformément répartis sur l'ensemble du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétitions constituant le microsatellite. Les séquences bordent ces éléments répétées permettent de définir les amorces pour l'amplification par PCR. La taille des produits amplifiés est estimée par électrophorèse sur gel d'agarose ou d'acrylamide (Figure 09).

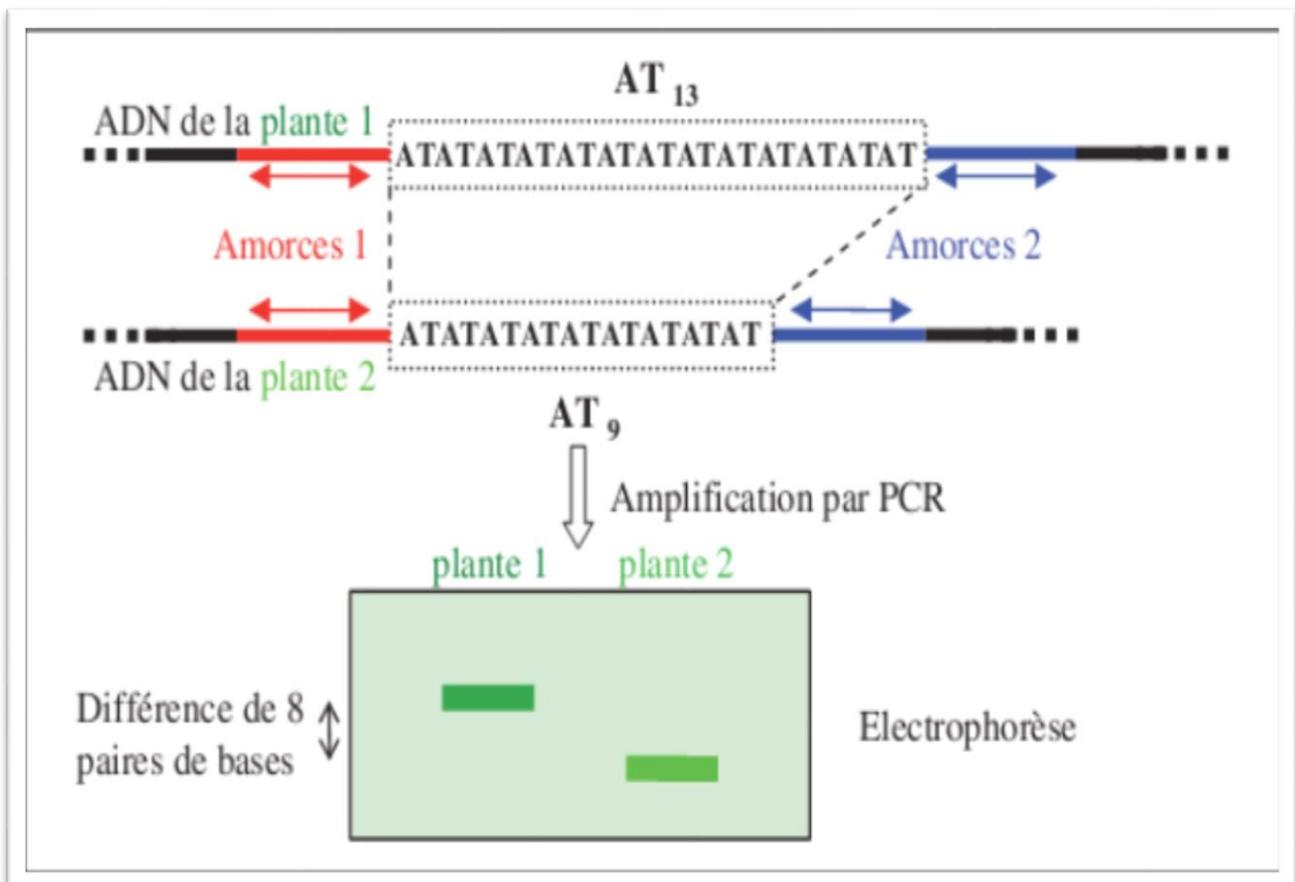


Figure 9 Exemple d'un marqueur de type microsatellite SSR (Moullet et al. 2008)

8- Les applications des marqueurs Microsatellites (SSR) chez les plantes

La figure (10) représente les différentes applications des marqueurs microsatellites (SSR) chez les plantes.

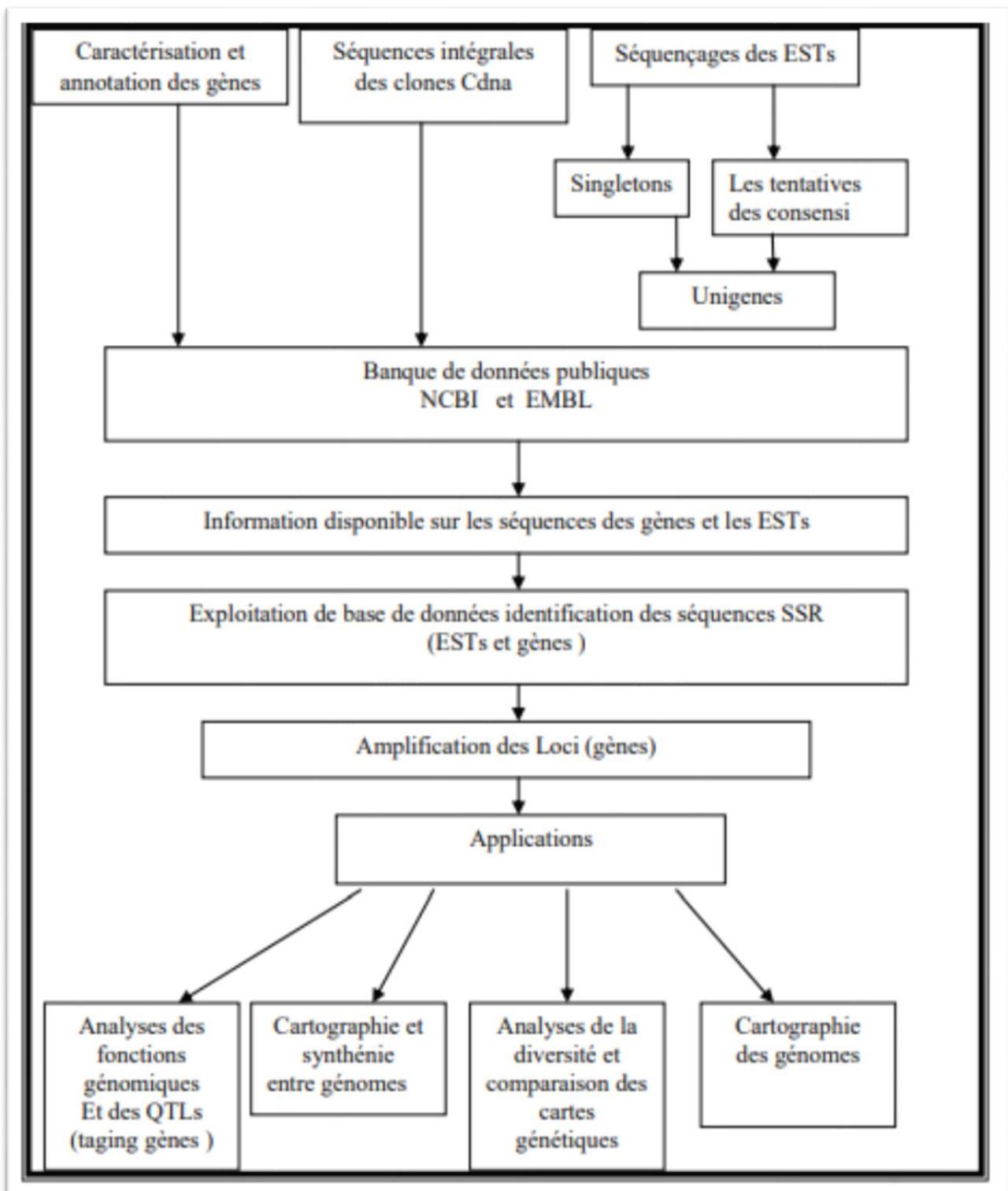


Figure 10 Développement et application des microsatellites SSR (Varshney et al. 2005)

Chapitre II

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

Quatre variétés de blé dur ont fait l'objet de ce travail, locales se caractérisant par une meilleure adaptation au milieu ; introduites améliorées mais moins tolérantes au climat de culture. Leurs origines sont présentées dans le tableau suivant (Tableau.4).

Tableau 4 : Code et origines des variétés étudiées de blé dur

Code	Variétés	Origine
1	Ain lahma	Algerie
2	<i>Triticum dicoccum</i>	Algerie
3	Djnah khotifa	Algérie
4	WAHA	ICARDA/ syrie

I. Mise en place de l'essai

L'essai a été réalisé au niveau du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV), équipe 2 de Biotechnologie et Amélioration des Plantes à Chaabet El Rasses, Université Constantine 1.

L'expérimentation a été conduite dans la chambre de culture. Elle consiste à étudier le polymorphisme génétique à l'aide des marqueurs moléculaires SSR chez les quatre génotypes de blé dur après germination. L'expérimentation a été réalisée à une température de 25°C et une photopériode de 16h de lumière et 8 h à l'obscurité.

Dans cet essai le génotype a été effectué sur quatre variétés de blé dur Fournies par la ferme expérimentale de l'ITGC (Institut Technique des Grandes Cultures) Constantine.

L'extraction de l'ADN a été réalisée sur 150mg de feuilles fraîches selon la méthode de Saghai-Marooif (1984) avec l'utilisation de 4 Amorces SSR, l'amplification a été réalisée avec un thermocycleur GenAmp, PCR system 9700, Applied Biosystems.

L'essai s'est déroulé comme suit :

1. La stérilisation :

Les graines choisies doivent être saines pour chaque variété, les graines sont :

- Désinfectées à l'eau de javel à 5% pendant 20 min.
- Rincées plusieurs fois avec de l'eau distillée.

2. La Pré germination

Les graines sont mises à germer dans des boîtes, ces dernières sont tapissées par trois couches de papier filtre comme substrat. Dans notre cas, nous avons imbibé les boîtes contenant des graines avec de l'eau deux fois par jour.

Les boîtes sont mises à l'obscurité dans une chambre de culture à une température de 25°C. La germination est repérée par la sortie de la radicule (du 3^{ème} au 5^{ème} jour) hors des téguments de la graine dont la longueur est d'au moins de 2 mm.(figure 11)



Figure 11 Pré-germination des graines des quatre variétés étudiées

3. Le repiquage

Après l'obtention de la radicule les boîtes sont mises à la lumière avec une photo période de 16h de lumière et 6h d'obscurité.

Après que les graines des variétés des blés dur ont été mises à germer dans des boîtes et que les radicules sont bien développées, elles sont ensuite transférées dans un sol (Figure 12)



Figure 12 Pré-germination des graines des quatre variétés étudiées

En conditions naturels avec un arrosage par jour. Sans oublier d'identifier les génotypes à germer (figure 12).

II. Caractérisation moléculaire

1. L'extraction de l'ADN génomique

L'extraction a été effectuée selon la méthode CTAB (Saghai et al, 1984) comme suit : (figure13)

Préchauffer le tampon CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol dans un bain marie à 65°C. Ensuite, Broyer le matériel végétal (environ150mg) dans un mortier avec l'azote liquide (manipuler avec les gants) puis transférer le broyat dans un tube Eppendorf de 2ml avec une spatule (mettez les tubes bien fermés dans l'azote liquide).

Ajouter 900 µl de tampon CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol préchauffé à 65°C et Homogénéiser au vortex puis Incuber 60mn dans un bain marie a65°C avec agitation.

Centrifuger 15mn a 10000 rpm à 4°C et récupérer environ 800 µl de surnageant dans un nouveau tube Eppendorf de 2ml. Ensuite Ajouter 800 µl (1vol) de chloroforme/Alcool Iso amylique (24 :1) et agiter pendant 45mn à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (Faire attention aux fuites).

Centrifuger 15mn a 10000rpm à 4°C et récupérer la phase aqueuse supérieure l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube Eppendorf de 2ml puis ajouter 800 µl (1vol) de chloroforme/Alcool Iso amylique (24 :1).

Agiter pendant 45mn a vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation(Faire attention aux fuites) et centrifuger 15mn a 10000rpm a 4°C puis récupérer la phase aqueuse supérieure a l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tubeEppendorf de 1.5ml (éviter de prendre la couche blanche au milieu).

Ajouter 3 à 5 µl RNase (10mg/ml), agiter par inversion et incuber 30mn a 37°C.

Ensuite ajouter 540 µl (2/3vol) d'isopropanol froid (-20°C) et Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche puis laisser précipiter a -20°C pendant 5 à 10 mn.

Centrifuger 10mn à 10000rpm à 4°C et éliminer le surnageant très délicatement avec une micropipette puis Ajouter 500 µl de solution de lavage 1 et incuber pendant 15mna température ambiante. Centrifuger 5mn à 10000 rpm à 4°C ensuite éliminer le surnageant et Ajouter 500 µl de solution de lavage 2.

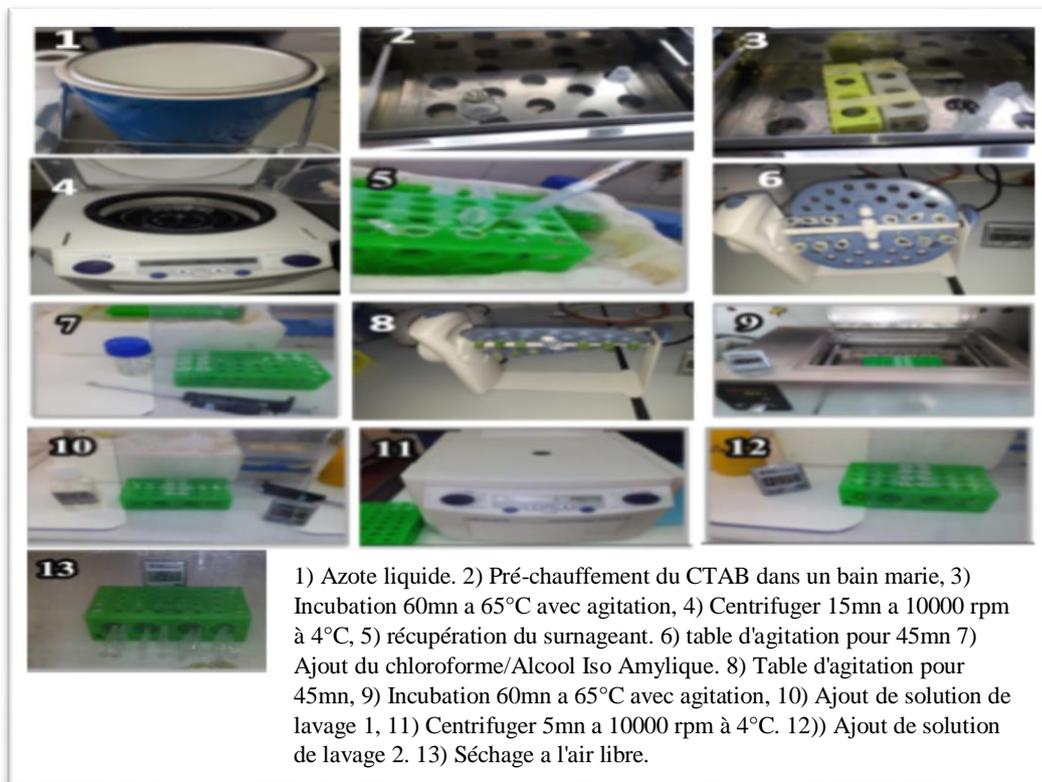


Figure 13 Etapes de l'Extraction de l'ADNg des quatre génotypes étudiés au CTAB u

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

2- Les amorces SSR utilisées

Un jeu de 4 marqueurs SSR a été utilisé dans cette étude. Les noms de ces marqueurs, leurs séquences et leurs températures sont présentés dans le Tableau (05).

Tableau 5 : Noms de marqueurs SSR, leurs séquences et leurs températures.

Amorce	Séquence	Température d'hybridation
WMC 44 (F) WMC 44 (R)	5'-GGTCTTCTGGGCTTTGATCCTG-3' 5'-TGTTGCTAGGGACCCGTAGTGG-3'	61°C
WMC 161 (F) WMC 161 (R)	5'-ACCTTCTTTGGGATGGAAGTAA-3' 5'-GTAAGTGAACCACTTGTAACGCA-3'	61°C
WMC 25 (F) WMC 25 (R)	5'-TCTGGCCAGGATCAATATTACT-3' 5'-TAAGATACATAGATCCAACACC-3'	51°C
WMC 168 (F) WMC 168 (R)	5'-AACACAAAAGATCCAACGACAC-3' 5'-CAGTATAGAAGGATTTTGAGAG-3'	51°C

Ces marqueurs moléculaires ont été utilisés pour examiner la diversité génétique des variétés locales et introduites.

3- Les réactions d'amplification

Les quatre amorces SSR ont été utilisées pour la réaction PCR en utilisant un thermocycleur Applied Bio systèmes 9700, programmé pour 40 cycles comme suit:

Dénaturation initiale à 94°C pendant 5mn , deuxième dénaturation à 94°C pendant 1mn , Hybridation à 37°C pendant 1mn , Extension à 72°C pendant 1 mn et une Extension finale à 72°C pendant 7mn.

4- Préparation des amorces

-5µl Amorce F + 5µl Amorces R + 90µl H2O up le total 100µl :

On à 4 tubes pour chaque tube on a une amorce : WMC 161, WMC 44, WMC 161, WMC 25.

On ajoute dans chaque tube 90 µl H2O up avec une micropipette p200, ensuite on ajoute les 5 µl Amorce F + 5 µl Amorces R.

Tableau 6 : Préparation de Mélange réactionnel (Mix)

Le mix	Pour 1 seule réaction	Pour 5 réactions
- Ampli Taq ADN polymerase	0.5µl	1.25µl
- Tampon	2.5 µl	12.5µl
- DNTP	0.5 µl	2.5µl
- MgCl	1.5 µl	7.5µl
- Amorces SSR	1.25 µl	6.25µl
- H2H up	14 µl	70µl

Pour chaque amorce on met ce mix par cet ordre : on commence par l'H2O up, le tampon, Mgcl 2, Amorce SSR, DNTP, Ampli Taq ADN polymérase.

Après on a deux plaques, une plaque pour chaque deux amorces qui ont les mêmes températures, donc au milieu de la première plaque on met les deux premières amorces (Amorce 1 WMC25 et Amorces 2 WMC 168) et au milieu de la deuxième plaque on met les deux deuxièmes amorces (Amorce 1 WMC44 et Amorce 2 WMC 161).De chaqu'un on prend juste 20µl du mix et on le met dans chaque amorces.

Après on prend 5 µl ADN on l'ajout avec le mix pour qu'on aura le total 25 µl (figure 14 et 15).

5- Les dilutions d'ADN

Tableau 7 : Les tubes d'ADN dilués

Variété	C1	V1
1	146.7ng	34.08
2	712.6ng	7.01
3	332.3ng	15.04
4	242.4ng	21

$$C1. V1 = C2.V2$$

$$C1 = 146.7\text{ng} , V1 = ? , C2 = 50\text{ng} , V2 = 100$$

$$V1 = (50.100) / 146.7 = 34.08$$

Tableau 8 : ADN délié + H2O up

Variété 1	34.084 ADN + 66 H2O
Variété 2	7.01 ADN + 93 H2O
Variété 3	15.04 ADN + 85 H2O
Variété 4	21 ADN + 79 H2O

II. Quantification de l'ADN et contrôle de qualité

1. Quantification à l'aide du Nano drop :

De chaque échantillon étudié 0.8 μl est déposé pour lecture. Sans oublier les blancs avant et après chaque dépôt. La quantité finale d'ADN extrait variait de 200 à 800 $\text{ng}/\mu\text{l}$.

- Il a été nécessaire de faire des dilutions pour les réactions de PCR



Figure 14 Dépôt d'un échantillon sur Nano drop

2. Contrôle de qualité par électrophorèse sur gel d'Agarose :

Après coloration au Bromure d'éthidium à 0.8% de gel. Les dépôts sont effectués dans la cuve à raison de 12 μl (10 μl ADN_g + 2 μl Tampon de charge 4X) par puits, avec 3 à 5 μl de marqueur de taille 1Kb.

3. Vérification des produits PCR et Visualisation des Résultats

Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse sur deux gel d'agarose à 0.8% après coloration au Bromure d'éthidium dans un tampon TBE 1 X (figure 16). Les dépôts sont faits selon un schéma (figure 17). La durée ainsi que l'Ampérage sont notés à la fin de la migration (figure 18).



Figure 15: préparation pour déposer les échantillons sur deux gels



Figure 16 Protocole de préparation des deux gels d'électrophorèse



Figure 17 Dépôt des échantillons sur gel



Figure 18 Migration des échantillons par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8%,40 mn a 100V.

- Les bandes SSR sont ensuite visualisées sous lumière UV et photographiées en utilisant le système E-BOX VX2 (Annexe 2).

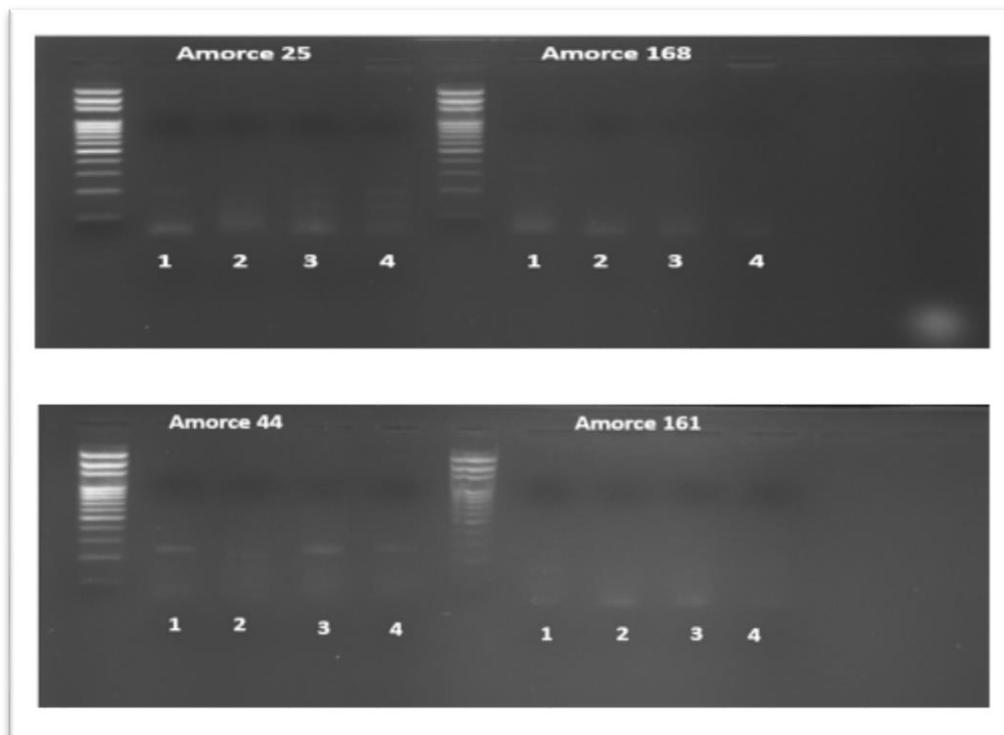


Figure 19 Electrophorèse sur gel d'agarose a 2%,40mn à 100 V pour vérification de la qualité de l'ADNg extrait des quatre variétés étudiées avec le marqueur de taille 1K

4. Analyse des données

Afin de visualiser les relations génétiques entre les génotypes étudiés, des matrices type Présence/Absence (1/0) de bandes ont été réalisées.

Chapitre III

Résultats et discussions

I. Analyse de la diversité et polymorphisme génétique

Pour l'étude de la diversité génétique de quatre variétés de blé, quatre amorces SSR ont été utilisées.

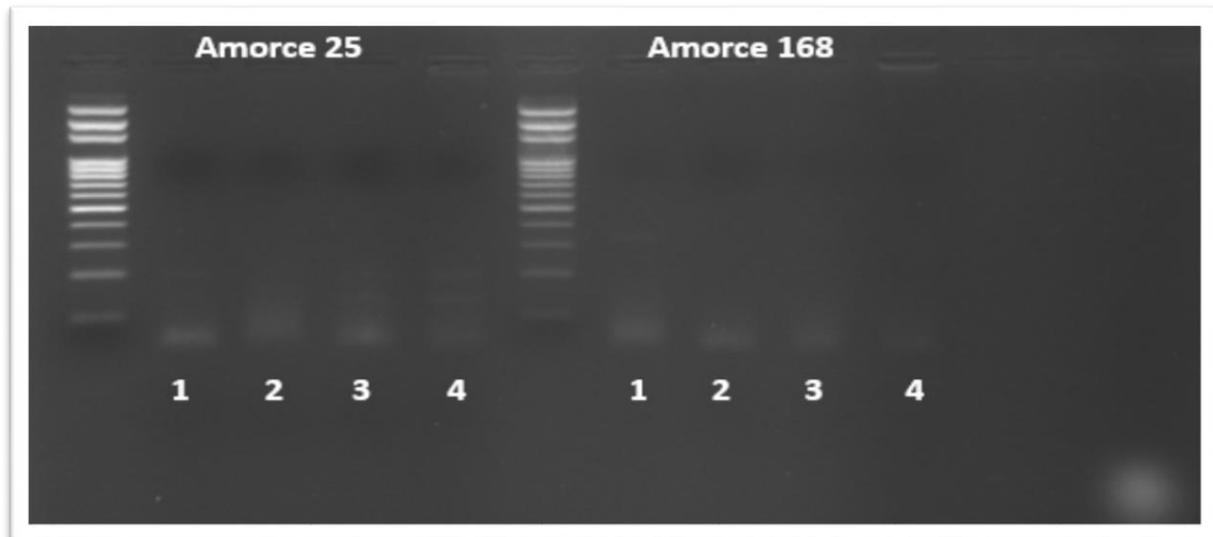


Figure 20 Profil électrophorétique généré par les Amorces wmc25 wmc168 (les variétés : Ain lahma, T.dicoccum, Djnah khotifa, Waha,)

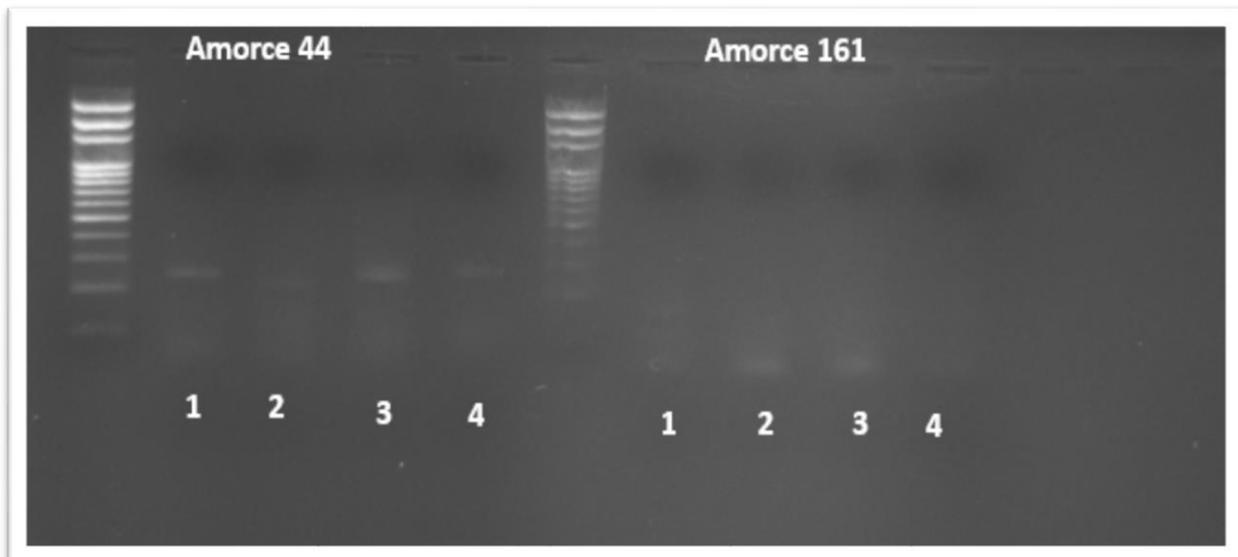


Figure 21 Profil électrophorétique généré par les Amorces wmc44 wmc161 (les variétés : : Ain lahma, T.dicoccum, Djnah khotifa, Waha)

Les résultats des Figures (20 et 21), montrent un polymorphisme important révélé par les amorces SSR utilisées dans cette étude, Le nombre de bandes polymorphes, sont présentes sur le Tableau (09 et 10).

Le profil allélique généré par les marqueurs SSR des quatre variétés étudiées dans ce travail, montre que la taille des bandes varie d'une variété à une autre.

Au total 51 allèles ont été obtenus après génotypage par les SSR, 25 bandes entre les amorces (WMC 25, WMC 168), (Tableau 09) et 26 bandes entre les amorces (WMC 44, WMC 161), (Tableau 10) avec des tailles différentes. Nos résultats montrent que, l'amorce WMC 25 a donné le plus grands nombres d'allèles (16Allèles), Suivie par l'amorce WMC 161 (14 Allèles), les plus faibles ont été obtenus par les amorces WMC 44 et WMC 168 (12 Allèles).

Cependant, pour l'amorce WMC 25, la variété locale Djnah Khotifa a montré un polymorphisme plus élevé par rapport aux autres genotypes avec la présence de cinq bandes de taille différentes varient entre 0.137kb à 1.566kb, suivie par la variété Ain lahma, quatre allèles de taille (1.437kb, 0.593kb, 0.202kb, 0.053kb), aussi chez la variété WAHA on constate quatre allèles de taille (1.437kb, 0.648kb, 0.144kb, 0.137kb). (Tableau 09) et le plus faible est noté chez le *Triticum dicoccum* avec trois allèles de taille (1.394kb, 0.609kb, 0.049kb).

On note aussi pour cette amorce la présence de bandes communes comme c'est le cas des deux variétés locales : Djnah Khetifa et Ain lahma,

Et l'allèle de taille 1.437kb, present chez Waha, le *Triticum dicoccum* et la variété Ain lahma

Et absent chez la variété djenah khetifa. Pour ce meme marqueur, nos resultats montrent que le *Triticum dicoccum* et la variété Ain lahma se caractérisent par la présence de bandes communes de faibles poids moléculaire de l'ordre de : 0.049kb et 0.053kb

Concernant l'amorce WMC 161, la variété Ain lahma a montré un polymorphisme plus élevé par rapport aux autres genotypes, on note la présence de cinq bandes de taille (1.698kb, 0.567kb, 0.112kb, 0.109kb, 0.104kb), suivi par la variété locale Djnah khetifa on constate quatre allèles de taille (3.235kb, 1.594kb, 0.634kb, 0.105kb) et trois bandes chez la variété (WAHA) (3.824kb, 1.419kb, 0.608kb). (Tableau 10), par contre chez le *Triticum dicoccum*, on enregistre un taux faible de bandes de l'ordre de (1.53kb, 0.643kb).

Pour ce marqueurs on note aussi la présence de bande comme chez les variétés Waha et Djnah khetifa (3.824kb), on remarque la présence de l'allèle de taille: 0.643kb chez les quatre variétés étudiées

Pour l'amorce WMC 44, le plus grand nombre d'allèles a été noté chez la variété locale Ain lahma qui est de quatre allèles de taille (4.529kb, 0.7kb, 0.241kb, 0.117kb). suivie par le *Triticum dicoccum* avec trois allèles de taille (2.099kb, 0.71kb, 0.21kb), la variété WAHA là où on constate trois allèles de taille (1.961kb, 0.671kb, 0.244kb).(Tableau10)

Ainsi que le plus faible nombre d'allèles est noté chez la variété Djnah Khotifa avec la présence deux allèles de taille (0.74kb, 0.232kb) pour cette amorce on constate la presence de deux bandes communes présentent chez l'ensemble des variétés étudiées il s'agit de l'allèle de taille 0.244kb et 0.74kb, une bande spécifique a été noté chez la variété locale Ain lahma (4.529kb).

l4 analyse de la variabilité génétique de l'amorce WMC 168, montre que le *Triticum dicoccum* présente le taux d'allèles le plus élevé avec la présence de cinq bandes de taille différentes qui varie entre 0.035kb à 1.714kb , suivie par Ain lahma , on constate la présence quatre allèles de taille (1.714kb, 0.327kb, 0.093kb, 0.051kb). Et chez la variété (WAHA) on constate deux allèles de taille (0.084kb, 0.016kb). (Tableau 09) le plus faible nombre est noté chez Djnah Khetifa avec un seul allèle de taille (0.037kb).

Pour l'amorce WMC 25 une bande commune de taille (1.437kb), a été enregistré chez Ain lahma et WAHA, un autre allèle de faible taille (0.137kb) a été détecté chez Djnah Khotifa et WAHA.

Concernant l'amorce WMC 168, l'allèle de taille (1.714kb) a été répété chez la variété Ain lahma et *Triticum dicoccum*.

Tableau 9 : Présence (1) /Absence (0) des bandes qu'ont été réalisées pour l'amorce WMC 25 et WMC 161.

bandes	pm (kb)	Amorce WMC 25				Amorce WMC 161			
		Ain lahma	<i>T.dicoccum</i>	Djnah khotifa	waha	Ain lahma	<i>T.dicoccum</i>	Djnah khotifa	waha
1	1,714	0	0	0	0	1	1	0	0
2	1,566	0	0	1	0	0	0	0	0
3	1,437	1	0	0	1	0	0	0	0
4	1,394	0	1	0	0	0	0	0	0
5	0,648	0	0	0	1	0	0	0	0
6	0,618	0	0	1	0	0	0	0	0
7	0,609	0	1	0	0	0	0	0	0
8	0,593	1	0	0	0	0	0	0	0
9	0,571	0	0	0	0	0	1	0	0
10	0,327	0	0	0	0	1	0	0	0
11	0,203	1	0	0	0	0	0	0	0
12	0,2	0	0	1	0	0	0	0	0
13	0,144	0	0	0	1	0	0	0	0
14	0,137	0	0	1	1	0	0	0	0
15	0,093	0	0	0	0	1	0	0	0
16	0,084	0	0	0	0	0	0	0	1
17	0,074	0	0	0	0	0	1	0	0
18	0,06	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0,053	1	0	0	0	0	0	0	0
20	0,051	0	0	1	0	1	0	0	0
21	0,049	0	1	0	0	0	0	0	0
22	0,044	0	0	0	0	0	1	0	0
23	0,035	0	0	0	0	0	1	0	0
24	0,037	0	0	0	0	0	0	1	0
25	0,016	0	0	0	0	0	0	0	1

Tableau 10 : Présence (1) /Absence (0) des bandes qu'ont été réalisées pour l'amorce WMC 44 et WMC 161.

bandes	pm (kb)	amorce 44				amorce 161			
		Ain lahma	T.Dicoccum	Djnah khotifa	Waha	Ain lahma	T.Dicoccum	Djnah khotifa	Waha
1	4,529	1	0	0	0	0	0	0	0
2	3,824	0	0	0	0	0	0	0	1
3	3,235	0	0	0	0	0	0	1	0
4	2,099	0	1	0	0	0	0	0	0
5	1,961	0	0	0	1	0	0	0	0
6	1,698	0	0	0	0	1	0	0	0
7	1,594	0	0	0	0	0	0	1	0
8	1,53	0	0	0	0	0	1	0	0
9	1,419	0	0	0	0	0	0	0	1
10	0,74	0	0	1	0	0	0	0	0
11	0,71	0	1	0	0	0	0	0	0
12	0,7	1	0	0	0	0	0	0	0
13	0,671	0	0	0	1	0	0	0	0
14	0,643	0	0	0	0	0	1	0	0
15	0,634	0	0	0	0	0	0	1	0
16	0,608	0	0	0	0	0	0	0	1
17	0,567	0	0	0	0	1	0	0	0
18	0,244	0	0	0	1	0	0	0	0
19	0,241	1	0	0	0	0	0	0	0
20	0,232	0	0	1	0	0	0	0	0
21	0,21	0	1	0	0	0	0	0	0
22	0,117	1	0	0	0	0	0	0	0
23	0,112	0	0	0	0	1	0	0	0
24	0,109	0	0	0	0	1	0	0	0
25	0,105	0	0	0	0	0	0	1	0
26	0,104	0	0	0	0	1	0	0	0

L'analyse de la variation génétique révèle un total de 54 allèles. Les marqueurs SSR sont jugés d'être très polymorphes avec 12 à 16 allèles sur les quatre cultivars examinés (Tableau 09 et 10). Ceci confirme la grande diversité observée au sein de cette espèce révélée par cette technique.

Dans cette étude l'amorce WMC25 a donné un niveau élevé de polymorphisme par rapport aux autres amorces avec un taux de : 16 allèles donc c'est l'amorce la plus polymorphe, cette amorce a été sélectionnée par le Wheat Microsatellite Consortium parmi les marqueurs les plus polymorphes et les mieux repartis sur le génome de blé.

Suivi par WMC161 avec 14 allèles et le plus faible taux a été noté chez l'amorce WMC44 et WMC168 là où on note l'apparition de 12 allèles/amorce.

Les microsatellites sont des marqueurs génétiques très populaires en raison de leur hérédité co-dominante, de leur grande abondance, de l'énorme étendue de la diversité allélique et de la facilité d'évaluer la variation de taille des SSR par PCR avec des paires d'amorces flanquantes. La reproductibilité des microsatellites est telle qu'ils peuvent être utilisés efficacement par différents laboratoires de recherche pour produire des données cohérentes (Saghai-Marouf et al, 1984). Dans la présente étude, les marqueurs Wmc168, Wmc25, Wmc44, Wmc161, ont été assignés aux chromosomes 7A, (2A, 2B, 2D), 1B, (4A, 5D), respectivement, selon plusieurs chercheurs (Roder et al, 1998 ; Somers et al, 2004 ; Golabadi et al, 2011). Les groupes homéologiques des chromosomes 2, 5 et 7 du blé contiennent un certain nombre de gènes qui sont importants pour la tolérance au stress abiotique (Dubcovsky et al, 1995 ; Somers et al, 2004 ; Golabadi et al). (Tableau 11).

Des recherches antérieures (Ehtemam, M. H., al. 2010), ont montré que les chromosomes du génome A portent des gènes importants tels que des gènes de résistance chez les plantes adultes, des gènes de rendement, gènes de résistance à la germination, gènes de synthèse de la chlorophylle, gènes du nombre total d'épillets par épi, gènes de tolérance au froid, et gènes de taille des stomates. Les chromosomes 2AS, qui porte également les gènes de résistance à la rouille Yr17, Lr37 et Sr38, et 2BS chromosome confèrent une résistance à certaines ou à toutes les races chinoises de PST (CYR31, CYR32, SY11-4, et SY11-14). (Yang, Z. J. et al (2008).

Tableau 11 : chromosomes des marqueurs

Marqueurs SSR	Chromosome
WMC25	2A, 2B, 2D
WMC168	7A
WMC44	1B
WMC161	4A, 5D

Pour atteindre les principaux objectifs que nous nous sommes fixés dans le cadre de ce travail, nous avons procédé à un génotypage par des marqueurs SSR de quatre variétés de blé dur cultivé en Algérie.

Pour les différentes variétés les résultats obtenus révèlent un polymorphisme important, cependant la variété Ain lahma présente le nombre d'allèle le plus élevé (17 allèles) suivis par les autres génotypes qui montrent presque les mêmes valeurs qui varient entre 12 à 13 allèles.

Des résultats antérieurs, portant sur une caractérisation phénotypique montrent l'importance des variétés utilisées pour la réalisation de ce travail ; Ces résultats montrent que la variété Waha, introduite de l'ICARDA une variété qui a été étudiée en raison de son utilisation dans les régions Sahariennes. Qui est une sélection récente de l'ITGC. C'est une variété à haut potentiel de production, précoce, résistante aux maladies, et présentant de bonnes caractéristiques technologiques. Sa faculté germinative est de 97 %, (DAOUD, Y., & BELDJOUDI, Z. (1994). Waha est une variété améliorée, à chaume et cycle courts, réalise tôt ses phases de croissance en utilisant l'eau disponible et échappe au stress hydrique tardif. (Chennafi, H., Makhlouf, M., & Ayadi, et A. L. (2010).

Les résultats de cette étude montrent aussi une variabilité génétique observée au niveau du blé dur ancien (*Triticum dicoccum*). Cette variété ancienne de blé intéresse les chercheurs. Récemment, les populations se sont de plus en plus intéressées aux aliments naturels et biologiques.

À cet égard, les anciennes variétés de blé *Triticum dicoccum*, ont été étudiées pour leur utilisation dans la technologie alimentaire. La principale valeur de ces variétés est leur capacité de produire de bons rendements sur des sols pauvres et de résister aux maladies

fongiques. Les variétés anciennes de blé sont tolérantes à la sécheresse et au stress thermique (Zaharieva et al. 2010 ; Konvalina et al, 2011). Rajoutant à cela La valeur nutritionnelle du grain de *Triticum dicoccum* qui est principalement due à la teneur élevée en protéines (18 - 23%), la proportion totale d'acides aminés essentiels dans les protéines (Stehno, 2007) et le haut degré de digestibilité des composés protéiques (Hanchinal et al. 2005). Une concentration importante d'antioxydants a été a été trouvée dans le grain de *Triticum dicoccum* (Piergiovanni et al. 1996). L'amidon du grain, et Le faible indice glycémique fait que le grain de *Triticum dicoccum* est particulièrement précieux pour la nutrition des diabétiques (Buvaneshwari et al. 2003). Cependant, on a constaté que le grain de *Triticum dicoccum* a une concentration plus élevée d'acide phytique.

*Conclusion et
perspectives*

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

D'après nos résultats, les variétés autochtones constituent un patrimoine génétique riche polymorphe, et une piste d'investigation pour la recherche de nouveaux gènes qui interviennent dans l'amélioration pour l'adaptation au stress biotique et abiotiques.

De plus, les variétés améliorées ayant un taux élevé en allèles peuvent être un important support pour l'identification de gènes et d'allèles responsables du même caractère.

Dans ce sens et afin d'améliorer la productivité et la qualité, nous proposons que les améliorateurs choisissent des parents comme Waha, Ain lahma, et Djenah khotifa. Et D'autre part, le *Triticum dicoccum* pour ces valeurs et qualité nutritionnelles Et donc en perspective, la poursuite des travaux nécessite une étude sur plusieurs variétés locales de blé dur afin de rechercher d'autre utilisation de blé dur. Afin d'apprécier la diversité génétique d'une part et la corrélérer avec les caractères d'intérêts d'autre part.

*Références
bibliographiques*

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Référence bibliographique

Amouri, A. A. (2016). Caractérisation Moléculaire et Biochimique en Condition de Stress Salin de *Medicago truncatula* Gaertner (Doctoral dissertation, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, 31000-Oran-Algérie).

Awatef, G., Chafia, Z., & Mostefa, B. (2017). Étude de la diversité génétique de quelques variétés de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et de blé dur (*Triticum durum* Desf.) selon la base des caractères de l'UPOV. *Journal of Applied Biosciences*, *113*, 11246-11256.

BEDJAOU, H. (2019). Etude de la diversité génétique de quelques accessions de palmier Dattier (*Phoenix dactylifera* L.) en Algérie moyennant les marqueurs de l'ADN de type SSR (Doctoral dissertation, UNIVERSITE MOHAMED KHIDER BISKRA).

Barakat, M. N., Al-Doss, A. A., Elshafei, A. A., & Moustafa, K. A. (2012). Bulked segregant analysis to detect quantitative trait loci (QTL) related to heat tolerance at grain filling rate in wheat using simple sequence repeat (SSR) markers. *African journal of biotechnology*, *11*(61), 12436-12442.

BAKHTI, A. Recherche d'un polymorphisme de marqueurs microsatellites chez différentes espèces de plantes: Cas des espèces annuelles de *Medicago* (Doctoral dissertation, Université d'Oran1-Ahmed Ben Bella).

Belete, Y., Shimelis, H., Laing, M., & Mathew, I. (2021). Genetic diversity and population structure of bread wheat genotypes determined via phenotypic and SSR marker analyses under drought-stress conditions. *Journal of Crop Improvement*, *35*(3), 303-325.

Bellatreche, A., Mnasri, S. R., Ben Naceur, M., & Gaouar, S. S. B. (2019). Study of the Molecular Biodiversity of the Saharan Bread Wheat in Algeria. *Cereal Research Communications*, *47*(4), 724-739.

Charmet, G. (2011). Wheat domestication: lessons for the future. *Comptes rendus biologiques*, *334*(3), 212-220.

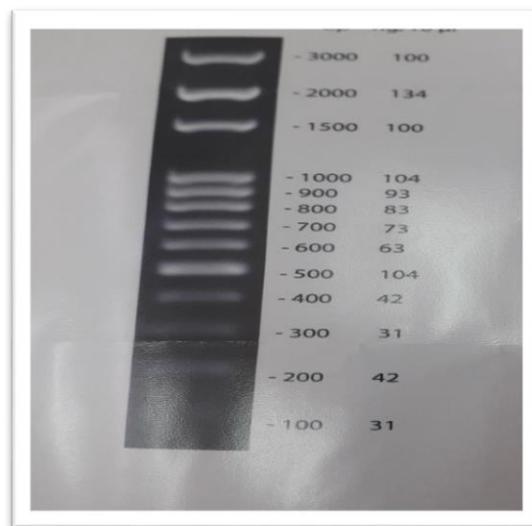
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chennafi, H., Makhlouf, M., & Ayadi, A. L. (2010).** Réponse des variétés contrastées de blé dur (*Triticum durum* Desf.) à la date d'implantation sous semis direct en milieu semi-aride. Actes des quatrièmes rencontres méditerranéennes du semis direct. Revue INRAA, NO. Spécial, 31-38.
- DAOUD, Y., & BELDJOUDI, Z. (1994).** Etude expérimentale de la tolérance d'une variété de blé dur (Waha) à la salinité.
- Dhanavath, S., & Prasada Rao, U. J. S. (2017).** Nutritional and nutraceutical properties of *Triticum dicoccum* wheat and its health benefits: An overview. Journal of Food Science, 82(10), 2243-2250.
- Ehtemam, M. H., Rahiminejad, M. R., Saeidi, H., Tabatabaei, B. E. S., Krattinger, S. G., & Keller, B. (2010).** Relationships among the A genomes of *Triticum* L. species as evidenced by SSR markers, in Iran. International journal of molecular sciences, 11(11), 4309-4325.
- Gupta, P., Balyan, H. S., Edwards, K. J., Isaac, P., Korzun, V., Röder, M. S., ... & Leroy, P. (2002).** Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. Theoretical and applied genetics, 105(2), 413-422
- Hubert-Vincent, F. (2007).** Diversité génétique et adaptation des espèces aquatiques en milieu anthropisé.
- Kara, K., Kanouni, M. R., Debbabi, O. S., & Naceur, M. B. (2017).** Genetic diversity of bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L.) revealed by agromorphological characteristics and microsatellite SSR markers. Int J Res Eng Technol, 6, 178-182.
- KARA, K., RACHED-KANOUNI, M. A. L. I. K. A., MNASRI, S., KHAMMAR, H., & M'BAREK, B. N. (2020).** Genetic variability assessment in bread wheat (*Triticum aestivum*) grown in Algeria using microsatellites SSR markers. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 21(6).
- Louali, Y., & Djekoun, A. (2016).** Production de génotypes mutants chez le blé dur (*Triticum durum*) (Doctoral dissertation).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mekhlouf, A., Bouzerzour, H., Benmahammed, A., Sahraoui, A. H., & Harkati, N. (2006).** Adaptation des variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) au climat semi-aride. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 17(4), 507-513.
- Mian, M. A. R., Saha, M. C., Hopkins, A. A., & Wang, Z. Y. (2005).** Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses. *Genome*, 48(4), 637-647.
- Nachit, M., Picard, E., Monneveux, P., Labhilili, M., Baum, M., & Rivoal, R. (1998).** Présentation d'un programme international d'amélioration du blé dur pour le bassin méditerranéen. *Cahiers Agricultures*, 7(6), 510-515.
- Piyusha, S., & Singh, N. K. (2018).** SSR Molecular Marker are efficient tools for finding Genetic Diversity in Bread Wheat. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 12, 1098-1105.
- Sun, M., Yan, Y., Jiang, Y., Xiao, Y., Hu, Y., Cai, M., ... & Zeller, F. J. (2004).** Molecular cloning and comparative analysis of ay-type inactive HMW glutenin subunit gene from cultivated emmer wheat (*Triticum dicoccum* L.). *Hereditas*, 141(1), 46-54.

Annexes



Annexe 01: marqueur de taille 1 Kb



Annexe 02 : système d'imagerie E-BOX VX2

CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE ET ÉTUDE DU POLYMORPHISME GÉNÉTIQUE SUR LE BLÉ

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et Génomique Végétale

Résumé :

Les ressources phytogénétiques constituent la base biologique de la sécurité alimentaire mondiale. Les diverses espèces locales et la diversité génétique qu'elles renferment jouent un rôle primordial dans le développement économique, social et culturel. Dans cette étude, quatre variétés de blé dur ont été choisies (améliorées, ancienne et introduites à savoir : Ain lahma, djenah khotifa, *Triticum dicoccum* et Waha. Dont l'objectif est d'évaluer les germoplasmes de blé dur en utilisant des marqueurs moléculaires de type SSRs, afin de sélectionner des accessions performantes pour le développement de ce secteur. Nos résultats montrent un niveau élevé de polymorphisme généré par les amorces utilisées et chez l'ensemble des variétés étudiées. Un total de 51 bandes a été noté par toutes les amorces, le nombre élevé de 16 bandes a été donné par l'amorce WMC25. Ainsi que la variété locale Ain lahma et le blé emmer *Triticum dicoccum* ont été marqués par la présence d'un grand nombre de polymorphismes 17 et 13 allèles observés chez la variété Ain lahma et *Triticum dicoccum* respectivement, par rapport aux deux variétés waha et Djenah khotifa. Les amorces utilisées dans cette étude, sont choisies suivant leur fiabilité et leur polymorphisme. Ce sont des loci très informatifs de fait qu'ils montrent dans la même espèce un nombre élevé d'allèles.

Mots clés : Blé, Marqueurs moléculaires, diversité génétique, polymorphisme, SSR

Laboratoire de recherche : Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV), équipe 2 de Biotechnologie et Amélioration des Plantes à Chaabet El Rasses, Université Constantine 1

Jury d'évaluation :

Présidente : KACEM Sandra Nadia. (Maitre de conférence B).

Encadrant : BOUSBAA Ratiba. (Maitre de conférence A).

Examinatrice : BOUCHEMAL Karima, (Maitre de conférence B).

Date de soutenance : 07/07/2021