



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
Ministère de L'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique



Université des Frères Mentouri - Constantine
Faculté des Sciences de la nature et de la Vie
Département : Biologie et Ecologie végétal

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا و علوم البيئة النباتية

Département : Biologie et Ecologie Végétale

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biodiversité et physiologie Végétale

Intitulé :

**Etude de la variabilité génétique chez l'espèce
(*Vicia faba* L. et *Vicia sativa* L.) par la technique des SSRs**

Présenté et soutenu par :

Le : 15/09/2020

- MAGHBOUNE Ibtissem
- NEKAA Farah

Jury d'évaluation :

Président du jury : Dr. BOUZID salha (MCB- UFM Constantine).

Encadreur : Dr. HAMMOUDA-BOUSBIA Dounia (MCA- UFM Constantine).

Examinatrice : Dr. BOUDCHICHA Rima (MAB- C.R.Bt)

**Année universitaire
2019 – 2020**

Remerciement

Au terme de ce travail,

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

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de CRBT Centre de Recherche de Biotechnologie

*Nous voudrions remercier du fond du cœur Notre encadreur Madame **HAMMOUDA-BOUSBIA Dounia** (MCA- UFM Constantine), qui a encadré cette étude au quotidien et avoir proposé ce thème et nous avoir formés tout au long de ce travail.*

Nous lui disons merci encore pour sa totale disponibilité et sa modestie à notre égard.

Nous tenons à remercier les membres de jury

*Madame la présidente du jury : **Dr. BOUZID salha** l'Université des Frères Mentouri Constantine 1 qui à accepter et bien voulu nous faire*

*Madame la Examinatrice : **Dr. BOUDCHICHA Rima** maitre de recherche class B*

Au centre de recherche de biotechnologie

Examineur pour le temps consacré pour examiner ce modeste travail .

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

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

Dédicaces

Je dédie ce travail

Avant toute chose je remercie Allah de me donner la force pour arriver à ce niveau, de me faciliter et de m'aider à atteindre ce succès. à la mémoire de mes grands-parents, qui auraient été sûrement fier de moi aujourd'hui, Et à mes chers parents, , qui sans eux je n'aurais jamais été ce que je suis aujourd'hui .

A ma mère Leila et mon père Mouloud pour leurs sacrifices et leurs soutiens tout au long de mes études .

A mes frère: mohamed el amine , Djilali , Youcef , Bilal et Abd elmouiz et leurs femmes et leurs enfants .

A toutes mes tantes et oncles

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

Farah

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

à mes parents pour tous leurs sacrifices , leur soutien et leur prières tout au

long de mes études

Ibtissem

Résumé

Dans un cadre de projet de recherche portant sur l'origine et la détermination du génome de *Vicia faba* et sa relation avec celui de *Vicia sativa*, nous nous sommes intéressés à l'analyse biochimique des protéines totales, en utilisant la technique de SDS-PAGE, d'une part et d'autre part, à l'analyse de la variabilité génétique grâce aux marqueurs microsattlites, et ce ci sur cinq variétés de *vicia faba* et deux variétés de *vicia sativa*.

D'après nos résultats, la comparaison des profils protéiques des sept variétés, a révélé une différence significative. L'électrophorèse des protéines natives des graines par SDS-PAGE, paraît être une technique efficace pour la distinction interspécifique des deux espèces. Les profils électrophorétiques des sept variétés obtenus révèlent un polymorphisme très important et présentent au total 30 bandes claires, distinctes, bien séparées, et d'intensité différente de poids moléculaires variant de 2 KDa à 300 KDa avec un taux de polymorphisme conséquent supérieur à 80%.

De plus la classification hiérarchique illustrant les relations entre les sept variétés appartenant à deux espèces (*Vicia faba* et *Vicia sativa*), a montré que ces derniers sont généralement assez distants sauf les variétés *Maltais*, *Aguadulce* qui sont proches et qui présentent un taux de similarité égal à 72%. Et *Mariana* et *Histale* avec 63% de similarité.

Le calcul des fréquences alléliques pour chacune des espèces, *Vicia faba* L, *Vicia sativa*, a permis de faire des distinctions entre ces différents espèces.

Le PIC moyen pour les 4 amorces utilisées est de 0,644. Le pourcentage moyen de polymorphisme est de 99,35 % avec allèles monomorphes parmi 10 allèles différents au total.

Une hétérozygotie attendue a varié entre 0.751 et 0.919 avec une moyenne de 0.835.

Mot clés: *Vicia faba*- *Vicia sativa*- SDS-page -SSR- allèle- polymorphisme

Abstract

As part of a research project on the origin and determination of the genome of *Vicia faba* and its relationship with that of *Vicia sativa*, we are interested in the biochemical analysis of total proteins, using the technique of SDS –PAGE , on the one hand and on the other hand, to the analysis of genetic variability using microsatellite markers, and this on five varieties of *vicia faba* and two varieties of *vicia sativa*.

Based on our results, comparing the protein profiles of the seven varieties revealed a significant difference. Electrophoresis of native proteins from seeds by SDS-PAGE appears to be an efficient technique for the interspecific distinction of the two species. The electrophoretic profiles of the seven varieties obtained reveal a very important polymorphism and present a total of 30 clear, distinct, well-separated bands of different intensity with molecular weights varying from 2 KDa at 300 KDa with a consequent polymorphism rate greater than 80%.

In addition, the hierarchical classification illustrating the relationships between the seven varieties belonging to two species (*Vicia faba L* and *Vicia sativa*), showed that the latter are generally quite distant except the *Maltese* varieties, *Aguadulce* which are close and which present an equal rate of similarity. at 72%. And *Mariana* and *Histale* with 63% similarity.

The calculation of the allele frequencies for each of the species, *Vicia faba L*, *Vicia sativa*, made it possible to make distinctions between these different species.

The average PIC for the 4 primers used is 0.644. The average percentage of polymorphism is 99.35% with monomorphic alleles among 10 different alleles in total. an expected heterozygosity ranged between 0.751 and 0.919 with a mean of 0.835.

Keywords: *Vicia faba*- *Vicia sativa*- SDS-page -SSR- allele- polymorphism

ملخص

كجزء من مشروع بحثي حول أصل وتحديد جينوم *Vicia faba* وعلاقته مع *Vicia sativa*، كنا مهتمين بالتحليل الكيميائي الحيوي للبروتينات الكلية، باستخدام تقنية SDS-PAGE، من ناحية ومن ناحية أخرى، إلى تحليل التباين الجيني بفضل علامات SSR microsatellite، وهذا على خمسة أنواع من *vicia faba* ونوعين من *vicia sativa*.

بناءً على نتائجنا، أظهرت مقارنة خصائص البروتين للأصناف السبعة فرقاً كبيراً. يبدو أن الرحلان الكهربائي للبروتينات الأصلية من البذور بواسطة SDS-PAGE هو أسلوب فعال للتمييز بين النوعين. تكشف الملامح الكهروضوئية للأصناف السبعة التي تم الحصول عليها عن تعدد أشكال مهم للغاية ويتواجد في 30 نطاقات واضحة تماماً ومتميزة ومنفصلة جيداً وبكثافة مختلفة للأوزان الجزيئية التي تتراوح من 2KD إلى 300 KD مع معدل تعدد الأشكال أكبر من 80%.

بالإضافة إلى ذلك، أظهر التصنيف الهرمي الذي يوضح العلاقات بين الأصناف السبعة التي تنتمي إلى نوعين (*Vicia faba*) و (*Vicia sativa*)، أن النوع الأخير بعيد جداً بشكل عام باستثناء الأصناف المالطية، /غوادولس والتي تقدم نسبة متساوية من التشابه بنسبة 72%. و ماريانا و هيستال بنسبة 63% تشابه.

حساب ترددات الأليل لكل نوع *Vicia faba L.* و *Vicia sativa L.*، جعل من الممكن التمييز بين هذه الأصناف المختلفة.

يبلغ متوسط الموافقة المسبقة عن علم لأربعة مواد أولية 0.644. متوسط النسبة المئوية لتعدد الأشكال 99.35% مع الأليلات أحادية الشكل بين 10 أليلات مختلفة في المجموع؛ تفاوت التباين المتوقع heterozygosity بين 0.751 و 0.919 بمتوسط 0.835.

الكلمات المفتاحية: SDS- page -SSR- *Vicia sativa*- *Vicia faba*- اليل - polymorphism

Liste des abréviations

A : Adénine

APS: Ammonium persulfate

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism

BA : Bleu d'agarose

BC : bande commune

BU : bande unique

C : Cytosine

CTAB : Cetyltrimethylammonium bromide

CRBT : centre de recherche de biotechnologie

DNTPs: Deoxyribonucleosides triphosphates

EDTA : Ethylenediamine tetraacetate

FMC1 : Université des Frères Mentouri Constantine 1

G : Guanine

g : gramme

HCl : Chlorure d'hydrogène

ISSR: Inter Simple Sequence Repeats

Kg : kilogramme

L : Litre

M : Molaire

Mg Cl₂ : Chlorure de magnésium

Mg : milligramme

min : minute

ml : millilitre

NaCl : Sodium Chloride

NaOH : Sodium Hydroxide

ng : nanogramme:

PAGE: Polyacrylamide gel electrophoresis

PVP: Polyvinylpyrrolidone

Pb : paires de bases

pH : pouvoir hydrogène

PIC : Polymorphic Information Content

PCR : Polymerase Chain Reaction

Qx : quintaux (quintal = 100 kilogrammes)

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism

SDS : Sodium Dodecyl Sulfate

SSR: Simple Sequence Repeats

T : Thymine

Taq: *Thermus aquaticus*

TBE: Tris Borate EDTA

TE : Tris-HCl EDTA

TEMED : N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine

μl : microlitre.

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean

V : Volte

LISTE DES FIGURES

Fig 1	Quelques graines de légumineuses	09
Fig 2	Différentes parties de l'espèce <i>Vicia faba L</i>	08
Fig 3	les grains de vesce	09
Fig 4	les gousses de vesce.....	09
Fig 5	<i>Vicia sativa</i> subsp. <i>Cordata</i>	10
Fig 6	<i>Vicia sativa</i> subsp. <i>Nigra</i> (<i>Vicia angustifolia</i>).....	10
Fig 7	Organisation des angiospermes d'après la méthode cladistique.....	11
Fig 8	classification de <i>vicia fabaL.</i> selon Muratova (Guen et Duc .1996).....	12
Fig 9	Evaluation des productions (qx) de la fève par rapport aux autres légumineuses alimentaires en Algérie de 2002 à 2012 (Anonyme, 2013).....	14
Fig 10	Différentes plantules des deux espèces (<i>Vicia faba et Vicia sativa</i>).....	29
Fig 11	Courbe d'étalonnage pour la détermination des concentrations de protéine totale.....	34
Fig 12	Les étapes de dépôt des échantillons et migration dans le gel.....	36
Fig 13	les feuilles des variétés utilisées en extraction d'ADN.....	37
Fig 14	Etapas de l'extraction d'ADN.....	39
Fig 15	Électrophorèse sur gel d'acrylamide.....	45
Fig 16	électro-phorétique des protéines totales des grains de sept variété de <i>vicia faba</i> et <i>vicia sativa</i> ...	46
Fig 17	Gel électro-phorétique des protéines totales de sept variété <i>vicia faba</i> et <i>vicia sativa</i> après traitement avec un système d'imagerie biorad GEL DOC XR+.....	47
Fig 18	SDS-PAGE Dendrogramme de sept variétés de graines de <i>vicia faba</i> et <i>vicia sativa</i> basé sur le modèle de bandes de protéines à l'aide de l'analyse en grappes UPGMA(SM).....	54
Fig 19	Les étapes de test de qualité sur gel d'agarose de 2 %.....	57
Fig 20	Profils électrophorétiques de génotypes de <i>Vicia faba L</i> et <i>Vicia sativa</i> obtenus par l'amorce GA4.et GBSS52.....	58
Fig 21	Profils électrophorétiques des génotypes de <i>Vicia faba L</i> et <i>Vicia sativa</i> . obtenus par l'amorce VFG87 et CAAS2.....	58
Fig 22	Profils électrophorétiques des génotypes de <i>Vicia faba L</i> et <i>Vicia sativa</i> . obtenus par l'amorce	58

	CASS8.et JF1-AG3.....	
Fig 23	Profils électrophorétiques des géotypes de <i>Vicia faba L.</i> et <i>Vicia sativa</i> Obtenus par l'amorce VFG87 et VFG14, Amorce non amplifier.....	59
Fig 24	Taux de polymorphisme détectés pour chacun des loci SSR.....	65
Fig 25	Indice de diversité génétique détectée pour chacun des loci SSR.....	65
Fig 26	Exemples de profils d'amplification SSR générés par les amorces CATA2, C4 et GBSS52.....	67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1	Evaluation de la superficie et production de la fève et féverole en Algérie (Anonyme, 2009) ...	16
Tableau 2	Evolution des fourrages cultivés en Algérie (2005-2015).....	17
Tableau 3	Caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.....	22
Tableau 4	Les caractéristiques du matériel végétal utilisé dans les études biochimiques et moléculaires.....	30
Tableau 5	Dosage des protéines par la technique de Bradford.....	34
Tableau 6	Les composants des deux gels.....	35
Tableau 7	Le mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN par PCR.....	41
Tableau 8	Liste des microsatellites et leurs paires d'amorces utilisées.....	42
Tableau 9	Programme de la PCR pour l'amplification des amorces SSR.....	42
Tableau 10	Température et Cycle d'amplification des sept amorces.....	43
Tableau 11	Etude de l'électrophore gramme.....	48
Tableau 12	Taux de polymorphisme protéique des graines de <i>visia fabaL</i> et <i>vicia sativa</i>	51
Tableau 13	Poids moléculaires et rapports frontaux.....	52
Tableau 14	Indice de similarité SM, des bandes électrophorétiques	53
Tableau 15	Subdivision des groupes.....	55
Tableau 16	Quantités d'ADN extraites chez les différents génotypes étudiés.....	55
Tableau 17	Tailles et fréquences des allèles pour SSR loci analysés sur les deux +- espèces de la fève.....	63
Tableau 18	Fréquences alléliques pour chaque loci SSR.....	64
Tableau 19	Variabilité génétique et taux des hétérozygotes pour chaque amorce.....	66

Sommaire

Résumé	
Liste des abréviations	
Liste des figures et des planches	
Liste des tableaux	
INTRODUCTION GENERAL	01
CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
I- Les légumineuses.....	03
1- Généralités sur les légumineuses.....	03
2- Caractéristiques principales et importance des légumineuses	04
II La fève et la vesce	05
II.1-La fève (<i>Vicia faba</i> L.).....	05
II.2-La vesce (<i>Vicia sativa</i> L)	06
1-Originine géographique	06
2 - Description des plantes	07
3- Classification botanique et génétique.....	09
3.1- Classification Biosystematique (classique et phylogénétique).....	09
3.1 .1- Classification classique	09
3. 1. 2 Classification phylogénétique.....	11
4. Différentes variétés de la fève et la vesce.....	12
5. classification génétique.....	13
6. Intérêts de la fève	14
6.1 Intérêt alimentaire	14
6.2 Intérêt agronomique	15
6.3 Intérêt économique	15
7. Intérêts de la vesce.....	16
7.1 Intérêts économique	16
7.2 Intérêts agronomique de la <i>vesce</i>	17
8. Quelques travaux réalisés sur <i>vicia</i> sp.....	18
III. Techniques d'analyses moléculaires	19
1- Polymorphisme de l'ADN : les marqueurs biologiques.....	19
2- Principaux types de marqueurs moléculaires	21

2.1 Marqueurs d'ADN basés sur l'hybridation moléculaire.....	22
2.2 Marqueurs d'ADN basés sur l'amplification génique in vitro par la technique PCR...	23
3- Les marqueurs protéiques.....	26
4- Applications des marqueurs moléculaires en biotechnologie végétale	27

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

I- MATERIEL.....	29
II- METHODES UTILISEES.....	29
1- Mise en place du semis et préparation des é échantillons.....	29
2- Technique chimique des protéines	31
2-1- Analyse Moléculaire des protéinés	31
2-1-1 l'extraction et électrophorèse des protéines	31
2-1-2 Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE	31
2-1-3 Etapes de l'électrophorèse.....	32
2-1-4 Dosage des protéines par la technique de Brad Ford.....	33
2-1-5 Les concentrations des protéines.....	33
2-1-6 Gel d'électrophorèse des protéines en condition dénaturantes.....	34
3- Technique moléculaire des SSR.....	36
3-1- Extraction de l'ADN à partir des feuilles.....	37
3-2- Test de qualité de l'ADN.....	40
3-3- PCR (polymérase chaine réaction).....	41
3-4- Technique moléculaire des microsattellites(SSR).....	41
3-5- Électrophorèse sur gel d'Acrylamide de Natif A 6%.....	43
3-5-1 Utilisation	43
3-5-2 Composition	44
3-5-3 Préparation.....	44
3-5-4 Traitement des plaques et écoulement du gel	44
3-5-5 Montage de la cuve	44
3-5-6 Migration	44
3-5-7 Révélation	44
4-Traitement des résultats.....	45

CHAPITRE 3 : Résultat et discussion

III.1-Analyse biochimique.....	46
1.1- Paramètres biochimiques : Les protéines totales	46
1.1.1- Etude de l'électrophore gramme	48
1.1-2- Analyse du polymorphisme protéique.....	51
1.1-3-Etude des variabilités biochimiques.....	53
2- Analyse moléculaire	55
2.1- Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN extrait.....	55
2.1.1- Quantification de l'ADN.....	55
2.2- Qualité d'extraction	56
2.3- Electrophorèse sur gel d'acrylamide	59
3- Interprétations des données moléculaires	59
3.1- Les paramètres et relations génétiques des variétés	59
3.2- Test de qualité de L'ADN extrait	61
3.3-Amplification de l'ADN par SSR	61
3.3.1- Amplification par l'amorce CA4.....	61
3.3.2- Amplification par l'amorce GBSS 52.....	62
3.3.3- Amplification par l'amorce CASS8.....	62
3.3.4- Amplification par l'amorce CATA2.....	62
3.3.5-Amplification par l'amorce VFG14 et VFG87.....	62
4- Analyse des données.....	62
4.1- Fréquences alléliques.....	62
5-Analyse du polymorphisme génétique	63
5.1- Polymorphisme information content (PIC)	64
5.2-L'indice de diversité génétique.....	65
6- Profils d'identification des cultivars.....	66
CONCLUSION GENERAL	69
Bibliographie.....	71
Annexes.....	77

Introduction Générale

Introduction Générale

Les cultures de légumineuses fournissent majoritairement des glucides (source d'énergie métabolique) et des protéines (sources d'éléments constitutifs et régulateurs) mais également une panoplie variée, selon les espèces, d'autres éléments (lipides, fibres, éléments minéraux, vitamines) pour l'alimentation des hommes et des animaux. Les légumineuses à graines permettent d'apporter au moins 33% des besoins humains en protéines alimentaires (Vance et al. 2000). En plus, une grande partie des espèces de cette famille (88%) interagissent avec les bactéries dites Rhizobia pour former des nodules fixateurs d'azote ce qui représente un avantage économique pour la fertilisation des sols. La présence de légumineuse dans les systèmes de production agricoles concourt à l'augmentation de la diversité fonctionnelle des agro écosystèmes, ce qui est favorable à la biodiversité des paysages et territoires agricoles ; contribuant aussi à l'équilibre des systèmes agro écologiques.

Parmi les légumineuses, la fève représente une culture importante, est pratiquée dans environ 58 pays (Singh et al., 2012), notamment pour les pays méditerranéens et la Chine (Crépona et al., 2010). Elle est la quatrième culture légumière dans le monde derrière les petits pois les pois chiches et les lentilles (Yahya et al., 2012).

En 2016, la production mondiale de fève était de 4.459.655 tonnes pour une superficie de 2.403.746 ha avec un rendement de 18553 quintaux/ha. Dans les pays d'Afrique du Nord on a produit 371978 tonnes de fèves, soit une superficie de 280661 hectares, avec un rendement de 13254 quintaux / ha (FAOSTAT, 2016).

En Algérie, c'est la légumineuse alimentaire la plus cultivée. La superficie moyenne annuelle consacrée à la culture de la fève est d'environ 35147 ha pour une production totale en grain secs de 37598 tonnes et un rendement de 10697 qx/ha (FAOSTAT, 2016). La production de la fève est aussi largement consommée en Algérie comme légume frais.

Plusieurs auteurs ont étudié la diversité génétique, dans un premier temps par l'utilisation des isoenzymes, mais cette technique a présenté beaucoup de limites : faible polymorphisme, variation des protéines dans les différents tissus de la plante sous l'influence des facteurs de l'environnement et des stades de développement de la plante.

De nos jours, une attention particulière est accordée aux marqueurs moléculaires en tant que source de polymorphisme riche, fiable et stable. Puisque la séquence d'ADN de

chaque individu est unique, elle peut donc être exploitée afin d'étudier la diversité génétique et la parenté génétique entre les populations d'une même espèce.

Le présent travail s'inscrit dans un cadre de projet de recherche portant sur une étude génétique des Fabacées (légumineuses alimentaires), mené au centre de recherche de biotechnologies (C.R.Bt). Nous nous sommes intéressées à l'étude de la variabilité génétique de différentes espèces de *vicia faba* L. et *vicia sativa* L. en utilisant les techniques de marquage biochimique SDS/PAGE et moléculaire, les SSR ou microsatellites .

La variabilité génétique des espèces du genre *vicia faba* et *vicia sativa* , offre un champ d'études génétique très grand.

➤ **Le présent travail a pour objectifs :**

- 1- d'étudier le taux de polymorphisme protéique par de marqueurs biochimiques, basés sur l'électrophorèse des protéines natives pour différencier les 7 variétés appartenant à deux espèces différentes.
- 2- d'analyser et mesurer la variabilité génétique intra et interspécifique, en utilisant les marqueurs SSR.
- 3- détecter la relation entre les deux espèces.

Le manuscrit comporte 3 chapitres :

- Le premier chapitre porte sur une analyse bibliographique de l'espèce d'étude *vicia faba* et *vicia sativa* .
- Le deuxième chapitre est consacré à la méthodologie de travail adopté au laboratoire.
- Le dernier chapitre est consacré aux résultats et discussion.

Et nous clôturons ce travail par une conclusion dont laquelle on récapitule les connaissances acquises lors de ce travail suivis par des perspectives.

CHAPITRE I

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : Revue Bibliographique

I- LES LEGUMINEUSES

1. GENERALITES SUR LES LEGUMINEUSES

Les légumineuses sont l'une des plus importantes familles des dicotylédones. Elle fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales. Elles comprennent des plantes herbacées, des arbres et des arbustes, à feuilles habituellement composées, rarement simples. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles. Les fleurs, pentamères avec 10 étamines ou parfois plus, caractéristiques, ressemblent souvent à des papillons (Wathman, 1967).

Les légumineuses à graines (Figure 1) étaient parmi les premières espèces domestiquées dans le croissant fertile dont on retrouve encore certains restes archéologiques vieux d'environ 12 000 ans pour les plus anciens. Les écrits issus de la Rome antique rapportent de nombreux témoignages de l'utilisation des légumineuses à graines dans les rations alimentaires, qu'il s'agisse des fèves, de la lentille ou du pois (Duc et al., 2010).



Figure 1: Quelques graines de légumineuses.

Leur importance alimentaire est due au fait qu'elles contiennent beaucoup de protéines (deux à trois fois plus que la plupart des céréales) et de calories. De plus, elles contiennent une grande quantité de minéraux essentiels comme le calcium et le fer (FAOSTAT, 2013).

Les plantes de la famille des fabacées (légumineuses) suivent en importance celles de la famille des Poacées, non seulement pour leur contribution à l'alimentation humaine, mais aussi pour leur impact sur l'amélioration des pratiques agricoles dans toutes les régions du monde. En plus, elles sont des plantes annuelles dont les gousses produisent une à douze graines de formes et de couleurs variables. Elles sont utilisées à la fois en alimentation humaine et en alimentation animale.

Le groupe des légumineuses à graines comporte un nombre assez important d'espèces. Citons notamment : la fève et féverole; le pois; le haricot; la lentille; le soja. Chacune de ces espèces fait l'objet de mode de culture et d'utilisation assez varié : soit une culture légumière de plein champ ou maraîchère ou encore une utilisation en sec à maturité totale des fruits et des graines ou bien utilisation en vert au début de la formation des fruits et des graines, et à l'alimentation humaine, directement ou après transformation et enfin à l'alimentation animale, directement ou après ensilage (Moule, 1972).

Les légumineuses sont consommées essentiellement dans les pays en développement, qui absorbent environ 90 % de la production mondiale de légumineuses destinées à l'alimentation humaine. Dans de nombreux pays pauvres, les légumineuses apportent environ 10 % des protéines et 5 % de l'énergie dont la population a besoin (FAOSTAT, 2013) les légumineuses fourragères représentent 27% de la production de culture primaire dans le monde (Vance et al 2000) .Elles ont été la base de la production de viande et de lait pendant des siècles (Russelle 2001) .

Lorsqu'elles sont correctement utilisées, elles représentent de riches sources de protéines, de fibres et d'énergie .même dans l'élevage intensif et la production laitière , ou les cultures de céréales sont d'importantes sources d'alimentation , les légumineuses fourragères sont nécessaires pour préserver la bonne santé des animaux (Wattiaux et Howard 2001) .la viande et la production laitière dans les pays en développement sont presque exclusivement dépendantes des légumineuses fourragères et des graminées.

2. CARACTERISTIQUES PRINCIPALES ET IMPORTANCE DES LEGUMINEUSES

Les légumineuses alimentaires sont considérées comme les plantes à graines les plus cultivées par l'homme et depuis longtemps occupent une place importante, dans l'alimentation humaine. Elles jouent un rôle important dans le développement des économies,

des pays du monde entier (Khaldi et al., 2002). Vu leurs adaptations faciles aux différents milieux, nous pouvons les rencontrer dans la plupart des régions du monde.

L'importance de la famille des légumineuses réside dans leur aptitude à fixer l'azote grâce à une symbiose avec des microorganismes du sol qui sont des bactéries de la famille des rhizobiacées (Wathman, 1967). Par ces nodules, la plante hôte (la légumineuse) offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse, (Lezrak, 2008). Ainsi ces plantes sont capables de s'adapter à des sols très pauvres, et très dégradés. (Wathman, 1967).

Outre ces bénéfices qu'elles entraînent pour l'alimentation et l'environnement, les légumineuses peuvent être utiles dans diverses industries pharmaceutique, alimentaires et chimiques (plastique biodégradable, huile, bio-diésel, colorants, gomme, textile, papier...) (Graham et Vance, 2003).

Bien qu'importantes sur les plans économique, écologique et industriel, les légumineuses cultivées présentent des caractéristiques biologiques qui retardent leur amélioration génétique.

Elles possèdent en général un grand génome, sont souvent polyploïdes et leur transformation par *Agrobacterium* est délicate voire impossible.

II. La fève et la vesce :

II.1-La fève(*Vicia faba L.*)

Les légumineuses alimentaires constituent une grande famille, avec quelques 690 genres et environ 18000 espèces, dont fait partie la fève qui est une plante herbacée annuelle, appartenant à celle des Fabacées (Peron, 2006).

La fève est une plante très riche en protéines et constitue un aliment nutritif très important. Cette culture est très ancienne et largement pratiquée et à travers le monde couvrant environ 2,3 millions d'Ha. La fève est une espèce d'automne qui peut être cultivée comme légume vert ou à l'état sec. Elle est sensible au manque d'eau et à son excès, et exige une alimentation hydrique régulière supérieure à 350 mm/an (Alaoui, 2009).

La culture de la fève est peu exigeante en termes de qualité de sol.

Cependant, elle aime les sols frais, profonds, peu acides, et non compactés. Elle est rustique au froid. (Alaoui, 2009).

La fève (*Vicia faba* L.), en tant que légumineuse, Elle est très appréciée en tant que bon précédent cultural pour la céréaliculture, notamment, via les restes d'azote laissés (Rochester et al., 2001; Diaz- Ambrona et Minguez, 2001; Eltun et al., 2000; Schultz et al., 1999) ou à travers l'amélioration de la structure du sol (Rochester et al., 2001) .

II.2-La vesce (*Vicia sativa* L) :

Les vesces sont cultivées dans différents sols, sauf dans les sols acides et mal drainés sensibles à la sécheresse en début de cycle .il existe des variétés de printemps et d'hiver .

Les vesces n'ont pas besoin de fumure azotée, mais les coûts ensemences sont plus élevés que chez les crucifères. Par exemple, en Belgique, les vesces sont exclusivement semées comme engrais verts. Dans les périodes de sécheresse, la couverture du sol est souvent faible(Panne coucque , J, Van Waes.,2014).

La culture de vesce donne plusieurs type de produits : des fourragères ,des engrais vert ou des grains . La vesce commune (*Vicia sativa*) est la plus répandue est la légumineuse la plus utilisée en interculturel souvent en association avec des graminées. Parmi les légumineuses, les vesces sont appréciées car leurs semences de taille modérée limitent les quantités à semer et facilitent les mélanges, comme toutes légumineuses (ARVALIS.INFAS.FR.,2012).

1. ORIGINE GEOGRAPHIQUE

Le nom *Faba* provient de l'une des formes du verbe grec wagev - " manger " - qui met en évidence son utilisation pour l'alimentation et la nourriture pour les anciens Grecs et les Romains (Muratova, 1931, Hopf 1973). Malgré de nombreuses études, on sait peu de l'origine et de la domestication de fève (Maxtedet al., 1991).

La fève aurait été cultivée dès la fin du néolithique, elle a constitué durant toute l'antiquité et le moyen âge, une base alimentaire importante jusqu'au développement du haricot et de la pomme de terre (Hullé et al ; 1999).

D'après (Saxena1991), la fève a été domestiquée très tôt dans le monde. Bien que son origine ne soit pas encore claire, il a été longtemps pensé qu'elle était originaire de la méditerranée ou d l'Asie de l'ouest. D'autres auteurs comme (Nuessly et al.2004) ; (Mikic2011), la Considèrent originaire d'Asie centrale.

Cependant, de récentes découvertes archéologique à Tell el-kerkh de le Nord-ouest de la Syrie ont montré que la fève daterait de la fin du 10ème millénaire avant J-C, ce qui indique que l sud-ouest de l'Asie est le principal centre d'origine et de diversité de *v.faba L.* (Duc et al., 2010).

Selon (Cubero, 2011), le centre d'origine de *Vicia faba.* serait le Proche-Orient, cette plante aurait été disséminée d'abord vers l'Europe centrale et la Russie puis vers l'est de la méditerranée et à partir de l'Egypte et les cotes arabes vers l'Abyssinie puis de la Mésopotamie vers l'Inde et la Chine. Au cours du 16ième siècle, la culture de la fève a été introduite en Amérique par les Espagnoles et vers la fin du 20ième siècle, elle réussit à atteindre l'Australie.

La forme ancestrale de *Vicia faba.* est inconnue, mais le plus proche parent sauvage de la fève est supposé être l'espèce *vicia pliniana* d'Algérie (Duc et al., 2010).

Selon (Bouby L et al 2006), Les débuts de la culture de la vesce commune sont mal connus. Sa domestication a pu intervenir en diverses régions. De rares graines de vesce sont présentes dans des sites néolithiques ou légèrement antérieurs, mais des preuves de mise en culture ne semblaient pas exister avant l'époque romaine. Le site néolithique de Claparouse montre l'utilisation et la probable culture de la vesce il y a environ 6000 ans.

Si cette légumineuse est aujourd'hui seulement une plante fourragère, elle était plus vraisemblablement employée dans l'alimentation humaine au Néolithique. Il n'est pas possible de préciser si la vesce cultivée a été introduite en Europe occidentale depuis le Proche-Orient ou si elle a été domestiquée localement.

2 . DESCRIPTION DES PLANTES

La fève est une plante herbacée annuelle présentant une tige simple, dressé, creuse et de la section quadrangulaire, pouvant se dresser à plus d'un mètre de hauteur. Les feuilles, alternes de couleur vert ou grisâtre, pennées, composées, constituées par plusieurs folioles larges et ovales (Figure 2) (Chaux et Floury, 1994).

Selon (Maoui et al., 1990), la fève possède des inflorescences en grappes de 4 à 5 fleurs en moyenne. Les fleurs sont de couleur blanche ou faiblement violacée (Chaux et Floury, 1994). Les fruits sont des gousses pendantes noircissant à la maturité. (Laumonier,

1979). Les graines sont charnues, vertes et tendres à l'état immature. À complète maturité, elles développent un tégument épais et coriace de couleur brun-rouge, à blanc verdâtre et prend une forme aplatie à couleur presque circulaire (Chaux et Floury, 1994).

Les vesces (*vicia L.*) sont des herbacées dont les plantes matures sont souvent grimpantes Grâce à leurs vrilles caractéristiques. Les tiges ne sont pas ailées, ce qui permet généralement de les différencier des gesses (*Lathyrus L.*). les fleurs sont des papilionacées composées de cinq pétales (un étendard, deux ailes et une carène comprenant deux pétales soudés), solitaires ou en racèmes. Les fruits sont des gousses contenant des graines (Figure3) et (Figure 4).



Figure 2: Différentes parties de l'espèce *Vicia faba L.*



Figure 3 : les grains de vesce



Figure 4 : les gousses de vesce

3. Classification botanique et génétique

3.1 Classification Bio systématique (classique et phylogénétique)

3.1 .1 Classification classique :

Décrite par Linné en 1753, la *fève Vicia faba L.* est une plante dicotylédone herbacée originaire d'Asie ou du Moyen-Orient. Et d'après (Dajoz2000), la fève est classée comme suit:

Embranchement	:	Spermatophytes
Sous-embranchement	:	Angiospermes
Classe	:	Dicotylédone
Série	:	Calciflores
Ordre	:	Rosales
Famille	:	Légumineuses
Sous famille	:	Papilionadeae
Genre	:	<i>Vicia</i>
Espèce 1	:	<i>Vicia faba</i>
Espèce 2	:	<i>Vicia sativa</i>

La *Vicia sativa* comporte deux sous espèces :

✚ ***Vicia sativa subsp. (Vicia Cordata)*** :

Cette sous-espèce se distingue par ses feuilles supérieures à vrille simple et folioles étroites, différentes des feuilles inférieures dépourvues de vrilles et à folioles en coeur. On la

rencontre dans les pelouses sèches et les bois de la région méditerranéenne (**Figure 5**).



Figure 5 : *Vicia sativa* subsp. Cordata

Vicia sativa subsp. Nigra (*Vicia angustifolia*) :

Cette sous-espèce est commune dans l'Est et le Sud-Est où on la rencontre dans les prés secs et parmi les buissons. Elle se fait remarquer par ses feuilles terminées par une vrille ramifiée et divisées en folioles très étroites et par ses petites fleurs dont l'étendard est bien redressé (**Figure 6**).



Figure 6: *Vicia sativa* subsp. Nigra (*Vicia angustifolia*)

3. 1. 2 Classification phylogénétique

- La classification APG III (2009), décrite par les auteurs : Birgitta Bremer et al.
- La classification APG IV (2016), par les auteurs : James W. Byng, et al.

Règne : Plantae

Clade : Angiospermes

Clade : EuDicotylédones

Clade : Rosidées

Clade : Faboidées

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre : *Vicia*

Espece1 : *Vicia faba*

Espece2 : *Vicia sativa*

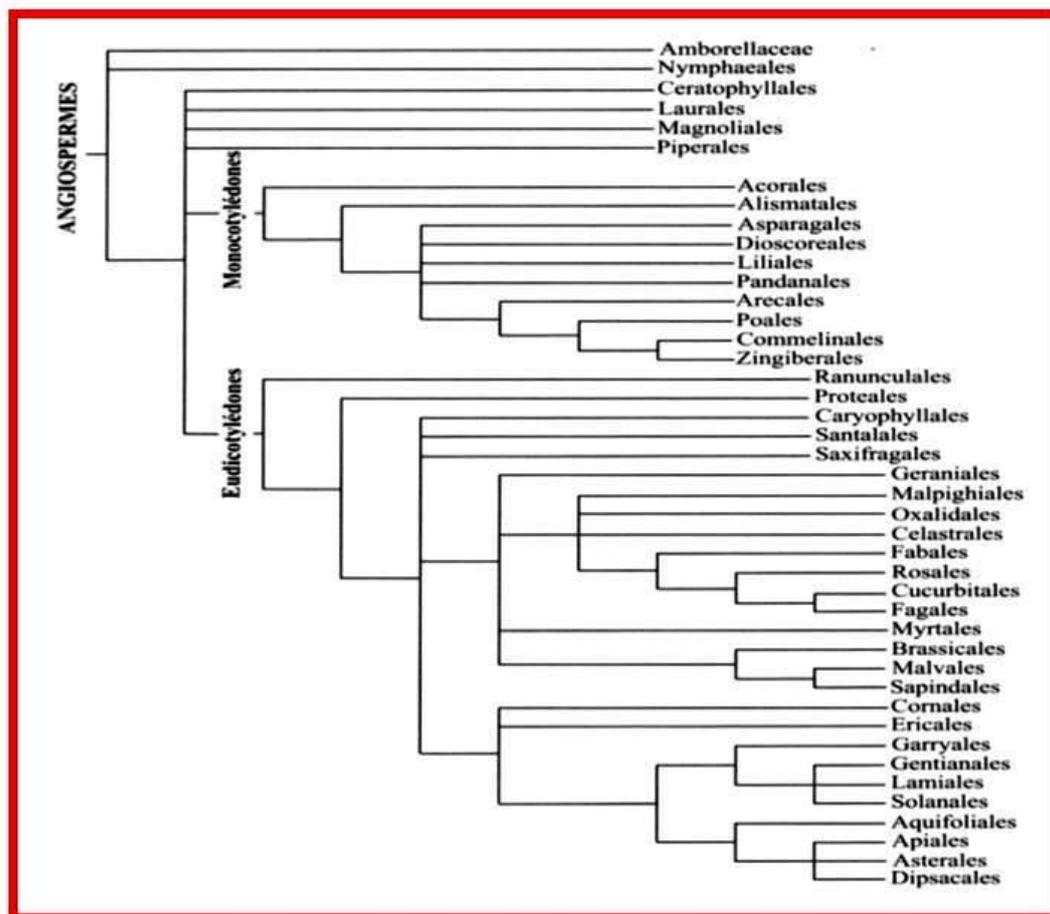


Figure 7 : Organisation des angiospermes d'après la méthode cladistique

4. Différentes variétés de la fève et la vesce

Il existe deux sous-espèces, *paucijuga* et *eu-faba*. Dans la sous-espèce *eu-faba* qui nous intéresse, on dénombre trois groupes définis par la taille des graines (Figure 8)

- ***Vicia faba major***: les grains sont de grosses tailles larges et plates, les gousses sont très longues (nombre d'ovules de 8 à 13) aplaties et souvent recourbées en sabre. La fève est destinée à la consommation humaine.
- ***Vicia faba minor*** : Avec des grains ovoïdes, réguliers et lisses et des gousses cylindrique et courtes (nombre d'ovules de 2 à 3). La féverole est utilisée pour principalement l'alimentation du bétail .
- ***Vicia faba equina*** : les gousses de la févette sont plus aplatie longue avec un nombre d'ovules de 3 à 4. La taille des grains est moyenne.

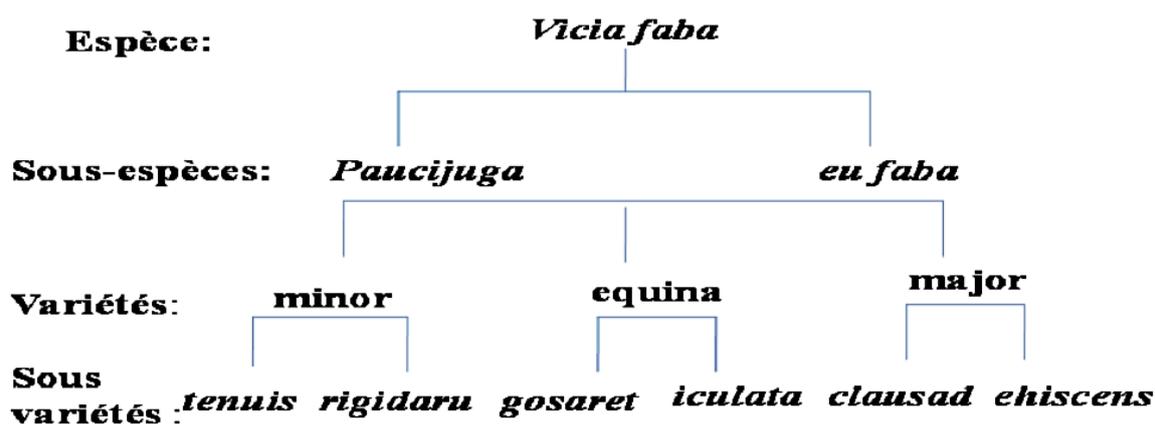


Figure 8: classification de *vicia faba* L. Selon Muratova (Guen et Duc .1996)

- Quelques variétés de la fève(*vicia faba* L.) et la vesce sont décrites de la façon suivante :

Aguadulce ATLC :

Elle est cultivée depuis l'Antiquité. La variété d'Aguadulce est une amélioration de la fève de Séville à longue gousse. C'est une plante annuelle, les premières fleurs apparaissent au niveau de la dixième feuille. La fève aguadulce est une variété productive à cycle court adapté pour la culture en pot. La fève produit des longues gousses avec 9 ou 10 grains à l'intérieur. Son origine botanique n'est pas très précise mais elle est maintenant cultivée partout dans le monde. Très appréciées en Amérique du Sud, elles sont aussi la base de certains plats orientaux.

Histal :

D'une manière générale, cette culture est utilisée pour l'alimentation des bétails elle est de petite taille. Avec des grains ovoïdes, réguliers et lisses et des gousses cylindriques et courtes.

Vesce Mariana :

La vesce commune de printemps est une légumineuse des plus utilisées en interculturel. Cette espèce est utilisée la plus part du temps en association avec une graminée comme l'avoine Rude, la variété *Mariana* se démarque par sa vigueur et sa vitesse de développement. Elle est considérée comme un très bon choix en légumineuse pour les semis tardifs. Elle peut-être utilisée aussi bien en ensilage qu'en enrubannage ou en foin mais cependant son cycle ne permet qu'une seule coupe, elle est appétente, digestible et très riche en fibre.

5. classification génétique

L'espèce *Vicia sp* est une espèce dont son ancêtre est inconnu au cours des 50 dernières années (l'ancêtre sauvage n'a pas pu être identifié) (Zohary et al, 2012), de nombreux types morphologiques classés en différentes sous-espèces ou variétés, appelées « fèves » et « féveroles ». Les caryotypes des variétés constituent chacun, un génome qui regroupe 6 ou 7 paires chromosomiques. Donc c'est une espèce diploïde, dont le nombre de base est différent ($x=6$ et $x=7$) ($2n = 12$ ou $2n = 14$).

Pour la *Vicia sativa* est une espèce diploïde qui compte 6 paires de chromosomes $2n = 2x = 12$ (Gedik et al. 2013).

- **Cette variation est –elle due à une aneuploïdie ou une dysploïdie**

La Dy ploïdie représente un changement du nombre chromosomique de base, ce changement peut se produire soit dans le sens d'une augmentation (dysploïdie ascendante), soit d'une diminution du nombre de base (dysploïdie descendante) a cause d'une translocation intra- et inter-chromosomique, délétion ...) Chez les plantes ce dernier cas semble être le plus fréquent). Cette hypothèse serait confirmée par l'application des techniques plus approfondies (marquage par des bandes et moléculaires). (Bentama et Boursas,2016).

6. Intérêts de la fève :

6.1 Intérêt alimentaire

L'utilité de la fève dans l'alimentation humaine et animale comme source de protéines ainsi que leur effet bénéfique sur la fertilité des sols sont largement reconnus. L'utilisation de la fève est principalement orientée vers la consommation humaine en gousses fraîche à grande proportion et sous forme de graines secs ou au stade pâteux à faible proportion. Lors d'abondance le surplus des graines de fève incorporé dans la composition d'aliments du bétail (Maatougui, 1997).

La féverole, en revanche, lorsqu'elle est disponible, est strictement utilisée pour l'alimentation du bétail en graines concassées destinées aux bovins surtout pour l'engraissement.

La fève peut être aussi utilisée en engrais vert dans les vergers (Maatougui, 1996) Pour sa valeur alimentaire; La fève est considérée parmi les cultures les plus riches en matières nutritives.

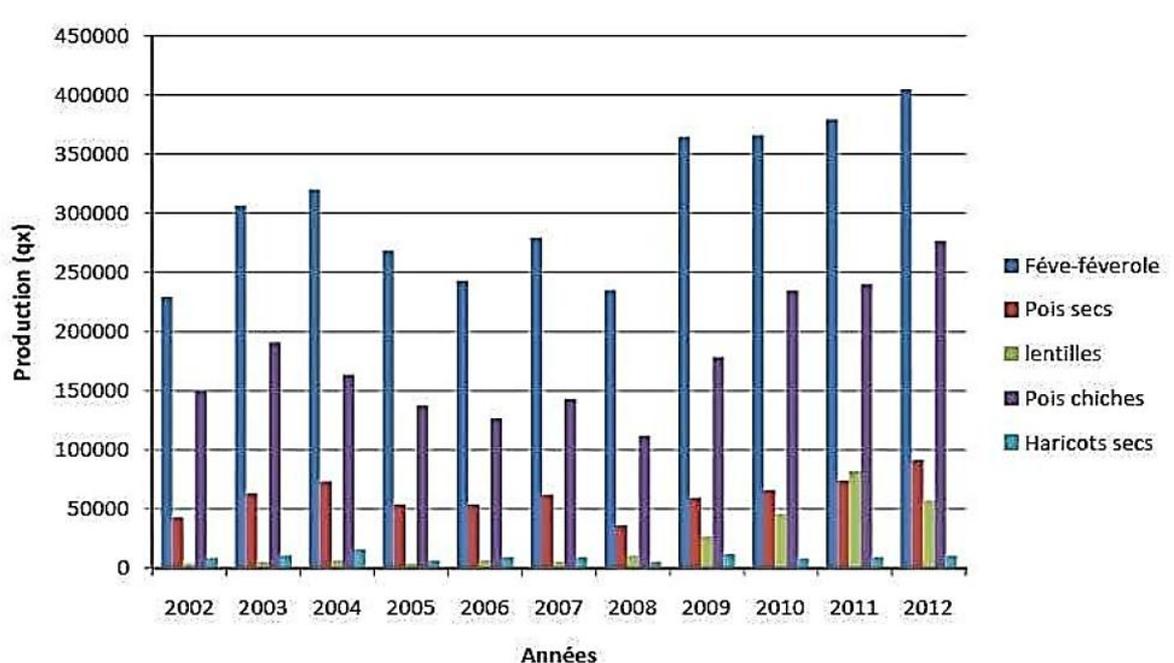


Figure 9 : Evaluation des productions (qx) de la fève par rapport aux autres légumineuses alimentaires en Algérie de 2002 à 2012 (Anonyme, 2013)

6.1 Intérêt alimentaire :

La production de la fève est utilisée pour la consommation humaine, la consommation animale et l'exportation. La quantité de fève consommée est d'environ 2,4 kg par personne et par an. Elle dépasse le niveau de consommation des autres légumineuses alimentaires (Fatemi, 1996).

Selon (Gordon, 2004) et (Daoui, 2007), cette légumineuse a une teneur en protéine élevée et est une excellente source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines (B9 et C) et de minéraux (en particulier le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc).

- **Riche en protéines végétales (8g/150g), et en fibres (10g/150g), la fève** participe à une alimentation saine et équilibrée. Ce qui permet de couvrir un tiers des besoins Journaliers recommandés.

- **Riche en vitamines et minéraux. Une portion de 150g de fèves contribue en 34 % en vitamine B5, 28 % en vitamine B9 et 2 % en vitamine C des besoins journalières recommandés.**

Concernant les minéraux, la même portion de fèves couvrent 15% en fer pour l'homme et 8% pour la femme, 6 à 8% en magnésium et 4% en calcium en besoins journalières recommandés. Les apports vitaminiques et minéraux sont encore plus élevés quand la fève est consommée à l'état sec. (<http://sante.planet.fr/dictionnaire-de-la-nutrition-feve.738.380.html>).

6.2 Intérêt agronomique :

L'espèce *Vicia faba* comme toutes les légumineuses alimentaires, contribue à l'enrichissement du sol en éléments fertilisants, dont l'incidence est positive sur les performances des cultures qui les suivent, notamment le blé (Khaldi et al, 2002). En plus de son intérêt nutritionnel, elle est introduite en rotation avec les céréales, où elle joue un rôle non négligeable dans l'enrichissement du sol en azote (Rachef et al, 2005).

Selon (Hamadache, 2003), la fève améliore la teneur du sol en azote, avec un apport annuel de 20 à 40 kg/ha ; elle améliore aussi sa structure par son système racinaire puissant et dense. Les résidus des récoltes enrichissent le sol en matière organique.

6.3 Intérêt économique :

La fève (*vicia faba L.*) est la principale légumineuse alimentaire cultivée en Algérie (INRA, 2007). Elle constitue une importante ressource socio-économique.

La culture de la fève et la fèverole en Algérie n'ont pas encore bénéficiées de toute l'attention nécessaire devant assurer leur développement et continuent d'être

marginalisées à tel point que des régressions importantes en superficies ont été enregistrées depuis 1987.

D'autre part, la productivité et la production (faible) n'ont pas connu d'amélioration ce qui a engendré le recours aux importations pour satisfaire la consommation qui elle a nettement augmentée (Maatougui, 1997). (Tableau 01)

Sa culture est pratiquée essentiellement au niveau des plaines côtières et de l'intérieur et dans les zones sahariennes. En Algérie, la fève est retenue surtout pour la consommation humaine sous forme de gousses fraîches, ou en grains secs. En cas de fortes productions, l'excédent en grains secs peut être incorporé dans l'alimentation du bétail (Maatougui 1996).

Tableau 01 : évaluation de la superficie et production de la fève et féverole en Algérie
(Anonyme, 2009)

Compagne agricole	Superficie (ha)	Production(qx)	Rendement (qx/ha)
1999-2000	34250	128950	3.8
2000-2001	31450	212300	6.8
2001-2002	33610	229330	6.8
2002-2003	34050	307000	9.0
2003-2004	36777	320530	8.7
2004-2005	35082	268860	7.7
2005-2006	33537	242986	7.2
2006-2007	31284	279735	8.9
2007-2008	30688	235210	7.7
2008-2009	32278	364949	11.3
Moyenne	33300.6	258985	7.79

7- Intérêts de la vesce

7.1 - Intérêts économique :

- 1- En Algérie

Les espèces fourragères cultivées ne dépassent pas la dizaine d'espèces, alors que la flore renferme un immense potentiel d'espèces pouvant faire l'objet de culture ou d'introduction au niveau des jachères et / ou dans la réhabilitation des terres de parcours ou des zones dégradées.

Les cultures fourragères prennent de plus en plus d'importance ces dernières années. Cela est dû à la résorption progressive de la jachère. Par ailleurs, cette tendance est encouragée par la forte rentabilité des productions animales.

Ces cultures sont passées de 187000 ha en 1972 à 350000 ha en 1979. Elles représentent cependant moins de 10% des cultures au niveau national. Les besoins en

protéines animales et donc en fourrages font que les cultures fourragères sont nettement insuffisantes pour assurer un bon approvisionnement du cheptel. Toutefois, la production des fourrages a repris depuis l'année 2005 dont les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous:

Tableau 2: Evolution des fourrages cultivés en Algérie (2005-2015)

Algérie	Superficie (ha)	Production (t)	Rendement (t/ha)
2005	394849	86236.50	2.1840
2006	500668	82034.30	1.6384
2007	401340	10167.350	2.5333
2008	489454	74476.75	1.5216
2009	296277	11585.391	3.9103
2010	548232	12885.130	2.3503
2011	407533	10765.180	2.6415
2012	490589	12740.400	2.5969
2013	539184	13248.545	2.4571
2014	769969	17859.727	2.3195
2015	650651	16901.827	2.5976

Le tableau ci-dessus montre que les superficies en fourrages fluctuent d'une année suite aux conditions météorologiques instables qui ont prévalu durant ces dernières années. Toutefois, nous constatons que l'année 2014 a enregistré la superficie la plus importante à soit près de 700.000 Ha avec un rendement moyen égal à 2,32 t/Ha. En plus de la faiblesse de la disponibilité, la qualité du fourrage laisse à désirer et constitue une contrainte de taille pour l'élevage bovin laitier. La majeure partie du fourrage (70%) est composée par des espèces céréalières (orge,avoine...). La luzerne, le trèfle d'Alexandrie et les orgho, n'occupent que très peu de surfaces. La faible pratique de l'ensilage contribue aussi à la médiocrité de la ration alimentaire du cheptel.

7.2 Intérêts agronomique de la vesce :

Plus particulièrement l'association vesce avoine-blé. Ces plantes améliorent Les Légumineuses sont des bon présidents culturaux pour les céréales et la texture et la structure du sol. Elles envahissent le sol en matières organiques et en azote. Les légumineuses peuvent concurrencer les mauvaises herbes grâce à leur développement accéléré.

L'association blé vesce doivent être récolté avant la maturité des graines de la vesce pour éviter la chute des graines qui seront des mauvaises herbes pour la culture présidente (Hamadache, A., 2000).

8. Quelques travaux réalisés sur *vicia sp*

Des études menées en Asie, en Amérique et dans certaines parties de l'Europe (Ampomah et Huss-Danell 2016) confirment que le genre *Vicia* constitue le plus grand apport de l'azote dans l'écosystème terrestre et a donc une grande importance agricole et écologique (comme un pont vert pour nettoyer les environnements pollués), car le N est souvent un nutriment limitant pour la croissance durable des plantes dans de nombreux écosystèmes (Ampomah et Huss-Danell 2016). L'interaction symbiotique a lieu entre *Vicia* spp et les bactéries du sol appelées collectivement rhizobiums. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Rlv) a été reconnu comme le symbiote le plus commun de *Vicia* spp .

Les premières recherches sur ces plantes datent de la première moitié du XIXe siècle, alors qu'elles visaient à étudier les aspects physiologiques et morphologiques de l'espèce, en particulier de *Vicia faba*. Ils sont notamment devenus un important couvert végétal avec des caractéristiques pour l'agriculture biologique. En revanche, des études sur leur capacité à faire face aux polluants environnementaux ont commencé à apparaître au début du XXIe siècle (Radwan et al.2005; Srivastava et al.2005).

À ce moment, leur tolérance aux différents contaminants a été évaluée, ainsi que les changements physicochimiques et biochimiques qui se sont produits comme réponse adaptative à ces contaminants.

D'autres travaux réalisés (Wiesmeier et al. 2015)(Trenton et al.2018)Le couvert végétal des légumineuses telles que les espèces de *Vicia* peuvent fixer l'azote atmosphérique sous la forme disponible pour les plantes, l'ammonium. À la fin , le résidu se décompose et libère l'azote disponible pour la culture de rente suivante. Une stratégie intéressante est donc l'utilisation du couvert végétal, en particulier de légumineuses comme engrais vert. Les engrais verts actuellement utilisés dans l'agriculture améliorent donc non seulement les propriétés du sol, mais peuvent également réduire considérablement la quantité d'engrais inorganiques nécessaires à la culture de rente suivante.

L'une des couverts végétaux les plus prometteuses est *V. villosa* (vesce velue), qui est largement utilisée dans les environnements tempérés semi-arides (Renzi et al. 2014; Renzi et al. 2016). Il forme un couvert avec de multiples avantages pour l'agriculture durable: il facilite la fixation biologique de l'azote atmosphérique, favorise le contrôle des mauvaises herbes et améliore l'équilibre du carbone.

De plus, il améliore l'état structurel du sol, augmente sa capacité de rétention d'eau et empêche son érosion (Lardone et al. 2013; Renzi et al. 2014). Ce dernier phénomène est l'une des plus grandes préoccupations affectant la productivité agricole et l'environnement (Baldwin et Creamer 2006), car il réduit la couche arable (Trenton et al. 2018). La couverture fournie par *V. villosa* peut partiellement l'empêcher en protégeant le sol pendant la saison des pluies. Un autre avantage important de cette culture offre son potentiel naturel élevé de réensemencement, un trait agronomique souhaitable qui pourrait réduire les coûts de production (Renzi et al. 2014).

III- Techniques d'analyses moléculaires

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

1 -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, 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 nucleotide polymorphism (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 moléculaires sont qualifiés de mono locus et souvent codominants. Il faut également distinguer parmi ces techniques celles qui nécessitent uniquement une extraction de l'ADN des individus étudiés de celles qui nécessitent une amplification in vitro d'une portion définie d'ADN par PCR (polymérase Chain réaction).

- Qu'est-ce qu'un marqueur moléculaire ?

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

Un marqueur génétique « idéal » doit être :

a. Polymorphe : la « matière première » du généticien est la variabilité.

b. Multi-allélique.

c. Co-dominant : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes ; il peut donc être distingué de chacun des homozygotes parentaux.

d. Non épistasique : son génotype peut être « lu » à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus. La codominance et la non épistasie peuvent être respectivement définies comme l'absence d'interactions intra et inter locus.

e. Neutre : une substitution des allèles au locus marqueur n'a pas d'autres effets phénotypiques que ceux qui permettent de déterminer son génotype; un marqueur neutre révèle, directement, les modifications génétiques qu'elles se traduisent ou non par une modification phénotypique.

f. Insensible au milieu : Le génotype peut être déduit du phénotype indépendamment du milieu. (De Vienne et al., 1998) (Ferreira et Grattapaglia 1998),

g. Facilement observable et sans ambiguïté,

h. Reproductible d'une expérience à une autre (Ferreira et Grattapaglia 1998),

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

2- Principaux types de marqueurs moléculaires

Selon la technique de mise en évidence utilisée, les marqueurs d'ADN peuvent être classés en deux catégories :

- **Marqueurs d'ADN basés sur l'hybridation moléculaire : RFLP**
- **Marqueurs d'ADN basés sur l'amplification génique in vitro par la technique PCR (Polymérase Chain Réaction) comme la RAPD, l'AFLP, les SCAR, l'ISSR, les SSR, la SNP, etc.**

Tableau 3 : Caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.

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

2. 1- Marqueurs d'ADN basés sur l'hybridation moléculaire

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism:

Le polymorphisme de longueur de fragment de restriction est basée sur le principe de L'hybridation moléculaire. Il est généré suite à l'hydrolyse par une endonucléase de restriction. Le polymorphisme est révélé après hybridation d'une sonde

marquée sur les fragments séparés par électrophorèse sur gel et transférés sur membrane par technique de Southern.

La technique RFLP repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par l'ADN. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un ADN sonde, provenant souvent de banques de ADN génomique ou complémentaire. Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier. Par exemple, un événement simple comme la substitution d'un seul nucléotide peut distinguer entre deux génotypes. Quand une substitution de base élimine un site de restriction, il modifie la longueur de fragment d'ADN qui peut être détectée par cette méthode.

Elle représente donc un marqueur discret qui est directement représentative du génotype d'un individu. (Melake, 2000).

Si deux individus diffèrent par un ou plusieurs sites ou, même, par la distance séparant deux sites identiques, il se crée une différence dans la longueur des fragments générés par l'enzyme de restriction. Les milliers de fragments obtenus après digestion enzymatique sont révélés par le bromure d'éthidium (BET).

Cette technique est robuste et facilement transférable entre les laboratoires, mais elle a aussi des limites. La première limite est la quantité d'ADN requise (50m-200 microgrammes d'ADN par individu) pour générer une empreinte génétique de l'ensemble du génome. L'extraction d'ADN à grande échelle est fastidieuse et laborieuse. (Najimi et al., 2003).

Le principe de base de cette méthode consiste :

- 1- Extraction de l'ADN;
- 2- Digestion de l'ADN au moyen d'enzymes de restriction (endo nucléases);
- 3- Séparation (selon la taille) et visualisation des fragments ainsi obtenus par électrophorèse;
- 4- Transfert et hybridation des fragments séparés avec des sondes marquées (southern blot).

2.2 Marqueurs d'ADN basés sur l'amplification génique in vitro par la technique PCR

En revanche, d'autres techniques nécessitent de petites quantités d'ADN génomique brut à partir de chaque échantillon. Les résultats peuvent être obtenus en peu de temps. Le matériel de laboratoire nécessaire n'est pas cher. Ces techniques ne sont pas

techniquement difficiles. Ces techniques basées sur la détection de l'ADN marqueurs, sont beaucoup plus rapides et plus simples que la technique RFLP.

Le but de la réalisation de PCR est pour d'obtenir par répllication in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. L'ADN matriciel peut tout autant être de l'ADN génomique que de l'ADN complémentaire obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messagers (ARN poly-A), ou encore de L'ADN mitochondrial.

- Les microsatellites: (Simple Séquence Repeat, SSR)

Les microsatellites sont de courts segments d'ADN composés de séquences répétées en tandem d'un motif de 2 à 6 paires de bases (suivant les définitions) que l'on peut amplifier par PCR. Le polymorphisme détecté est un polymorphisme de longueur: Un allèle donné correspondra le plus souvent à un nombre de répétition (en théorie) déduit de la taille d'amplification (en pratique) (Arnaud, 2006).

Autrement dit les microsatellites ou SSR (Morgante et Olivieri, 1993), sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires 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 répétition constituant le microsatellite. L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'acrylamide. Si les SSR constituent de bons marqueurs moléculaires (reproductibles, Co-dominants et facilement utilisables), leur caractérisation initiale est toutefois assez lourde. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage de ces éléments répétés.

Ces répétitions sont très polymorphes, même parmi les cultivars étroitement liées, en raison de mutations qui provoquent des variations dans le nombre d'unités répétitives.

Contrairement aux autres techniques de marqueurs basés sur la PCR, les microsatellites sont hérités de façon co-dominant. Cela permet de discriminer entre homozygote et l'état hétérozygote, et augmente l'efficacité de la cartographie génétique et les études de génétique des populations. (Melake, 2000).

- RAPD: Random-Amplified Polymorphic DNA :

La technique RAPD est l'une des méthodes les plus utiles pour identifier le polymorphisme génétique d'organismes vivants (Hartl, 1988 ; Williams et al., 1990) ont décrit

un nouveau marqueur génétique inspiré de la PCR permettant l'amplification au hasard de segments d'ADN de l'ordre du nano-gramme en utilisant une seule amorce de petite taille (généralement 10 nucléotides).

Ils ont appelé cette technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire) ou AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) développée simultanément par Welsh et McClelland (1990). La technique RAPD est une méthode simple qui consiste en une amplification enzymatique de l'ADN à l'aide d'amorces de petite taille choisie aléatoirement. Elle demande peu d'investissement technique et permet d'obtenir rapidement des fragments variés d'ADN génomique fournissant beaucoup de polymorphisme (Lynch et Milligan, 1994; Hadrys et al., 1992). Les produits d'amplification sont généralement séparés sur gel d'agarose et révélés avec du bromure d'éthidium (Bardakci, 2001).

Les conditions de préparation des échantillons et des cycles de PCR doivent être optimisées pour chaque application afin d'assurer la reproductibilité des résultats (Tagu & Moussard, 2003). Le polymorphisme, de la présence ou l'absence des fragments, est donc étudié chez les différents individus de la population.

Chez la plupart des organismes, il est courant d'identifier un grand nombre de RAPDs qui peuvent servir de marqueurs génétiques dans différentes sortes d'études génétiques (Hartl, 1988). Dans une réaction RAPD, l'unique espèce d'amorces est liée à l'ADN génomique en deux sites différents et opposés sur les brins de l'ADN matrice.

L'amplification donne beaucoup de fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 100 pb à plus de 2 kb. Ces fragments sont anonymes en ce sens que leurs origines génomiques ne sont pas connues. Les différences dans le fragment modèle amplifié à partir de chaque échantillon d'ADN génomique sont généralement attribuées à une mutation à des sites de liaison d'amorces. (Melake, 2000).

- AFLP: Amplification Fragment Length Polymorphism

Cette technique partage certaines caractéristiques avec les deux autres techniques qui sont la RFLP et la RAPD. Le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification signifie l'amplification d'ADN génomique par PCR après digestion avec une (ou deux) enzymes de restriction et ligation d'un adaptateur d'environ 20 paires de bases. Les amorces sont constituées de l'adaptateur plus 3 bases aléatoires en 3' (Vos et al., 1995; De Vienne et al., 1998).

AFLP combine la spécificité de l'analyse de restriction avec l'amplification PCR. La variation de la séquence détectée est la même que celle détectée par analyse RFLP, mais le nombre de polymorphismes détectés par cette analyse est plus élevé (Melake, 2000). Cette méthode est conçue pour amplifier le produit d'ADN digéré par les enzymes de restriction (Vos et al., 1995). Habituellement, deux enzymes de restriction, un coupeur rare et un coupeur fréquent, sont employées en association pour digérer l'ADN génomique. Les fragments d'ADN produits ainsi sont ligaturés avec des adaptateurs possédant des séquences bi caténares (Ribaut et al., 2001).

Les produits amplifiés sont alors révélés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. En général, de 75 à 150 fragments sont amplifiés avec chaque combinaison d'amorces, et que chaque fragment correspond à un site unique, la proportion du génome dosé avec chaque combinaison d'amorces est beaucoup plus élevée que toute autre méthode d'analyse de l'ADN (Melake, 2000).

Les marqueurs moléculaires se différencient par leur niveau de fiabilité, du coût et de la complexité de la procédure de laboratoire. Le Tableau 3 présente les caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.

3- Les marqueurs protéiques :

Pour les marqueurs moléculaires basés sur le polymorphisme protéique, la technique la plus utilisée est la séparation des protéines par électrophorèse. La majorité des marqueurs protéiques est représentée par les isoenzymes, bien que certains travaux se soient basés sur les protéines solubles.

L'électrophorèse des isoenzymes a été appliquée à plusieurs organismes : bactéries, animaux ainsi que les plantes, et ce depuis les années soixante (May, 1992). Les travaux relatifs à ce genre de marqueurs ont concerné différents domaines de la physiologie, la biochimie, la génétique, et l'amélioration ainsi que d'autres aspects comme la structure des populations, la systématique...etc. (Harris, 1969 ; Lewontin & Hubby, 1966 ; Murphy et al., 1990).

L'analyse isoenzymatique est relativement simple et facile à réaliser. Un extrait de tissu de la plante est préparé puis soumis à une électrophorèse sur un gel d'amidon ou de polyacrylamide. Les protéines de cet extrait vont migrer sur le gel selon leur poids moléculaire, sous l'effet du courant électrique, puis chaque isoenzyme est révélée par une coloration spécifique.

Les marqueurs protéiques peuvent être analysés à un stade très jeune de la plante et leur majorité présente un mode d'héritabilité codominant. Cependant ils sont parfois affectés par les facteurs de l'environnement et leur nombre est limité.

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

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

Le processus démarre avec une augmentation de température généralement entre 90 et 95°C pour dénaturer ou séparer les deux brins d'ADN. Puis la température est ramenée approximativement entre 35 et 70°C, afin que les amorces trouvent les emplacements cibles. Une fois l'hybridation réalisée, la copie par la Taq polymérase commence.

La température est ensuite remontée pour entamer un nouveau cycle, lequel sera répété un certain nombre de fois selon les nécessités de l'étude et la technique à employer. On obtient finalement un produit spécifique amplifié, lequel sera révélé par électrophorèse sur gel (Vekemans et Jacquemart, 1997, De Vienne 1998, McPherson et Moller, 2000).

4- Applications des marqueurs moléculaires en biotechnologie végétale :

Les marqueurs moléculaires ont été appliqués diversement, dans la génétique des populations, l'écologie et la systématique, la caractérisation des espèces, la cartographie des gènes. Également, en sélection assistée par les marqueurs moléculaires qui sont largement décrits dans la littérature.

Mais les deux principales applications des marqueurs moléculaires sont la cartographie des gènes et le marquage de caractères d'intérêt agronomique ou autres, ainsi que l'étude de la diversité génétique (Caetano-Anollés & Gresshoff, 1998). Parmi toutes les approches développées jusqu'à aujourd'hui pour l'estimation de la diversité génétique, au sein des populations des plantes, les méthodes moléculaires apparaissent

extrêmement prometteuses, comme démontré par plusieurs travaux de recherches sur différentes espèces végétales (Weising et al.,1995) .

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

I- MATERIEL

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué des variétés des deux espèces :
- *Vicia faba* L. (cinq variétés) et *Vicia sativa* (deux variétés) (voir tableau 4). Ces variétés sont fournies par l'institut technique de grandes cultures (I.T.G.C) d'Elkhroub et la coopérative de céréales et légumes secs (C.C.L.S) AIN M' Lila.

II- METHODES UTILISEES

1- Mise en place du semis et préparation des échantillons

Dix graines de chaque population sont semées dans des pots de dimension moyenne (illustrations du tableau 4.). En commençant par creuser des trous d'environ 3 à 4 cm de profondeur et semer une seule graine par trou, ensuite Les pots sont entreposé dans une chambre de acclimatation aux conditions contrôlées (température 28°C, photopériode : 12 heures).



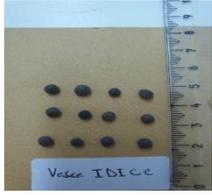
1. *Vicia sativa*



2. *Vicia faba*

Figure 10 : différentes plantules des deux espèces étudiées

Tableau 4 : les caractéristiques du matériel végétal utilisé dans les études biochimiques et moléculaires.

Accession	Nom de variété	Type	Code INRAT	Illustration
01	<i>AGUADULICE</i>	Fève (<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>)	Ag	
02	<i>HISTAL</i>	Fève (<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>)	Hi	
03	<i>MALTAIS</i>	Fève (<i>Vicia faba</i> var. <i>minor</i>)	Ma	
04	<i>ATLE</i>	Fève (<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>)	At	
05	<i>BAHI</i>	Fève (<i>Vicia faba</i> var. <i>major</i>)	Ba	
06	<i>MARIANA</i>	Vesce (<i>Vicia sativa</i>)	Mr	
07	<i>IDICE</i>	Vesce (<i>Vicia sativa</i>)	Id	

2- Technique chimique des protéines :

2- 1- Analyse Moléculaire des protéinés

2-1-1 Extraction et électrophorèse des protéines totales

L'application de l'électrophorèse selon Laemmli, (1970) peut déterminer la diversité des génotypes par l'obtention des électrophoré grammes qui caractérisent ses protéines. L'une des variantes la plus répandue de l'électrophorèses, est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du sodium ; dodécyl sulfate (SDS-PAGE) décrite par Ulrich Laemmli en 1970,et qui est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (**Dicko, 2006**). La technique d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE a été réalisée au niveau du laboratoire d'électrophorèse du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt-Constantine).

2-1-2 Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE :

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation et éventuellement l'identification des constituants d'un mélange de protéines en utilisant la différence entre leurs vitesses de migration sous l'influence d'un champ électrique. Celle-ci est, sous certaines conditions, uniquement fonction de leur masse moléculaire. La cartographie des masses moléculaires des protéines peut donc être établie en utilisant une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulphate de sodium (SDS-PAGE).

Le SDS (détergent anionique) a deux fonctions : d'une part, dissocier les protéines agrégées et, d'autre part, leur Matières et Méthodes, conférer une charge globale négative, permettant la séparation des protéines essentiellement en fonction de leur poids moléculaire. Son action n'est pas cependant efficace qu'en présence d'un réducteur de ponts disulfures, le 2-mercaptoéthanol.

Les gels de polyacrylamide sont le résultat de la polymérisation de monomères d'acrylamide (C_3H_5NO) en longues chaînes reliées par le bis-acrylamide ($C_7H_9N_2O_2$).

L'acrylamide et le bis-acrylamide, ensemble, forment des pores à travers lesquels les différentes protéines vont migrer selon leur taille moléculaire.

Le rôle du sodium dodecyl sulfate (SDS) est déneutraliser la charge des protéines pour leur permettre de migrer selon leur poids moléculaire seulement.

La polymérisation est initiée en ajoutant du persulfate d'ammonium (APS) et du N,N,N',N'- tetra methylethyl enediamine (TEMED), ce dernier jouant le rôle de catalyseur lors de la formation des radicaux libres du persulfate (Amallah, 2017).

En effet, un gel est un milieu poreux, si la taille des mailles est comparable à celle des protéines, il agit comme un filtre moléculaire. Leur séparation dépendra donc de leur densité, de leur charge et de leur taille.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE) sert à vérifier la Pureté d'une protéine et à en mesurer le poids moléculaire.

Les complexes SDS- polypeptides ont des densités de charge égales et par conséquence, la migration dans le gel de polyacrylamide ne dépend plus que de la taille du polypeptide. On pourra donc déterminer les masses des polypeptides de l'échantillon en comparant leur mobilité avec celle des polypeptides de poids moléculaires connus sous les mêmes conditions d'électrophorèse.

La taille des pores (de quelques nm à plusieurs centaines de nm) est donc directement influencée par la concentration en acrylamide: plus la concentration augmente, plus la taille de ces pores diminue (Amallah, 2017).

Grâce à la SDS-PAGE, il est possible de déterminer assez finement la présence d'une protéine donnée dans un échantillon protéique. Une protéine sera caractérisée par sa masse moléculaire donnée.

2-1-3- Etapes de l'électrophorèse SDS-PAGE :

L'électrophorèse se déroule en plusieurs étapes :

➤ **Extraction des protéines :** Extraction des protéines se fait comme suit:

1- Le matériel de départ est un demi-grain de chaque génotype, broyé dans un mortier en une poudre fine, à l'aide d'un pilon. Le broyat est mis dans un tube Eppendorf ;

2- Introduction d' 400µL de solution A de précipitation (Annexe 1) et homogénéiser dans le tube Eppendorf de 1.5 ml ;Laisser reposer pendant 1h à -20°C ;

3- Centrifuger à 13 000 rpm pendant 15 min à 4°C ;

4- Eliminer le surnageant délicatement en renversant le tube (le culot ne doit pas décoller).

- 5- Passer au vortex les tubes Eppendorf en mettant 5min à 100°C, afin de favoriser la dénaturation des protéines.
- 6- Centrifuger les tubes Eppendorf à 10 000 rpm pendant 10 min à la température ambiante. Stocker à -20°C.

2-1-4- Dosage des protéines de *vicia faba* L. et *vicia sativa*

Le dosage des protéines se fait selon la technique de Bradford (1976), qui est basée sur l'adsorption du colorant bleu de Coomassie G250 en milieu méthanolique acide, ce colorant s'adsorbe sur les protéines et cette complexation provoque un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu. Cette adsorption se fait principalement par des liens ioniques avec des acides aminés basiques (arg, his, et lys) et des interactions hydrophobes (acides aminés hydrophobes).

Un volume de 100 µl d'extrait protéique a été dosé en ajoutant 2 ml de réactif de Bradford, après 2 min du développement de la réaction, la densité optique est lu à 595 nm. Pour réaliser une courbe étalon des protéines solubles est réalisé à partir d'une solution mère de BSA allant de 10 à 100 µg.ml⁻¹ on prend 100 µl de ces derniers, puis ajouter 2 ml du réactif de Bradford, la lecture de la densité optique se fait à la longueur d'onde 595 nm après 2 min du développement de la réaction. Les résultats obtenus sont traités statistiquement, en analysant la variance à l'aide du test de Fisher à P = 5 %.

2-1-5- Les concentrations des protéines

Selon la courbe, en déduit que cette proportionnalité permet de déterminer la quantité de protéine contenue dans un volume de prise d'essai de l'échantillon a dosé (figure10).

Le calcul a été fait à l'aide d'un logiciel «Image-lab» au niveau du C.R.Bt, en montrant que les sept variétés sont très riche en protéine a une moyenne entre 1.859 et 1.444.

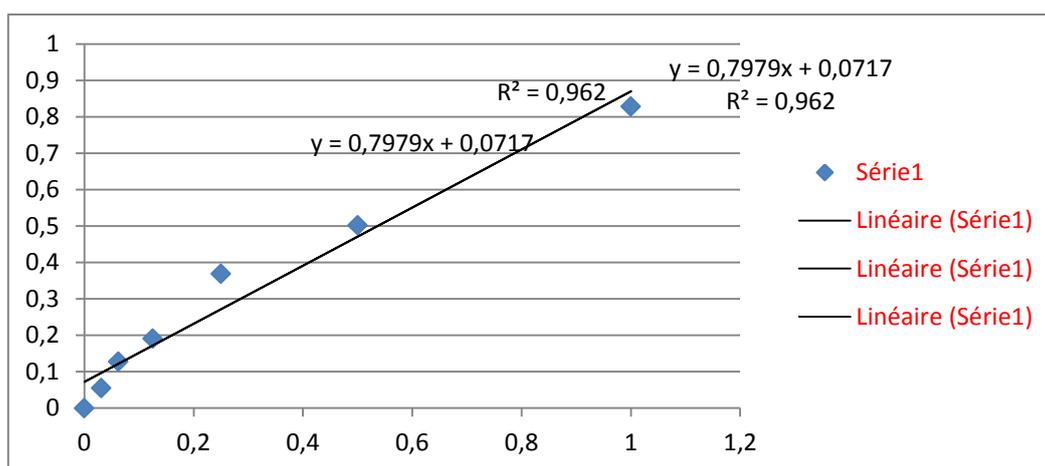


Figure 11 : Courbe d'étalonnage pour la détermination des concentrations de protéine totale

Tableau 5 : Dosage des protéines par la technique de Bradford

Ma	Id	Ag	Ba	At	Mr	Hi	Blanc
1,761	1,773	1,739	1,411	1,829	1,866	1,863	0,309
1,736	1,693	1,852	1,676	1,358	1,874	1,559	0,316
1,736	1,79	1,844	1,815	1,279	1,838	1,624	0,297
1,744	1,752	1,811	1,634	1,488	1,859	1,682	0,307
1,437	1,444	1,504	1,326	1,181	1,552	1,374	0

2-1-6- Gel d'électrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

✓ Préparation des gels :

➤ Principe :

La méthode de Laemmli, (1970) consiste à utiliser deux gels superposés de concentrations et de pH différents (Tableau 03). Le gel supérieur (T = 4 %, pH = 6,8), appelé gel de concentration, permet de concentrer la solution de protéines en une fine bande tandis que le gel inférieur (T = 12 %, pH = 8,8) est le gel permettant de séparer les différentes protéines appelé gel de séparation. Le tampon d'entraînement est composé de Tris-HCl, de SDS et de Glycine (Annexe 02).

Tableau 6 : Les composants des deux gels

Produits	[C] finale	Gel de séparation 12%	Gel de concentration 4%
Acry Bis 40%	40%	1.7 ml	0.2ml
1.5M Tris hcl ph 8.8	0.375 M	2ml	/
1,0M Tris hcl ph 6.8	0.125 M	/	0.5ml
10% SDS	0.1%	50µl	30µl
10% APS	0.05%	50µl	30µl
TEMED	0.1%	0,002ml	0,003ml
H ₂ O distillée	/	1,7ml	2,1ml
Total	/	5ml	3ml

➤ Dépôt des échantillons et migration dans le gel

Une fois la migration terminée, il faut attendre jusqu'à ce que le front de BBP (bleu de bromophénol) atteigne le bord inférieur des plaques (Approximativement 2-3h) .

➤ Révélation des gels :

Après la sortie du front de migration, la migration est arrêtée. Les gels sont démoulés et récupérés dans des bacs en plastique puis recouverts avec une solution décoloration est constituée d'un fixateur des protéines, le TCA (acide trichloracétique) à 60% et d'un colorant, le bleu de Coomassie R250 (annexe 02) pendant toute une nuit à température ambiante sous agitation constante.

Les gels sont ensuite décolorés par plusieurs rinçages à l'eau distillée dans un mélange de méthanol et d'acide acétique(solution de décoloration) qui doivent être maintenus en agitation pendant 45min pour éviter le dépôt du colorant . L'un des puits du gel est consacré au marqueur de poids moléculaire.



Photo.01 : dépôt des échantillons à l'aide de micro-seringue.

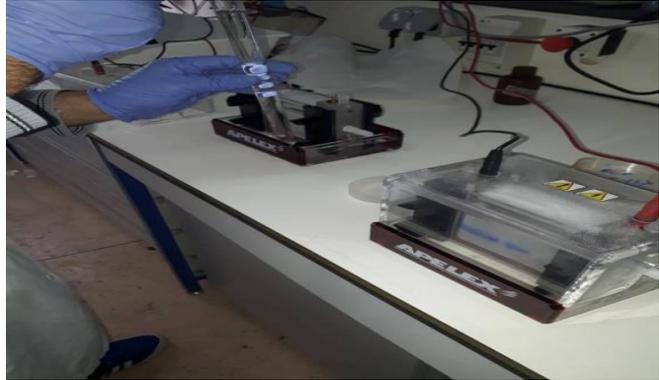


Photo.02: Remplissage de la cuve avec le tampon.

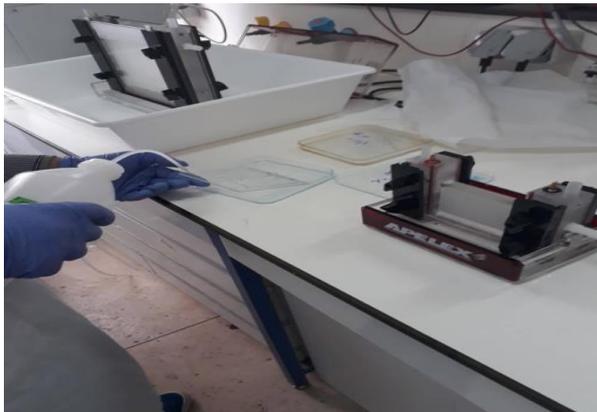
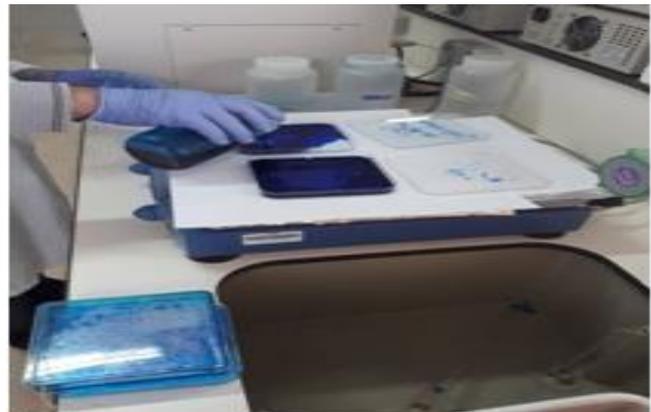


Photo.03: Démoulage et récupération du gel dans un bac en plastique.



Photos.04 : coloration du gel avec le bleu de Coomassie pendant une nuit

Figure 12 : Les étapes de dépôt des échantillons et migration dans le gel

3- Technique moléculaire des SSR

Deux à trois jeunes feuilles écailleuses de chaque individu ont été prélevées à partir d'une plante (figure11) dans chaque pot et placées directement dans l'azote liquide afin d'éviter l'oxydation et la dégradation de l'ADN.



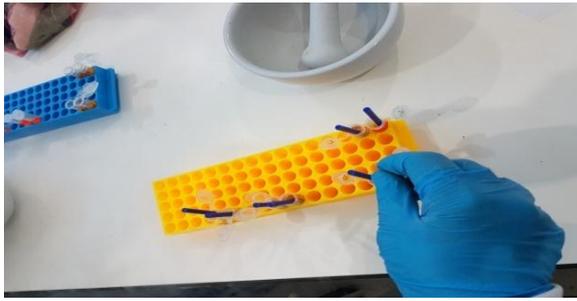
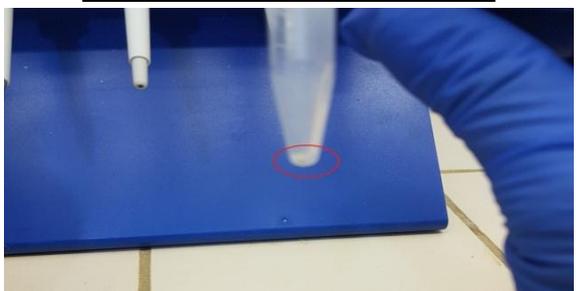
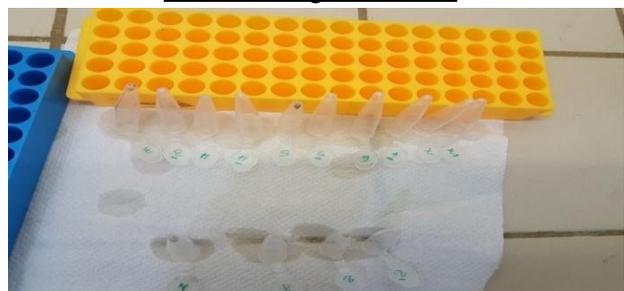
Figure 13: les feuilles des variétés utilisées en extraction d'ADN

3-1- Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée selon le Protocole. DOYLE & DOYLE (1990) modifiée Les étapes sont indiquées comme suivant :

- Le matériel végétal collecté est broyé dans de l'azote liquide 0.1g de broyat puis mis dans des tubes de 2ml de Eppendorfs volume.
- ajouter ensuite dans chaque tube 750 μ L de la micro-préparation d'extraction d'ADN (CTAB) préalablement chauffée à 65°C.
- L'extrait est légèrement mélangé, puis incubé dans un bain marie à 65°C pendant 45 min à 60 mn, avec agitation toute les 15 à 20 minutes (Figure14).
- Après incubation, 750 μ L du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24: 1) sont ajoutés à l'extrait (Figure14), et agités vigoureusement pendant10mn. Le chloroforme solubilise les pigments chlorophylliens, les polysaccharides et les protéines dénaturées.
- L'extrait, est ensuite, centrifugé à 10000 trs/mn, à température 4°C (Figure14), pendant 15 mn. Cette étape permet de séparer les acides nucléiques du chloroforme et des débris cellulaires.

- 1mL du surnageant est récupéré dans de nouveaux tubes de 2 ml, puis l'ADN est précipité avec 66 μ l d'isopropanol (Figure14) en remuant doucement jusqu'à l'homogénéisation de la solution avec l'isopropanol et la formation des filaments d'ADN (Figure14). ensuite, une incubation à température ambiante , pendant 30 mn est réalisée. l'ADN se précipite à cette étape.
- Le culot d'ADN est, ensuite, récupéré par centrifugation à 4°C à 8000 trs/mn pendant 10 mn. Puis lavé avec 1 mL d'éthanol à 70%. Sous la hotte, le culot est séché de toutes gouttes d'éthanol (Figure), En suite, le culot est dissout dans 100 μ L d'eau distillée stérile et stocké à 4°C pendant une nuit.
- Après cette incubation à 4°C, le mélange est centrifugé pendant 7 mn à 8000 trs/mn afin de faire sédimenter toute impureté restante dans le tube. Par la suite, la solution d'ADNest récupérée dans de nouveaux tubes .de1.5ml.Cettesolutionva être utilisée comme stock d'ADN. Des dilutions sont réalisées selon les résultats du test qualité d'ADN.

**A - Broyage des feuilles****B - Ajout de la solution CTAB 2X****C- Incubation pdt 60 min****D Ajout de Chloroforme****E- Incubation au bain marré****F- Ajout d'isopropanol****G- formation des filaments l'ADN****H- Centrifugation a 4°C****I Précipitation de l'ADN****J Séchage de l'ADN****Figure 14 :** les différentes étapes de l'extraction d'ADN (Photos Maghboune et Nekaa ,2020 C.R.Bt)

3-2- Test de qualité de l'ADN

Le test de qualité est une étape importante dans l'analyse d'ADN, car il permet de mettre en évidence la présence ou l'absence d'ADN et en même temps sa qualité. Cette dernière est déterminée par l'estimation de sa concentration en comparant l'intensité de la bande de l'ADN avec les bandes du marqueur de taille leader Lambda DNA/EcoRI+HindIII.

Ce test est réalisé sur gel d'agarose 2% et les bandes sont visualisées par un système d'analyse de gel après coloration avec le bromure d'éthidium BET.

- Après avoir pesé la poudre d'agarose, on mélange dans le 1X TBE à raison de 0.5 g pour 25 mL. Ce mélange est fondu au four à micro-ondes, en surveillant pour éviter l'ébullition et en l'agitant de temps en temps pour homogénéiser.
- Après solubilisation totale, le mélange est refroidi dans un bassin rempli d'eau froide et sous agitation jusqu'à l'atteinte d'environ 60°C (par le thermomètre) ver la fin en ajoute le 0.6 µL cyber green .
- L'agitation dans l'eau froide permet le refroidissement homogène de la solution du gel et permet aussi d'éviter la solidification du gel qui se trouve au niveau de la paroi.
- On fixe les joints et les peignes dans la cuve (APELEX) et on place le tout dans le support. Les peignes ont pour fonction de former les puits. Il faut absolument régler le niveau support du gel pour qu'il soit parfaitement horizontal. Ensuite, on coule le gel doucement en veillant à ce qu'il entoure toutes les dents des peignes. Après solidification, les peignes et les joints sont enlevés et le gel est placé dans l'appareil, puis immergé dans le tampon de migration TBE 1X.

Le gel d'agarose à 2% est préparé, et dans chaque puits on dépose:

- **4 µL d'eau distillée stérile;**
- **3 µL de bleu d'agarose;**
- **3 µL d'ADN.**

Après avoir déposé les échantillons , un champ électrique a l'aide d'un générateur réglé à 60 V.pour faire migrer les échantillon selon leur poids moléculaire dans un tampon TBE1X.les bandes se sont révélées en exposant le gel aux rayons ultraviolets UV .

Des photos sont prises à l'aide d'un système d'analyse d'images spécifique pour les gels (BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR⁺).

3-3- PCR (polymérase chaîne réaction)

Pour la réalisation de la PCR, le tableau suivant montre bien le volume réactionnel qui est de 20µl, on a procédé à réaliser l'amplification de l'ADN dans les plaques de 96 puits.

Tableau 7 : Le mélange réactionnel pour l'amplification de l'ADN par PCR

Composantes	Concentration initiale	Concentration finale	Volume/échantillon (µl)
H2O			13,2
Buffer	10 x	1 x	2
MgCl ₂	50 mM	2 mM	0,8
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,4
AmorceF	20 µM	0,2 µM	0,2
Amorce R	20 µM	0,2 µM	0,2
Taqpolymerase	5 U/µl	1 U/µl	0,2
AND	-	-	2

Le tampon d'extraction CTAB 2 X (Cétyl Bromure de Triméthyl Ammonium): est composé de 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB et 0.2% β Mercapto-éthanol.

3-4- Technique moléculaire des microsatellites (SSR)

L'analyse SSR a été réalisée, en utilisant 2µl d'ADN dilué à partir de l'ADN génomique de nos échantillons (*Vicia faba*, *vicia sativa*) et 7 d'amorces testés. Les caractéristiques de ces amorces ainsi que le milieu réactionnel sont présentés dans les tableaux suivants respectivement (Tableau 6 et 7).

Les PCR sont faites, en réunissant dans un même tube (0,2 ml) les différentes composantes du milieu réactionnel mentionnées dans le (Tableau 7) pour avoir un volume total de 25 µl/tube.

Les conditions d'amplification ainsi que la composition du milieu réactionnel sont optimisées suite à plusieurs essais (Tableau10).

Tableau 8 : Liste des microsatellites et leurs paires d'amorces utilisées

Amorces	Séquences	Locus	Tm (°C)
CASS8	R -5'CTGGTTGGTTCCTGGTGAGT -3' F-5' - AATTTGTT CAGGATCTCGGG-3'	(AAC)14	56
GBSSR52	R -5' - TGCGATTCTGGAAATTGG-3' F-5' - GGTTTCTTGTCCAAATAAGACG-3'	(CAG)5	58
VFG87	R -5'-TGGGTTGGGATCTTTTGGTTG -3' F-5' - AGGGCCAGCGTGATCCAATA-3'	(AG)10	58
CATA2	R -5'GGTGTCCACCAGGTAACCTCG -3' F-5' - CACGCACCCTACTGCATCAC-3'	(GA)2(GATA)2(GA)4	68
CA4	R -5'-GGGGGGTAGATCTTGTTTTTTCC -3' F-5'GAACTAAGGTGTACACGGGGG -3'	(CT)16	60
JF1AG3	R -5'-GGAGCATCCTGAATCCAACCTACC -3' F-5'-GTGGTCGAAAACCTGACAAGA -3'	(GA)5TA(GA)4TA)11	58
VFG14	R -5' - GGAGCATCCTGAATCCAAGTACC -3' F-5'-GAACGAGGCTCACGAAAATA -3'	(AG)10	55

Les amplifications sont réalisées dans un thermocycleur selon un programme composé des cycles bien déterminés pour chaque amorce comme suit (Tableau9):

Tableau 9 : programme de la PCR pour l'amplification des amorces SSR

Nombre de cycles		Température(°C)	Temps
<i>1</i>	Pré-dénaturation	94°C	5(min)
<i>30</i>	Dénaturation	94°C	25S
	Hybridation	TM°C	25S
	<i>Extension</i>	72°C	1(min)
<i>1</i>	Post-extension	72°C	5 (min)

Tableau 10 : Température et Cycle d'amplification des sept amorces

Les amorce	Températures (degré Celsius°)	Durée d'amplification (Second)	Cycle d'amplifications	Taille des fragments amplifiés
CBSS52	58°	30s	X10	261
	50°	30s	X25	
CAAS8	56°	30s	X40	168
VFG 87	61°	30s	X35	154
JF1-AG3	60°	30s	X35	211
CATA	56°	25s	X30	152
VFG 14	56°	30s	40X	223
CA4	68°	30s	X6	245
	62°	30s	X17	

❖ Electrophorèse et lecture des résultats

Les produits d'amplification obtenus, sont séparés selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur gel d'agarose de haute résolution à 2 % (concentration).

La révélation des bandes est faite sous rayons UV .(l'ajout dans la solution d'agarose d'un colorant Syber Green)

L'estimation de la taille des bandes amplifiées est assurée grâce au marqueur du poids moléculaire 100 pb DNA.

L'utilisation du logiciel Image Lab(Biorad), nous a permis d'analyser les différents profils électrophorétiques obtenus suite aux différentes amplifications de l'ADN des variétés de *Vicia faba* L et *vicia sativa* .

3-5- Electrophorèse sur gel d'acrylamide natif a 6%

3-5-1- Utilisation

Le gel de polyacrylamide possède un pouvoir résolutif de 10 paires de bases. L'ADN peut être aussi séparé en utilisant l'électrophorèse sur gels d'agarose. Ce dernier n'est pas adapté à la séparation de petits fragments.

3-5-2 Composition

Les gels de polyacrylamide peuvent varier en composition. Ils sont constitués d'acrylamide qui est l'unité de base et de bis-acrylamide) qui est l'agent pontant (fixateur). En fonction des différents taux de ces deux substances, on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel..

3-5-3 Préparation

Les produits d'amplification sont séparés sur gel d'acrylamide natif à 6% .(figure 27).

3-5-4 Traitement des plaques coulage du gel

Les plaques en verre sont bien lavées dans la solution de NaOH, qui élimine les traces du gel précédent, puis rincées à l'eau distillée et essuyées avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée.

3-5-5 Montage de la cuve

Une fois le gel polymérisé (après ~ 45mn), les deux plaques sont placées et bien serrées dans la cuve remplie de TBE 0.5X. Les peignes sont délicatement retirées afin de ne pas casser ou déformer les puits.

3-5-6 Migration

Après l'ajout de 5µL du tamponde charge aux différents échantillons, 5µL du produit PCR sont déposés dans les puits (Figure15). La migration s'effectue pendant 4heures à 300 V.

Le marqueur de taille utilisé est celui de 100 bp.

3-5-7- Révélation

Après migration, le gel est coloré pendant 3mn dans la solution du nitrate d'argent , puis rincé pendant 1 min dans l'eau distillée. Les bandes sont visualisées sous UV. Les photos sont prises à l'aide d'un système d'image des gels (BIO RAD Moléculaire Imager Gel Doc XR⁺).

4- Traitement des résultats

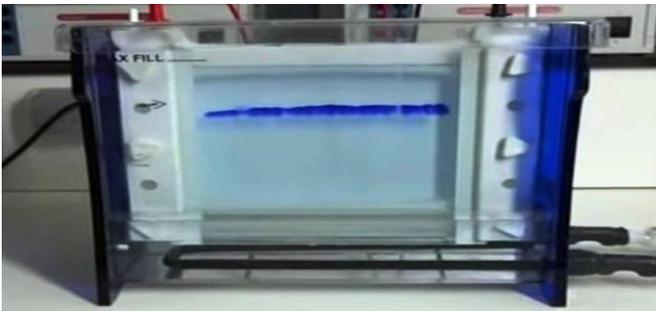
Le gel d'électrophorèse obtenu a été photographié par un système d'imagerie « Biorad: model Gel Doc™ XR+ » au niveau de laboratoire de biologie moléculaire de C.R.Bt. Son analyse est réalisée à l'aide du logiciel spécifique qui permet une bonne visualisation et une distinction des bandes ainsi que le calcul de leur poids moléculaires en fonction du marqueur de taille.



1. Préparation de cuve pendant deux heures



2. Le dépôt des échantillons



3. Le temps de migration des échantillons



3. la plaque des échantillons après les migrations



5. décoloration avec le TBE



6. le gel coloré dans du bromure d'éthidium

Figure 15 : les Etapes de l'électrophorèse sur gel d'acrylamide (Maghboune et Nekaa,2020 C.R.Bt)

Chapitre III

Resultats et discussion

III- Résultat et discussion :

III-1 Analyse biochimique :

L'analyse du polymorphisme protéique des sept variétés appartenant aux deux espèces différentes (*Vicia faba* L et *Vicia sativa*) par électrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS-PAGE, nous a permis de déterminer le polymorphisme qui est démontré par un Dendrogramme.

1 Paramètres biochimiques : les protéines totales :

A partir des protéines extraites des grains des cinq variétés de *Vicia faba* L. et deux variétés de *Vicia sativa*, nous avons procédé à une analyse des profils électrophorétiques et calculer l'indice de similarité d'une part, et d'autre part nous avons effectué une classification hiérarchique à l'aide d'un dendrogramme, afin de mettre en évidence la variation intra variétale et intra spécifiques I.

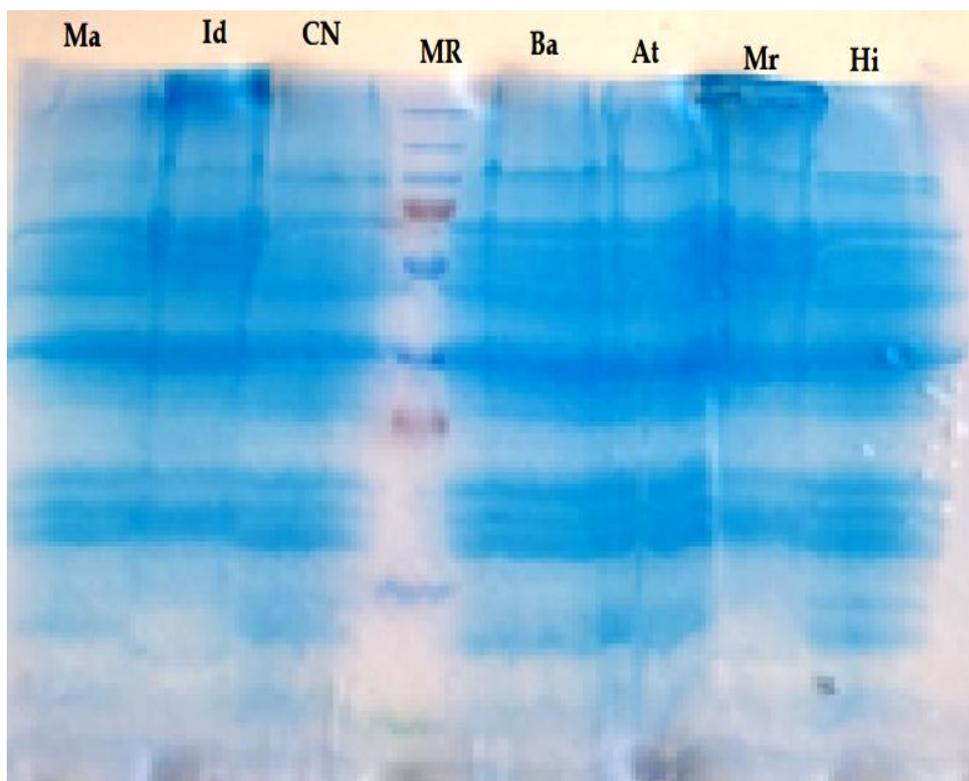


Figure16 : Gel électrophorétique des protéines totales des grains des variétés de *Vicia faba* et *Vicia sativa*

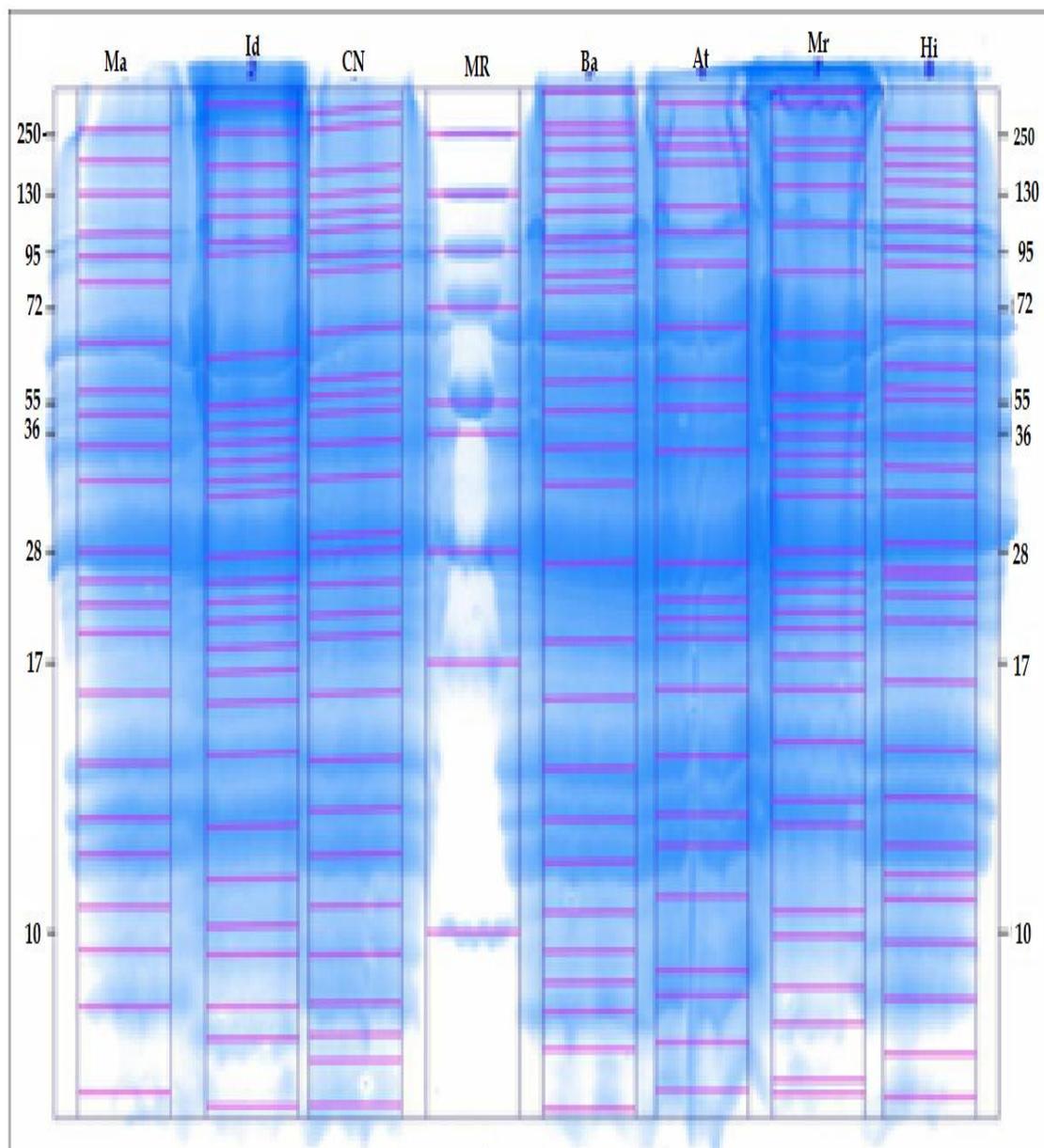


Figure 17: Gel électrophorétique des protéines totales des variétés des variétés de *Vicia faba* et *Vicia sativa* après traitement avec un système d'imagerie Biorad GEL DOC .

1.1 -1 Etude de l'électrophore gramme

L'analyse des diagrammes consiste à révéler la mobilité relative de chacune des bandes observées sur le gel. L'électrophore-gramme obtenu présente des bandes claires, distinctes et bien séparées, d'intensité variable, un nombre total de 30 bandes, de poids moléculaire variant de 2 à 300 KD est observé.

Tableau 11: Diagramme présence /absence des bandes protéiques des variétés (Ma et Id) de *vicia sativa* et des variétés (Ag, Ba, At, Ma et Hi) de *vicia faba*.

Bande	PM	Ma	Id	Ag	Ba	At	Mr	Hi	
1	300	-	+	+	-	+	+	-	U(+)
2	262	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
3	250	+	+	+	+	+	+	+	U(+)
4	230	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
5	217,5	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
6	211,6	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
7	208,6	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
8	194,6	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
9	186,7	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
10	181,5	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
11	176,6	-	+	-	-	-	-	+	U(+)
12	169,3	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
13	164,7	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
14	147,3	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
15	141,3	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
16	137,4	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
17	131,8	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
18	130	+	+	+	-	-	-	-	U(+)
19	118,7	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
20	117,9	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
21	115,5	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
22	122,9	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
23	121,2	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
24	110	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
25	107,7	-	-	+	-	-	-	+	U(+)
26	105,5	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
27	104,7	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
28	102,6	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
29	100,4	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
30	96,3	-	-	-	-	-	-	+	U(+)

-: absence.

+: présence.

U : bande unique

(marqueur

Spécifique)

P : polymorphe

M : monomorphe

31	95	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
32	94,4	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
33	93,3	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
34	92,1	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
35	88,8	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
36	88,2	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
37	86,6	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
38	85,6	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
39	84,5	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
40	81,4	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
41	78,5	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
42	68,9	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
43	68,2	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
44	67,7	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
45	66,7	-	-	-	+	-	+	-	U(+)
46	65,3	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
47	62,9	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
48	60,9	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
49	59,2	-	-	-	-	-	-	-	U(+)
50	58,7	-	-	+	-	+	-	-	U(+)
51	58,5	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
52	57,2	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
53	56,8	+	-	-	-	+	-	-	U(+)
54	56,4	-	-	+	-	-	+	-	U(+)
55	56	-	-	-	-	-	-	-	U(+)
56	55,4	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
57	54,1	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
58	51,4	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
59	49,7	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
60	48,8	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
61	47,2	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
62	45,6	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
63	40,5	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
64	35,7	+		-	-	-	+	+	U(+)
65	35,3	-	+	+	-	-	-	-	U(+)
66	35	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
67	34,9	-	-	-	+	-	-	-	U(+)
68	34,6	-	-	-	-	+	-	-	U(+)
69	34,4	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
70	34	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
71	33,4	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
72	33	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
73	32,8	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
74	32,6	+	+	-	+	-	-	-	U(+)

75	31,6	-	+	-	-	-	+	+	U(+)
76	29	-	-	+	-	-	-	-	U(+)
77	28,5	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
78	28	+	-	+	-	-	+	-	U(+)
79	27,5	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
80	26,6	-	-	-	+	+	-	-	U(+)
81	25,9	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
82	25,3	-	-	-	-	-	+	+	U(+)
83	24,6	+	+	+	-	-	-	-	U(+)
84	23,4	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
85	22,8	-	-	-	-	-	-	+	U(+)
86	22,4	-	+	-	-	+	-	-	U(+)
87	21,9	+	-	-	-	-	-	-	U(+)
88	21,1	-	-	+	-	-	+	-	U(+)
89	20,6	-	+	-	-	+	-	+	U(+)
90	19,7	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
91	19,4	+	-	+	-	-	-	-	U(+)
92	18,9	-	-	-	+	+	-	-	U(+)
93	18,2	-	+	-	-	-	-	-	U(+)
94	17,5	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
95	16,7	-	+	-	-	+	-	+	U(+)
96	16	+	-	+	-	-	+	-	U(+)
97	15,9	-	+	-	+	-	-	-	U(+)
98	14,1	-	+	+	-	+	-	-	U(+)
99	14,6	-	-	-	-	-	+	+	U(+)
100	13,9	+	-	-	+	-	-	-	U(+)
101	13	-	-	-	-	-	+	+	U(+)
102	12,4	+	+	+	+	+	+	+	U(+)
103	11,9	+	-	+	+	+	-	+	U(+)
104	11,1	-	+	-	-	-	-	+	U(+)
105	10,5	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
106	10	-	-	-	-	-	+	+	U(+)
107	9	+	+	+	+	+	-	-	U(+)
108	7,5	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
109	7	+	+	+	-	+	-	+	U(+)
110	5	-	+	+	-	-	+	-	U(+)
111	4	-	-	-	+	+	-	+	U(+)
112	3,5	-	-	-	-	-	+	-	U(+)
113	3	+	-	-	-	+	-	-	U(+)
114	2	-	+	+	+	-	+	+	U(+)
NB TOTALE DES BANDES		23	28	28	24	24	30	30	187

On constate que cet électrophoregramme a révélé un polymorphisme important se résumant comme suit(tableau 11):

- ✓ Chaque variété présente de 23 à 30 bandes.
- ✓ Pour chaque variété, on observe une bande spécifique (marqueur).
- ✓ Présence d'une bande commune de 250 KDa chez les sept variétés.
- ✓ Les variétés *Mariana* (Mr) et *Histale*(Hi) enregistre le plus grand nombre de bandes, soit 30 bandes de mobilité se situant entre 2 à 300KDa avec un taux de polymorphisme de 96.66%.
- ✓ Chez *Bahi*(Ba), 06 bandes sont observées de mobilité se situant entre 1 à 9,397 KDa, se caractérisant par un taux de polymorphisme égal à 95.83%.

1-1-2- Analyse du polymorphisme protéique:

Le nombre de bandes révélées chez les différentes variétés varie de **23 à 30 bandes** et il est de **6** seulement chez la variété *Bahi* (Tableau 12).

Tableau 12 : Taux de polymorphisme protéique des graines de *Visia faba* et *Vicia sativa*

Variétés	Bandes monomorphes	Polymorphes		Total	Polymorphisme %
		Bandes uniques	Bandes non-uniques		
<i>Maltai</i>	1	8	14	23	95,65
<i>Idice</i>	1	10	17	28	96.42
<i>Aguadulce</i>	1	10	17	28	96,42
<i>Bahi</i>	1	13	10	24	95.83
<i>Atlc</i>	1	7	16	24	95.83
<i>Mariana</i>	1	10	19	30	96.66
<i>Histal</i>	1	12	17	30	96.66

D'après le tableau suivant, la bande (29) de valeur R_f 0.937 et de poids moléculaire 8.650KD et commune aux variété *Histale*,*Mariana* ,*Bahi*,*CNCC*,*Idice*,comme la bande (27) de valeur R_f 0.873 et de poids moléculaire 7,464 et commune aux variété , *Marana* , *Bahi* ,*CNCC* , *Idice* mais la bande (1) de valeur R_f 0.038 et de poids moléculaire 1,091KD est commune à toutes les variétés (sauf *Maltais*). la bande (28) de valeur R_f 0.884 et de poids moléculaire 7,656KD et commune aux variété *Histale* , *Mariana* , *Bahi*,*CNCC* , *Idice*.

Les bandes (2) , (22), (23), (24) et (30) de valeur R_f égale à 0,033, 0,88 , 0,926 , 0,973 et 0,98 et de poids moléculaire égale à 1,079KD, 7,586 KD, 8,433 KD, 9.397 KD et 9.550 KD respectivement, sont spécifiques (marqueurs génétiques) peuvent être donc utilisées dans la discrimination entre les variétés.

Tableau 13 : Poids moléculaires et rapports frontaux des différentes bandes

Variété	No Bande	Rapport frontal	Poid Moleculaire Da
<i>1 Maltaise</i>	22	0,891	7,780
	23	0,975	9,441
	24	0,101	1,262
	26	0,043	1,104
<i>2 Idice</i>	1	0,015	1,035
	27	0,919	8,299
	28	0,943	8,770
	29	0,988	9,727
<i>3 Cncc</i>	1	0,02	1,047
	26	0,888	7,727
	27	0,919	8,299
	28	0,943	8,770
	29	0,988	9,727
<i>4 Bahi</i>	1	0,002	1,005
	2	0,033	1,079
	27	0,868	7,379
	28	0,896	7,870
	29	0,932	8,551
	30	0,991	9,795
<i>5 AtlcAguadulce</i>	1	0,014	1,033
	22	0,88	7,586
	23	0,926	8,433
	24	0,973	9,397
<i>6 Mariana</i>	1	0,002	1,005
	27	0,873	7,464
	28	0,907	8,072
	29	0,962	9,162
	30	0,977	9,484
<i>7 Histal</i>	1	0,038	1,091
	28	0,884	7,656
	29	0,937	8,650
	30	0,98	9,550

Cette analyse indique la présence de deux polymorphismes protéiques :

- Polymorphisme interspécifique évident, entre les deux espèces *Vicia faba* et *sativa*.
- Polymorphisme intra-spécifique entre les cinq variétés de *Vicia faba*, différant entre elles par l'origine géographique et l'hôte sur lequel elles ont été prélevées. Cette variabilité est mise en évidence par les profils électrophorétiques, le poids moléculaire des bandes et les valeurs R_f relatives représentées dans le tableau.

1-1-3-étude de la variabilité des paramètres biochimiques

L'indice de similarité est calculé selon la présence ou absence des bandes (Tableau 14), pour la comparaison des différentes variétés. Le dendrogramme construit sur la base de la matrice de similarité SM, a permis la mise en évidence d'un **polymorphisme protéique interspécifique**.

Tableau 14 : Indice de similarité des bandes électrophorétiques

Variétés	Maltaise	Idice	Cncc Aguadulce	Bahi	AtlcAguadulce	Mariana	Histal
Maltaise	1.00						
Idice	0.68	1.00					
CnccAguadulce	0.72	0.71	1.00				
Bahi	0.69	0.64	0.63	1.00			
AtlcAguadulce	0.71	0.69	0.68	0.70	1.00		
Mariana	0.62	0.60	0.64	0.59	0.57	1.00	
Histal	0.61	0.64	0.59	0.60	0.64	0.63	1

Cette étude sur les protéines natives totales des graines des deux espèces (*Vicia faba* et *Vicia sativa*) analysées par SDS- PAGE, a montré une **variabilité interspécifique** pour le profil protéique obtenu, alors qu'une faible **variabilité intra-spécifique** est observée.

En effet, l'indice de similarité interspécifique varie de **71% à 60%**, tandis que l'indice de similarité intra spécifique varie de **70 % à 79%** (Tableau 14).

Les résultats sur la variabilité interspécifique des deux espèces, montrent une différence dans le profil protéique. Les bandes désignées (1), (27), (28),(29) caractérisent l'espèce *V. sativa*, alors que les bandes désignées (2), (22), (23), (24) et (30) sont spécifiques à *Vicia faba* L (Tableau 13).

La différence assez sensible dans l'intensité des différentes bandes protéiques produites pourrait s'expliquer par l'influence des conditions de l'environnement ou de l'hôte.

En comparant les indices de similarité des sept variétés, nous remarquons qu'ils sont très proches. (Tableau 14), le résultat de l'influence des condition sédapho-climatiques , étant donné que les marqueurs protéiques sont sensibles aux conditions de l'environnement.

Gardiner & Forde (1992) rapportaient que les protéines natives des graines, mises en évidence par SDS-PAGE, est une technique efficace pour distinguer les cultivars des légumineuses. Le présent travail suggère l'utilisation de cette méthode pour l'identification des espèces.

- **Classification hiérarchique:**

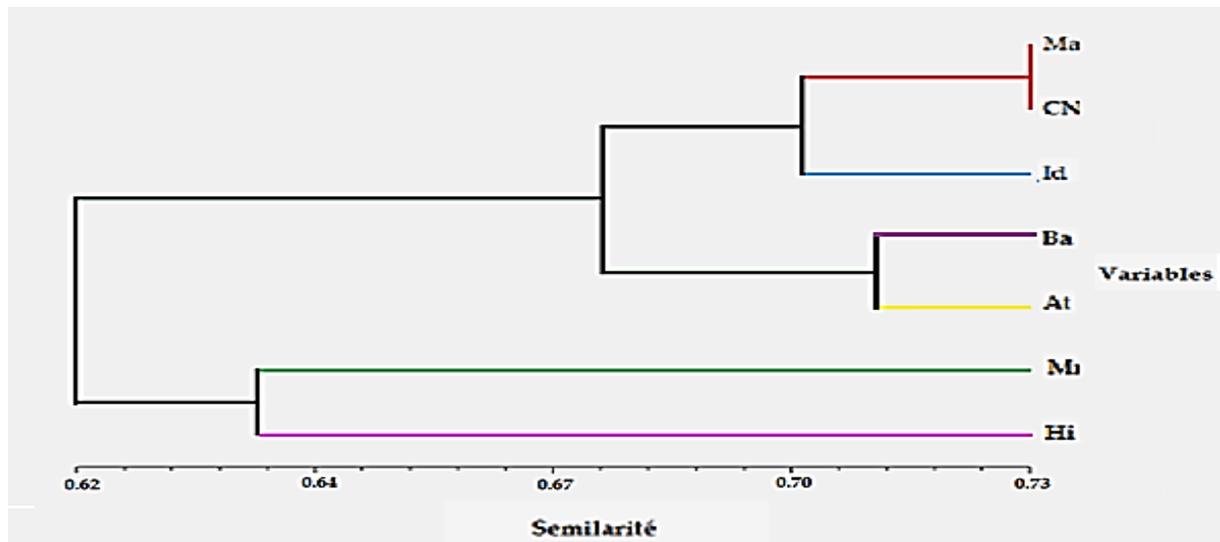


Figure 18 : SDS-PAGE Dendrogramme de 7 variétés de graines de *Vicia faba* et *Vicia sativa* basé sur le modèle de bandes de protéines à l'aide de l'analyse UPGMA SM

La classification hiérarchique des protéines totales a permis d'établir un dendrogramme illustrant les relations entre les cinq variétés (CN- Ma- Ba- Al- Hi) de *Vicia faba* et deux variétés (Id et Mr) de *Vicia sativa* . Le dendrogramme (figure18) a clairement révélé trois groupes principales distinctes au niveau du coefficient de similitude de 0,62.

Tableau 15: subdivision des groupes

Groupes	Groupe Majeur 1			Groupe Majeur 2
Variétés	Sous-groupe 1	Sous-groupe 2	Sous-groupe 3	Sous-groupe 4
	<i>Maltais-Idice et CN-</i>	<i>Bahi</i>	<i>ALT</i>	<i>Histale , Mariana</i>

Sur la figure 18, on remarque que les différentes variétés se répartissent sur un groupe majeur et groupe mineur.

Le Groupe majeur subdivisé en quatre sous-groupes :

- **Sous-groupe 1_**: renferme trois variétés regroupés à savoir variété *MaltaiS* (Ma), variété *Idice* (Id) et variété *CNCC* (Ag). On remarque que, les deux variétés *Idice* et *CNCC* (*Aguadulce*) sont liées avec une similarité de 71, par rapport à la variété *Maltais*.
- **Sous-groupes 2 et 3_**: les variétés *ATLC* et *Bahi*, ont respectivement une plus grande distance par rapport aux autres variétés.
- **Sous-groupe 4** : regroupe les variétés *Mariana* et variété *Histale* sont liées avec une similarité de 63% l'une de l'autre.

2-Analyse moléculaire :

2.1-Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN extrait

2.1-1Quantification de l'ADN

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

Tableau 16 : Quantités d'ADN extraites chez les différents génotypes étudiés.

SAMPLE ID	Conc	260 /280	260/230
<i>Histale</i>	485 ,3	1,81	1,4
<i>Maltais</i>	2957	1,91	1,96
<i>Agwadulce CNCC</i>	3208	2,02	2,08
<i>ATLC</i>	3041	1,91	1,95
<i>Bahi</i>	119,9	1,94	0,43
<i>Idice</i>	2770	1,95	2,05
<i>Mariana</i>	2913	1,95	2,12

On note que les concentrations obtenues sont largement suffisantes pour un bon déroulement d'une amplification d'ADN, les concentrations de nos échantillons varient entre 3041 ng/μl et 119,9ng/μl, pour *Agwadulce CNCC* et *Bahi* respectivement. (Tableau 16).

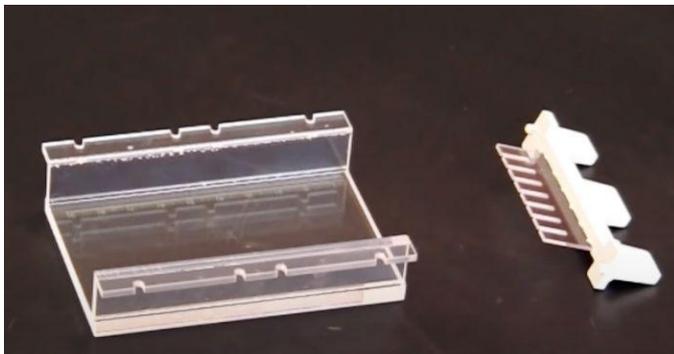
La pureté des extraits d'ADN est évaluée par le rapport d'absorbance Abs 260/280 nm. Ce dernier est en moyenne de 1.81ng/ μl (valeurs varient entre 2 et 1,72). Ce qui nous permet de dire que nos extraits d'ADN sont purs des contaminations protéiques ou ARN.

D'après le rapport d'absorbance 260/230 nm on peut également dire que les extraits d'ADN sont aussi purs des contaminations par les composés phénoliques utilisés au cours d'extraction, avec une moyenne de 1.4ng/μl (valeurs varient entre 0.97 et 2.11).

L'analyse des rapport $R1 = 260/280$ et $R2 = 260/230$ montrent que la pureté d'ADN pour les contaminations en protéines et en ARN respectivement est assurée, pour cette évaluation nous avons utilisé les normes suivantes (Nolan et al., 2006)

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

2.2-Qualité d'extraction :



A- Préparation le moule, le plateau et le peigne



B- Peuse 1g d'agarose



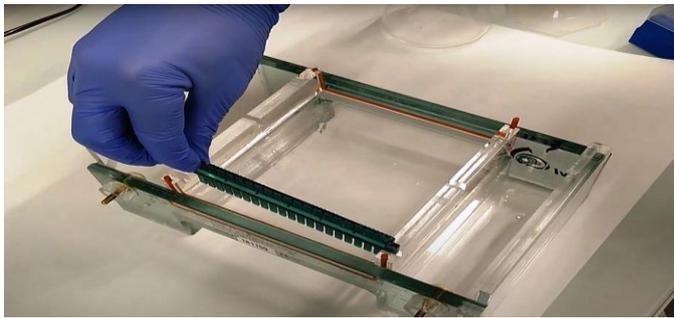
C- Mesuré 100ml de tempent TBE



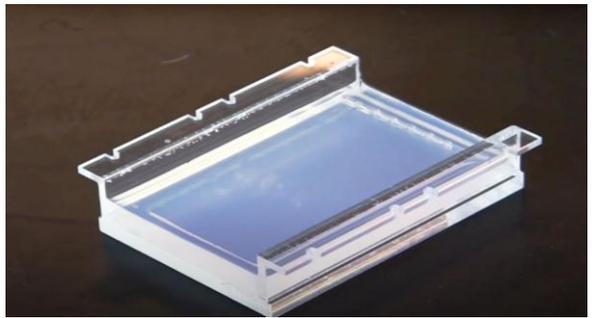
D- Chouffer au microondes 45 min



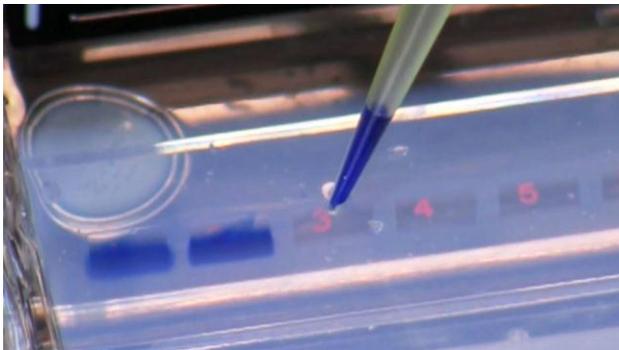
E-Ajoute de 0.6de syber green



F- Verser de l'agarose liquide



G- Trasser des trous avec une peigne



H- passer le plateau avec le gel a la cuve d'électrophorèse



I- Déposer les échantillons

J-Réglage des paramètres d'électrophorèse

Figure 19 : Étapes de test de qualité.

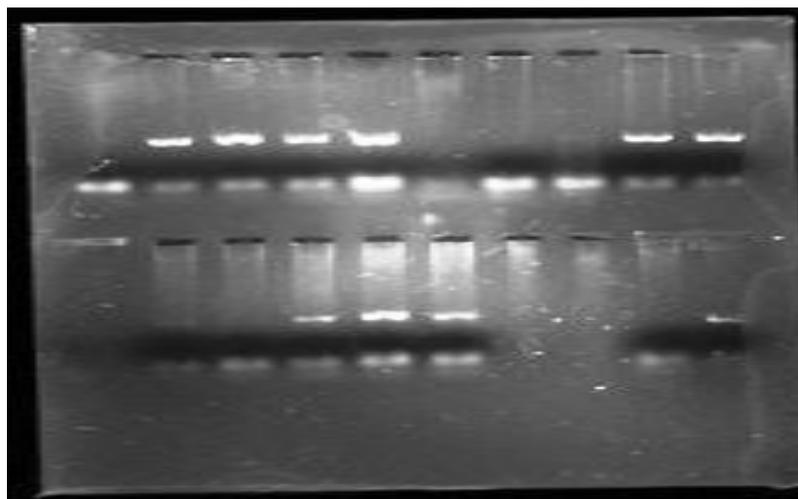


Figure20 : Profils électrophorétiques de génotypes de *Vicia faba*L et *Vicia sativa* obtenus par l'amorce GA4.et GBSS52

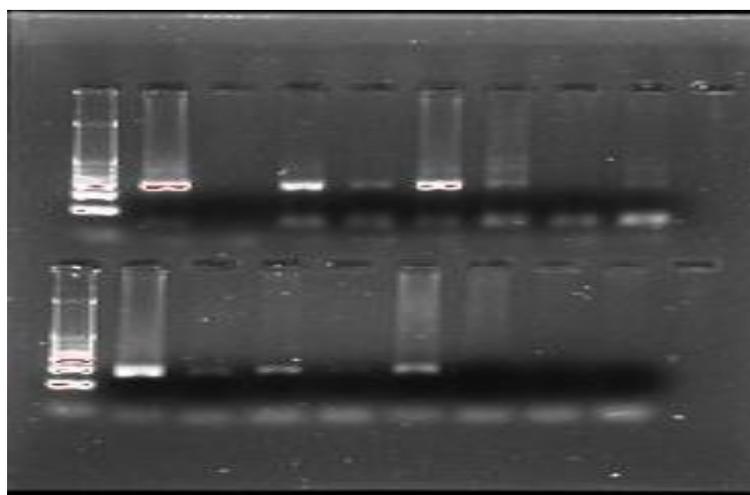


Figure21 : Profils électrophorétiques des génotypes de *Vicia faba* L et *Vicia sativa*. obtenus par l'amorce VFG87 et CAAS2

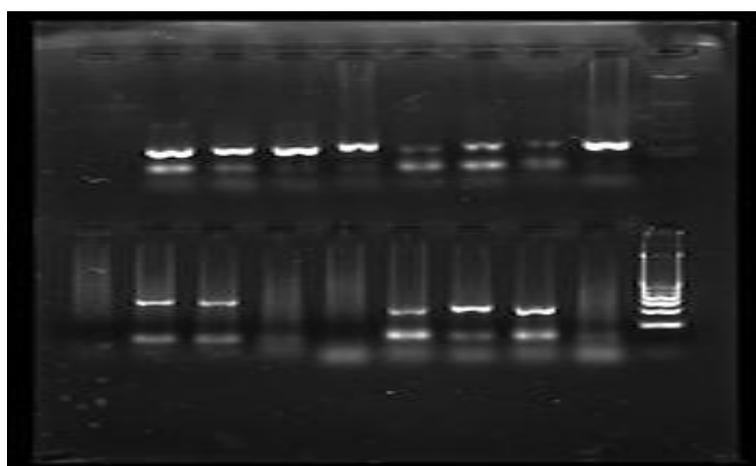


Figure22 : Profils électrophorétiques des génotypes de *Vicia faba* L. et *Vicia sativa*. obtenus par l'amorce CASS8.et JF1-AG3

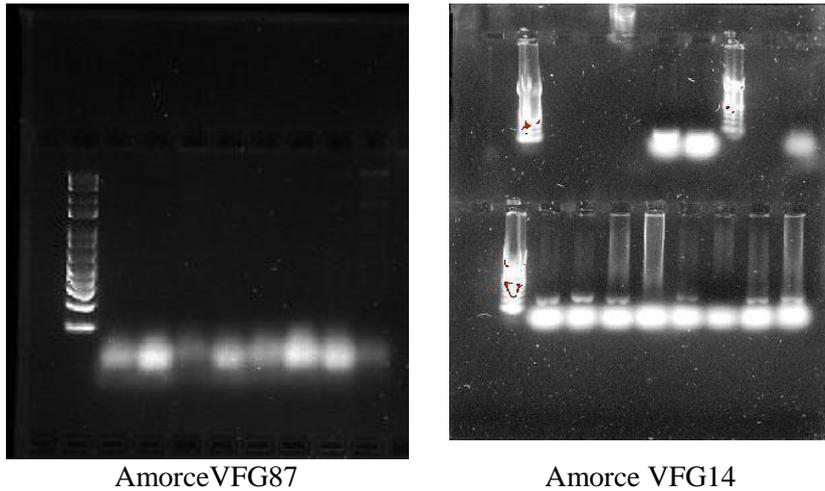


Figure 23 : Profils électrophorétiques des Variétés de *Vicia faba* L. et *Vicia sativa* Obtenus par l'amorce VFG87 et VFG14, Amorce non amplifier

2-3 Révélation des profils électrophorétiques

Les profils révélés sur le gel d'agarose après le test de qualité comportent généralement une seule bande. L'estimation de la concentration se fait par deux méthodes soit par spectrophotométrie ou par comparaison avec les bandes du marqueur lambda dans le cas de migration sur agarose (test utilisé).

Concernant l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, et à partir de chaque profil obtenu, les bandes SSR les plus nettes et reproductibles qui se trouvent à peu près à la même taille prévu que le marqueur sont retenues. Sur un tableau Excel, on note la présence par + ou l'absence par - des différentes bandes polymorphes.

3- Interprétation des données moléculaires

3.1- Les paramètres et relations génétiques des variétés

Afin d'évaluer la variabilité génétique intra et inter spécifique et le degré informatif des SSR utilisés, plusieurs indices génétiques sont calculés en incluant 27 individus. Les fragments amplifiés de tailles différentes sont notés comme présents (1) ou absents (0) et considérés comme des allèles différents. Les paramètres génétiques en question incluent:

Nombre d'allèles (N_a) : le nombre d'allèles amplifiés par locus (N_a) :

$N_a = \text{nombre total d'allèles} / \text{nombre de loci}$

- **Taux d'hétérozygotie**

L'hétérozygotie (diversité génétique de Nei, 1973) est la moyenne des fréquences des hétérozygotes observées à chacun des locus étudiés. L'indice **He** représente l'hétérozygotie attendue pour une population en panmixie, c'est la probabilité que 2 individus choisis (4 allèles, 2 copies des gènes de deux individus) aléatoirement dans une population aient des allèles différents d'un locus donné. Il est estimé à partir des fréquences alléliques ($2pq$).

$He = 1 - \sum (p_i)^2$ où p_i : fréquence à l' $i^{\text{ème}}$ allèle pour un locus donné. P_i : fréquence à l' $i^{\text{ème}}$ allèle pour un locus donné. L'indice **Ho** représente l'hétérozygotie observée, il est mesuré à partir des analyses génotypiques. En comparant ces deux indices il est possible de déduire l'impact des forces évolutives dans les populations, dues à l'autofécondation.

Le taux d'hétérozygotie fournit une bonne estimation de la variabilité génétique de la population, à condition toutefois que les individus de cette population se reproduisent au hasard.

➤ **Taux de polymorphisme = Nbre de loci polymorphes / Nbre total de loci étudiés x 100.**

➤ **Contenu d'information polymorphique (PIC):**

C'est le pourcentage des loci polymorphes dans l'échantillon étudié, il met en évidence la capacité d'un marqueur à détecter un polymorphisme dans une population. Autrement dit, c'est la probabilité d'observer au moins deux allèles au même locus, cette probabilité dépend des fréquences respectives des allèles et aussi de la taille de l'échantillon. Les loci sont très informatifs ($PIC > 0.5$), raisonnablement informatif ($0.5 > PIC > 0.25$), peu informatifs ($PIC < 0.25$). Les locus avec de nombreux allèles et un PIC proche de 1 sont les plus souhaitables offrant ainsi un maximum d'informations (Botstein et al., 1980).

➤ **Pouvoir de la discrimination (PD):** sa valeur donne une estimation du pouvoir discriminant d'un locus en prenant compte le nombre de génotype et aussi de la fréquence de chacun. Le PD a été calculé à l'aide de la formule: $PD = 1 - \sum P_i^2$, où la fréquence de l'allèle est remplacée par la fréquence du génotype (P_i représente la fréquence du $i^{\text{ème}}$ génotype) (Tessier et al., 1999).

Les cultivars montrant un seul allèle amplifié sont classiquement considérés comme homozygotes au locus. Par conséquent, la diversité génétique pourrait être sous-estimée si des allèles nuls se produisaient. Ainsi, les loci avec des fréquences élevées d'allèles nuls sont identifiés à travers l'estimation de la fréquence de l'allèle nul (r) pour chaque locus et chaque population. (Wagner et Sefc, 1999).

➤ **Calcul des distances génétiques :**

Les distances génétiques sont calculées à partir de la matrice des individus en réponse aux marqueurs, grâce à l'indice de similitude en utilisant le logiciel (Image Lab Software for PC Version 6.1). Cette distance permet d'évaluer la relation entre les accessions étudiées et de voir s'ils sont liés génétiquement ou non.

3.2-Test de qualité de L'ADN extrait :

L'évaluation de la diversité génétique des populations par la technique d'amplification par les marqueurs microsatellites ou SSR commence par une extraction de l'ADN. Un test de qualité, effectué après l'extraction de l'ADN génomique de la *vicia faba L* et la *vicia sativa*, et qui permet de mettre en évidence la présence de l'ADN, de vérifier sa qualité, et finalement d'estimer la concentration de l'ADN en se basant sur le marqueur de taille et l'intensité de la bande.

Les profils électrophorétiques, des sept échantillons (5 *vicia faba L* + 2 *vicia sativa*) sur un gel d'agarose 2%, montrent que tous les échantillons, se caractérisent par la présence de la bande d'ADN avec une taille supérieure à 100 Pb (Figure 26).

Ces résultats, permettent d'annoncer que l'ADN extrait n'est pas dégradé et qu'il est de bonne qualité et peut être utilisé pour les étapes suivantes. À partir de ce test, des dilutions sont réalisées, pour avoir un volume de 100 μ l dont la concentration finale d'ADN de 50 ng/ μ l.

3.3-Amplification de l'ADN par SSR

3.3.1-Amplification par l'amorce CA4

Le marqueur de type CA4 possède seulement deux allèles différents : A, C (Tableau 19). Ces allèles se trouvent dans presque la totalité des variétés étudiées ce qui a généré un nombre total d'allèles de 2. Le pourcentage de polymorphisme très élevé (100%), La taille prévue de l'amorce est 231 (Figure 26).

Le taux des hétérozygotes pour cette amorce est le plus élevée avec 91% (Tableau 8).

3.3.2- .Amplification par l'amorce GBSS 52

Cette amorce utilisée permet de détecter un pourcentage de polymorphisme très élevé (100%) dans les variétés *Vicia faba* L et *Vicia sativa* (Figure26), ce taux est le plus élevé. Toutes les bandes sont polymorphes avec un nombre élevé d'allèles différents à 3 allèles: A, B, C, (Tableau 19).

Ce marqueur possède un taux des hétérozygotes faible de 35% (Tableau 8)

3.3.3-Amplification par l'amorce CASS8

Cette amorce utilisée permet de détecter un pourcentage de polymorphisme très élevé (100%) dans les *Vicia faba* L et *vicia sativa*, Toutes les bandes sont polymorphes avec un nombre élevé d'allèles différents à deux allèles: C, B, (Tableau 19).

Ce marqueur possède un taux des hétérozygotes de 0,751 (Tableau 18)

3.3.4-Amplification par l'amorce CATA2

Avec un taux de hétérozygotes élevé de 0,715 Il y a trois allèles différents qui sont : A, B,C (Tableau 19) avec un total de 6 allèles observés chez tous les échantillons (Figure 26).

3.3.5-Amplification par l'amorce VFG14 et VFG87

Il n'y a pas d'amplification, ce qui peut être expliqué par une erreur de manipulation, car le volume dans lequel la réaction de l'amplification (PCR) s'est déroulée est très peu pour une telle analyse de polymorphisme.

4-Analyse des données

4.1-Fréquences alléliques

Les fréquences alléliques des variétés de *vicia faba* L et *vicia sativa* pour chaque allèle et pour chaque locus sont regroupées dans le tableau(19). La fréquence la plus élevée de 0,4 est enregistrée pour l'allèle A chez les variétés *vicia faba* L et *vicia sativa* dont l'ADN est amplifié par l'amorce GB-SSR 52. La fréquence la plus faible est de 0,071 est enregistré pour les allèles C, B chez les deux variétés *vicia faba* Let *vicia sativa* dont l'ADN est amplifié par l'amorce GB-SSR 52,CA4 ,CATA2.

Les fréquences alléliques, calculés chez toutes les variétés de fève ,mettent en évidence quelques distinctions entre les deux espèces :

Les allèles B et C de l'amorce GBSS52 ; les allèles A et B de l'amorce CATA2 ; l'allèle A de l'amorce CA4; l'allèle B de l'amorce CASS8 ; et enfin les allèles de l'amorce sont communs à la *vicia faba L* et *vicia sativa* .

Les allèles C et B de l'amorce GBSS52 , ainsi que les allèles A,B et C de l'amorce CATA2, sont des allèles observés uniquement chez les accessions de la fève *Vicia faba L* par contre sont absents chez les accessions de la *vicia sativa*. Tous ces allèles différencient la fève *Vicia faba L* et *vicia sativa* .

Notons que tous ces allèles ont tous des fréquences très faibles qui avoisinent le zéro, ce qui veut dire qu'ils ne sont pas distinctifs ou « marqueur » de ces différentes espèces.

5- Analyse du polymorphisme génétique

Les résultats d'amplification des 08 amorces utilisées ont indiqué que seule 6 amorces SSR ont donné des produits d'amplification. Pour les amorces qui n'ont pas amplifiées, malgré des répétitions allons jusqu'à 4 fois, nous supposons beaucoup plus un problème avec leur qualité vu qu'elles étaient utilisées dans d'autres études. Les amorces ayant amplifié, elles ont montré une amplification avec un ou deux fragments par Variété, et pour certaines plus de 2 fragments.

Tableau 17: Tailles et fréquences des allèles pour SSR loci analysés sur les populations de la fève

Locus	Tailles et fréquences des allèles		
	CATA2	154	199
0.241		0.071	0.142
CAAS8		278	290
		0.142	0.357
GBSS52	223	278	295
	0,071	0,142	0, 428
CA4		231	272
		0.214	0.071

La fréquence allélique a varié de 0,071 (pour l'allèle 223 pb au loci CATA2 et GBSS52 et CA4) à 0,428 (pour l'allèle 295pb au locus GBSS52) (Tableau 18). La taille des allèles a varié de 141 pb pour CAAS8 et CATA2 à 341pb pour GBSS52. De plus, 6 allèles sont spécifique à certains cultivars amplifiés avec les loci GBSS52, CATA2et CAAS8 (*Istale, Maltaise, Aguadulce CNCC, Aguadulce ATLC, Bahi*), le locus GBSS52 (*Mariana, HISTALE*).

L'hétérozygotie attendue H_e varie entre 0,751 à 0,919 au loci CASS8 et CA4, respectivement (avec une moyenne de 0,835).

Dans l'ensemble, un nombre élevé de variétés est souvent associé à une valeur élevée, sauf pour le locus CASS8, indiquant le fort potentiel d'informativité des marqueurs utilisés.

Tableau 18: Fréquences alléliques pour chaque loci SSR.

LOCUS	LES ALLELES	NOMBRE D'APPARITION	FREQUENCE ALLELIQUE
GBSS52	A	6	0,428
	B	2	0,142
	C	1	0,071
CATA2	A	2	0,142
	B	1	0,071
	C	3	0,241
CA4	A	1	0,071
	C	3	0,214
CASS8	B	2	0,142
	C	5	0,357

5.1-Polymorphic information content(PIC) :

Le taux de polymorphisme (PIC) se trouve dans l'intervalle [0,359-0,715] (Tableau20). L'amorce CA4 génère le taux le plus grand et l'amorce GB-SSR VF 52 génère un faible taux de polymorphisme. Le taux de polymorphisme moyen pour toutes les amorces est de 0,537.

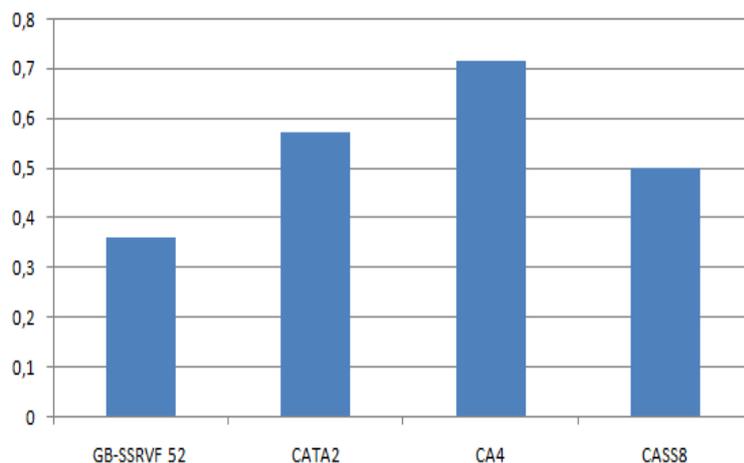


Figure24 : Taux de polymorphisme détectés pour chacun des loci SSR.

5.2-L'indice de diversité génétique varie entre [0,6833 – 1 ,0657] (Tableaux20) , la valeur la plus faible est enregistré l'amorce GB-SSR VF 52 et la valeur la plus élevée est obtenue chez les variétés de *Vicia faba*L , dont l'ADN est amplifié par l'amorce CA4 .

Par contre l'indice le plus faible est 0,6833remarquée chez les variétés dont l'ADN est amplifiée par l'amorce GB-SSR VF 52

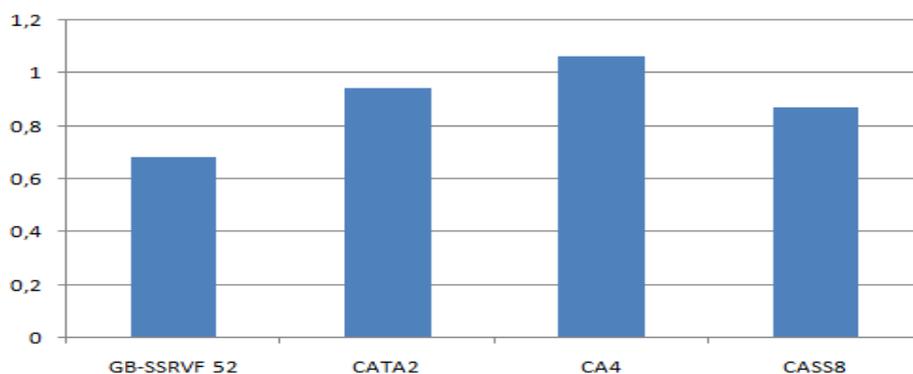


Figure 25: Indice de diversité génétique détectée pour chacun des loci SSR.

Tableau 19 : variabilité génétique et taux des hétérozygotes pour chaque amorce

LOCUS	Diversité génétique	TAUX POLYMORPHIC	Taux des Hétérozygotes
GB-SSRVF52	0,6833	0,359	0,589
CATA2	0,9448	0,573	0,723
CA4	1,0657	0,715	0,919
CASS8	0,8711	0,501	0,751

6- Profils d'identification des cultivars

L'analyse et la combinaison des 10 allèles amplifiés par les SSR amplifiés ont permis de différencier les 7 variétés étudiées (Figure26). Les résultats montrent que la combinaison des modèles alléliques trouvés avec les SSR amplifiés est capable d'identifier toutes les individus, puisque chaque variété est caractérisée par un profil génétique unique.

Les résultats des profils SSR montrent qu'un nombre relativement élevé de profils uniques est observé à l'exception des locus GBSS52 et CASS8 sans profils uniques. Parmi les 7 variétés, un taux de polymorphisme élevé pour les variétés de la fève *Maltais*, *Aguadulce*, *CNCC*, *ATLC*, *Bahi*, *Histale*, et un minimum observé chez *Mariana* et *Idice* les variétés de la vesce avec 66.67% avec une moyenne de 90,48% Figure 26

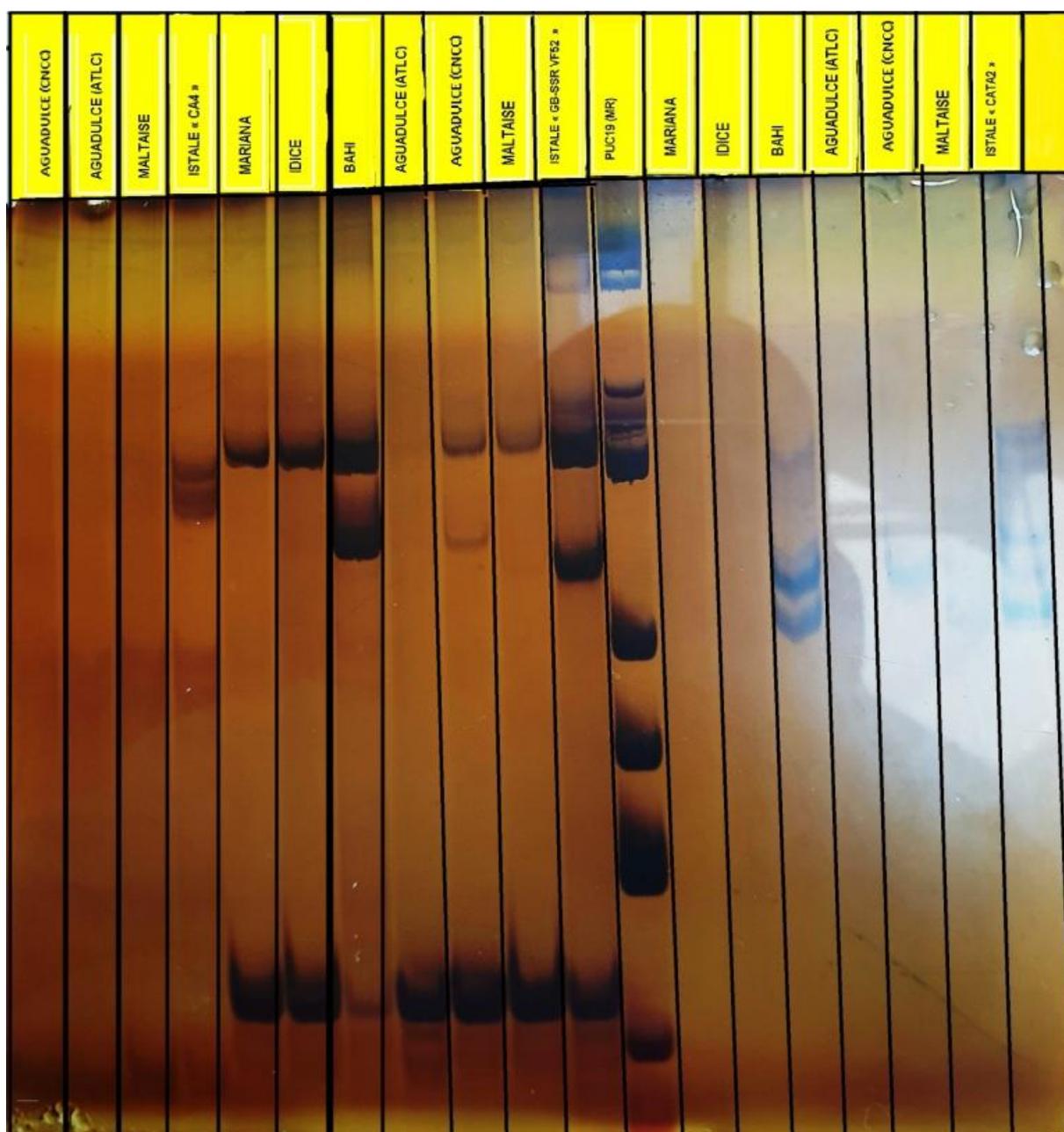


Figure26 : Exemples de profils d'amplification SSR générés par les amorces CATA2, C4 et GBSS52.

Ce résultat montre que toutes les amorces utilisées génèrent un pourcentage de polymorphisme très élevé de 100%. Ce pourcentage concorde avec le travail de Yahia et al. [12], qui ont évalué la diversité génétique contenue dans 13 accessions de *Vicia faba* collectées au Sud Tunisien en utilisant six amorces développés par Zeid et al. [9].

Aussi, ce pourcentage de polymorphisme a été aussi estimé par Hejjaoui [33], pour quatre amorces de type VFG ayant servi pour la caractérisation génétique des populations *Vicia faba* marocaines.

De même ce pourcentage a été annoncé par Akash et al. [34], pour les amorces GAI168, GATA2, GATA3, GATA11 et GA4. Ce taux de polymorphisme est suffisant pour estimer la variabilité génétique étudié. Selon Kaur et al.[23], ce polymorphisme élevé des accessions est dû à des mécanismes induisant des variations alléliques.

Conclusion générale

Conclusion générale

Vu , l'intérêt et l'importance économique de *vicia faba L.* , nous avons essayé d'apprécier les différences pouvant exister entre les cinq variétés appartenant à l'espèce *vicia faba* et deux variétés de *vicia sativa* en se basant sur deux études

❖ Etude biochimique

L'identification de polymorphisme protéique interspécifique, entre les deux espèces, et le polymorphisme intra spécifique entre sept variétés, et ceci par l'utilisation de l'électrophorèse des protéines natives des graines de ces deux espèces.

Ainsi, l'électrophorèse des protéines natives des sept graines en SDS-PAGE, a généré des profils protéiques électrophorétiques relativement similaires entre les différents sept variétés analysés. La variabilité enregistrée dans ces profils, pourrait être expliquée par l'influence des conditions de l'environnement (conditions climatiques, conditions édaphiques) qui ont conduit à la très faible intensité ou l'absence de certaines bandes chez certains variétés.

Dans notre cas, la comparaison des profils protéiques des sept variétés , a révélé une différence significative. L'électrophorèse des protéines natives des graines par SDS-PAGE, paraît être une technique efficace pour la distinction interspécifique des deux espèces. Les profils électrophorétiques des sept variétés obtenus révèlent un polymorphisme important et présentent au total 30 bandes claires, distinctes, bien séparées, et d'intensité différente de poids moléculaires variant de 2 KDa à 300 KDa avec un taux de polymorphisme conséquent supérieur à 80%.

De plus la classification hiérarchique illustrant les relations entre les sept variétés appartenant à deux espèces (*Vicia faba* et *Vicia sativa*), a montré que ces derniers sont généralement assez distants sauf les variétés *Maltais*, *Aguadulce* qui sont proches et qui présentent un taux de similarité égal à 72%. Et *Mariana* et *Histale* avec 63% de similarité.

Les protéines totales constituent donc des marqueurs biochimiques performants pour l'amélioration et la sélection des espèces légumineuses..

❖ **Etude moléculaire :**

Détection de la variabilité génétique interspécifique et intra spécifique entre les sept variétés, par l'utilisation de la technique de marquage moléculaire de l'ADN à savoir microsatellites SSR.

Quant aux valeurs PIC calculées, elles ont montré une grande richesse en information polymorphique chez les différents variétés analysés. Ce polymorphisme des marqueurs a été aussi, démontré par chacune des amorces .

Le calcul des fréquences alléliques pour chacune des espèces, *Vicia faba L*, *Vicia sativa* , a permis de faire des distinctions entre ces différents espèces.

Le PIC moyen pour les 4 amorces utilisées est de 0,644. Le pourcentage moyen de polymorphisme est de 99,35 % avec allèles monomorphes parmi 28 allèles différents au total.

Une hétérozygotie attendue a varié entre 0.751et 0.919 avec une moyenne de 0.835.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

- Agriculture (IITA), Ibadan, Nigeria, 13-15
- Akash et al multi-criteria selection of electric power plants using analytical hierarchy process
- Alaoui S. B. 2009. Référentiel pour la Conduite Technique de la fève (*Vicia faba* L). 92-101
- Amallah L., (2017). Structuration de la variabilité génétique d'une collection de blé dur au Maroc par les marqueurs agro-morphologiques, physico-chimiques, biochimiques et moléculaires et étude des associations marqueurs SSR – paramètres de qualité. Thèse de Doctorat. Université Mohammed V, Rabat PES, p : 25-78.
- Ampomah et Huss.Danell 2016 Genetic diversity of rhizobia nodulating native *Vicia* spp. In Sweden (article)
- APG, 2016; James W. Byng, , Maarten J. M. Christenhusz, Michael F. Fay, Walter S. Judd, David J. Mabberley, Alexander N. Sennikov, Douglas E. Soltis and Pamela S. Soltis. Classification botanique.
- APG,2003; Guignard et Dupont, 2005. Nutritional value of faba beans for broilers Feb 24,
- APG,2009; Birgitta Bremer, Kåre Bremer, , Michael F. Fay, , Douglas E. Soltis, and Pamela S. Soltis, avec la contribution de: Arne A. Anderberg, Michael J. Moore, Richard G. Olmstead, Paula J. Rudall, Kenneth J. Sytsma, David C. Tank, Kenneth Wurdack, Jenny Q.-Y. Xiang and Sue Zmarzty. Classification botanique.
- Arnaud J.F.2006 . Passé, présent et avenir, Une brève histoire des marqueurs moléculaires utilisés en génétique des populations. 69p.
- Arvalis, Infas.Fr,2012 Masson E(2012) Diagnostic des accidents du blé tendre. ARVALIS-Institut du végétal,p36-40.
- Baldwin et creamer 2006 Hortscience,Agriculture ,ecosystems et envirenment 113 (1-4)
- Bardakci,2001Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers
- Bentama et Boursas 2016 Role des pseudomonas rhézosphérique dans l'allègement de l effet du stress salin sur la fève
- Botstein et al., 1980 Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphisms 314-331

- Bouby L et al 2006 Vers une approche bio-archéologique de l'histoire de la vigne cultivée et de la viticulture : problématique ,choix méthodologiques et premiers résultats 61-74
- Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. 1998. DNA markers. New York : Wiley-VCH Inc.364 p
- Chauv C. & C. Floury. 1994. légumineuses potagères, légumes, fruits. Production
- Claros G.M. & Quesada,, A.R. 2000. PCR as a specific, sensitive and simple method
- Cubero,2011Inventaire qualitatif et quantitatif des pucerons inféodés à la culture de la fève .Dynamique des populations de certaines espèces caractéristiques dans deux parcelles de fève *Vicia faba major* dans la région de tizi –Rached (tizi-ouzou).
- Dajoz R., 2000 éléments d'écologie .Ed. Bordas Paris, 5ème édition, 540p.
- Daoui K. 2007. Recherche de stratégies d'amélioration de l'efficience d'utilisation du phosphore chez la fève (*Vicia faba L.*) dans les conditions d'agriculture pluviale au Maroc. Thèse présentée de Doctorat en Sciences agronomiques et ingénierie biologique, 215p.
- De Vienne, D. 1998. Marquage des gènes majeurs. In : De Vienne D, ed. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Paris : INRA Editions, 1998 : 81-7.
- De Vienne, D., et Santoni, S. 1998. Les principales sources de marqueurs moléculaires. In : De Vienne D, ed. Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Paris : INRA Éditions1998 : 15-47.
- Duc G., B. Shiyang, B. Michael, R. Bob, M. Sadiki, M. Jose & M. Vishniakova 2010. Diversity maintenance and use of *Vicia faba L.* genetic resources. Field Crops Research 53: 99-109.
- Edition. Sinauer Associates, Sunderland, 305 p.
- F.A.O ,2013.Cadre Programmation par Pays Algérie (2013 – 2016). République Algérienne Pour l'Alimentation et l'Agriculture Démocratique et Populaire, FAO (organisation des nations unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).
- Fatemi Z. 1996. Situation de la culture des fèves au Maroc, in: Réhabilitation of faba bean. Ed actes, Rabat Maroc, 33-38.
- Ferreira M.Y. & Grattapaglia D. 1998. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Embrapa-cenargen. Brasilia, DF, Brasil. 221 p.

- G.A. 2001. Using legume to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. *Field Crops Research* 70: 27-41.
- Gardiner, S.E., and Forde, M.B. 1992. Identification of cultivars of grasses and forage legumes by SDC-PAGE of seed proteins. pp.43-61. In H.F. Linskens and J.F. Jackson (eds.). *Seed analysis, Modern methods of plant analysis Vol.14.* Springer-Verlag Publishers, Berlin.
- Gordan M.M. 2004. Haricots secs: situation, prospective et agroalimentaires. *Botanique, édition Masson, Canada*, 1-7.
- Graham P.H. & Vance C.P. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, 131: 872-877.
- Hamadache A. 2003. La féverole. *Inst. Tech. Gr. Cult (T.T.G.C)*, 13p.
- Hammamet, Tunisie, 100p.
- Harris, H. 1969. Enzyme polymorphisms in man. *Proc. R. Soc. Edinburgh. Sect.B.164*: 298-310.
- Hartl D.L. 1988. *A primer of population genetics*. 1st
- Hejjaoui kamal Caractérisation génétique des populations locales de *Vicia faba L.* par la technique des SSR :33
- Hullé.M et al., 1999. Les pucerons des plantes maraichères : Cycles biologiques et activités de vol. *Ed Quae. France*. 134 p.
- In: *Réhabilitation of faba bean*. Ed actes, Rabat Maroc, 17-32.
- INRA, 2007. Contribution à l'étude des principales maladies, parasites et ravageurs des fèves et féveroles. *Institut Technique Des Grandes Cultures, Tiaret. Séminaire N°10* :123-125.
- Khaldi R., Zekri S., Maatougui M.E.H. & Ben Yassine A. 2002. l'économie des légumineuses alimentaires au Maghreb et dans le monde. *Proceeding du 2èmeséminaire du réseau remafeve/remala. « le devenir des légumineuses alimentaires dans le Maghreb»*. Hammamet, Tunisie, 100p.
- Laemmli K., (1970).Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.*Nature* 227(5259), p: 680-685.
- Laumonier R. 1979. *Cultures légumières et maraichères, Tome III*. Ed. J.B.bailliere, 276p.
- légumière sec, Tome 3, *Technique et documentation Lavoisier* : 3-15.
- Lezrek B.F. 2008. Analyse de la diversité génétique et systématique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago Truncatula* et recherche des QTL.

245p.

- Lynch M. & Milligan B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.
- Maatougui M.E.H. 1996. la situation des fèves en Algérie et perspectives de reliance,
- Maatougui.M.E.H., 1997. Manuel de formation : Les maladies, les adventices et les ravageurs des fèves en Algérie. Réseau maghrébin de recherche sur fèves (Rémafève). Algérie. 4 p.
- Maxted, N., Callimassia, M.A., Bennet, M.D., 1991. Cytotaxonomic studies of Eastern Mediterranean *Vicia* species (Leguminosae). *Plant Syst. Evol.* 77, 221–234.
- McPherson M.J. & Moller S.G., 2000. *The Basics PCR*. BIOS. Springer-Verlag New York Inc. USA, 276p
- Melake B. 2000. Molecular marker techniques, In: *International Institute of Tropical*
- Michael C. Latham, 2001 *La nutrition dans les pays endéveloppement*. Aut (FrPBN) 1285 1575.
- Mikic A (2011). Words denoting Faba bean (*vicia faba*) in European languages. *Ratar.Povrt./ Field Veg. Crop Res.* 48:233-238.
- Morgante M. & Olivieri A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal: cell and molecular biology.* 3(1) :175-82.
- Moule C. 1972. *Plantes sarclées et diverses*, tome III. *Phytotechnie spéciale*. (eds): La maison rustique, Paris, : 3-1
- Muratova V. S., 1931. - *Vicia faba* L. In: *Bull. Appl. Bot. and Gen. Plant Breed. Suppl.*, 50: 285
- Najimi B., El Jaafari S., Jlibène M. & Jacquemin J.M. 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 7: 17-35.
- Nuessly GS, Hentz MG, Beiriger R, Scully BT (2004). Insects associated with Faba bean, *vicia faba* (fabales, fabaceae), in southern Florida *entomologist.* 87(2):204-211.
- Pannecouque,JVan Waes 2014 thème suivi du comportement de *vicia sativa* pour deux date de semis dans la région de khemis miliana
- Péron, 2006 : Références. *Production légumières*.2
- Plomion C. 2003. Marqueurs génétiques moléculaires.. *Principes des techniques*

- de biologie moléculaire, In : Tagu D., Moussard C., édés 2ème édition. INRA Editions, Paris, France, 143-146.
- Racheff S.A., Ouamer F. Et Ouffroukh A., 2005. Inventaire des ravageurs de la fève en algérie (Identification et caractérisation). I.N.R.A.,16:36-41.
 - Radwan et al 2005, Srivastava et al 2005, M.S., Abdalla, M.M.F., Fischbeck, G., Metwally, A.A., and Darwish, D.S. 1988. Variation in reaction of faba bean lines to different accessions of *Orobanche crenata* Forsk. *Plant Breeding*, 101: 208-216.
 - Ribaut J.M., Williams H.M., Khairallah M., Worland A.J & Hoisington D. 2001. Genetic Basis of Physiological Traits. Application of Physiology in: *Wheat Breeding*, 3: 29-47.
 - Rochester I.J., Peoples M.B., Hulugalle N.R., Gault R.R & Constable
 - Russelle 2001, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., et al. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95 : 714-22.
 - Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T. & Erlich H.A. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences & restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Sciences*, 1350-1354.
 - Saxena M.C, 1991. Status and scope for production of faba bean in the Mediterranean countries. Centre international dans la recherche d'agriculture. séminaire N°10 :15-20.
 - suitable for diagnostics. In : *Biochemistry and Molecular Biology*
 - Swynghedauw B. 2000. *Biologie et génétique moléculaire. Aide-mémoire. 2e édition.* Dunod, Paris. France, 156p.
 - Tagu D. & Moussard C. 2003. *Principes des techniques de biologie moléculaire. 2ème édition.* INRA, Paris, 176p.
 - The origin and spread of domesticated plants in south –west Asia, Europe, and the mediterranean basin.
 - Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijnders M., Van de Lee T. & Hornes M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
 - Wathman F., 1967. *Fleurs du bassin méditerranéen. VIème édition,* Paris.56-61.
 - Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., and Wieland, M. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi.* CRC Press, Boca Raton. 363p.
 - Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18 (24): 7213-7218.

- White T.J., Arnheim N. & Erlich H. 1989. The polymerase chain reaction. Trends in: Genetics, 5: 185-188.
- Zeid, M., S. Mitchell, W. Link, M. Carter, A. Nawar, T. Fulton & S. Kresovich 2009. Simple sequence repeats (SSRs) in faba bean: new loci from Orobanche-resistant cultivar Giza 402, Plant Breeding. 1-7.
- Zohary et al, 2012 Domestication of plants in the old world

Annexes

Annexe 1 : préparation des solutions

1-Tampon d'extraction C TAB pH=8 (250ml)

- 2 % de CTAB 10g .
- Nacl 1.4 M..... 20.25g .
- EDTA 20 mM..... 1.85g .
- Tris HCL 100Mm..... 3.025g .
- 2 % PVP..... 5g .
- 0.2 % 2 mercapto-éthanol..... 0.5 ml .
- QSP 250 ml .

NB: L'agitation se fait à chaud .

2-Solution chloroforme/alcool iso amylique (CIA) (24 :1) (25 ml/50 ml)

- Chloroforme24 ml / 48 ml .
- Alcool iso amylique (3Methyl butanol)..... 1ml /2ml .

3-Tampon de suspension TE 1X (tris EDTA 1X) pH= 7.4 (1 L)

- EDTA 10 mM..... 0.37 g
- Tris 1 mM..... 1.21 g
- Qsp 1000 ml .

NB : l ajustement du pH se fait avec du HCL .(autoclaver la solution et stoker à température ambiante) .

4- Solution de lavage 80 % éthanol 96 °+20 % Acétate de sodium (100 ml)

- Ethanol 96 °..... 80 ml.
- Acétate de sodium 10 Mm 0.77 g/l (0.016 g/20 ml).

5- Solution Tampon CTAB/Mercapto (1/50 échantillons)

- Tampon CTAB..... 750 µl /37.5 ml .
- 2 mercapto-éthanol..... 37.5 µl/1.875 ml .

NB :

- ✓ Nous prélèverons 787.5 µl/0.1 g (par échantillon) .
- ✓ L isopropanol doit être mis , la veille , à -20°c .

Annexe 02 : Préparation des gels d'Agarose.

Gel d'Agarose à 2 %

- 0.50 g Agar
- 25 ml TBE
- 0,6ml pour gel stain.

Le gel d'agarose à 2% est préparé, et dans chaque puits on dépose:

- 8 µL d'eau distillée stérile
- 1 µL de bleu d'agarose
- 1 µL d'ADN.

Annexe 03 : Solutions et tampons utilisés pour SDS-PAGE

- **Tampon d'électrophorèse**

Glycine	1,92M	43 ,2g
Tris(hydrxyméthyl amino Ethan)	0,25M	9,09g
SDS	0,1%	3g
Eau distillée qsp	/	1000 ml

- **Solution de coloration (pour deux gels)**

TCA 60%	100 ml (60gTCA/100ml
Eau distillée)	
Solution mère de Bleu de Coomassie R-250	25 ml
Eau distillée qsp	500 ml

- **Solution mère de bleu de Coomassie R250**
 - **Bleu de Coomassie R250 : 10 g**

- **Ethanol 95° qsp : 1000 ml**

L'éthanol doit être mis en agitation dans l'éprouvette, avec un barreau aimanté. Le bleu de coomassie est ensuite ajouté (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant). Laisser en agitation au moins deux heures, puis filtrer la solution.

- **Composition du Kit (FPM)**

Phophorylase b: rabbit muscle 67µg, molecular weight

97000

Albumin: bovine serum 83µg, molecular weight 66000

Ovalbumin : chicken egg white 147µg, molecular weight

45000

Carbonic anhydrase: bovine erythrocyte 83µg,

molecular weight 30 000

Trypsin inhibitor: soybean 80µg, molecular weight

20 100

α-lactalbumin: bovine milk 116µg, molecular weight

14 400

Annexe 04: Préparation du gel d'électrophorèse pour la SDS-PAGE

Produits	Gel de separation 15% Resolving gel pour 5 ml	Gel de concentration 4% Staking gel Pour 4 ml
Acry mix acry et bisacry 30%	2,5 ml	0,67 ml
1.5M Tris Hcl Ph 8.8	1,3 ml	/
1,0M Tris Hcl Ph 6.8	/	0,5 ml
10% SDS	0,05 ml	0,04 ml
10% APS	0,05ml	0,04 ml
TEMED	0,002 ml	0,004 ml
H2O distillée	1,2 ml	2,7 ml

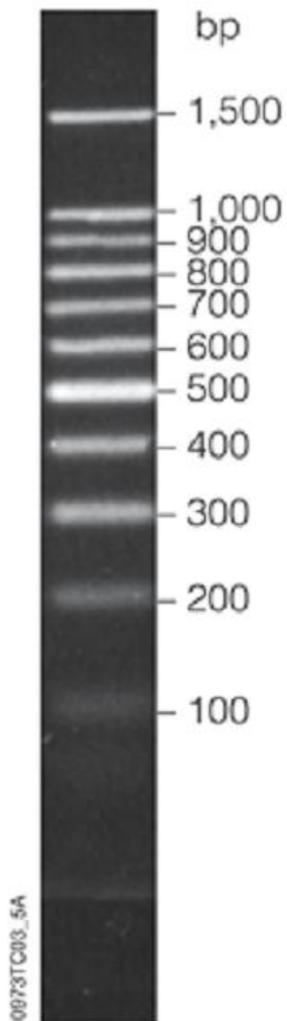
Annexe05 : Réactifs utilisés dans la PCR et leurs concentrations.

Amorce	CAAS8	GBSSR 52	GA4	VFG 87	JF1- AG 3	GATA 2	VFG 14
Buffer	2	2	1	2	2	2	2
Dntp	0,8	0,8	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4
Mgcl	1,6	1,6	0,6	0,8	1,6	0,8	0,8
Forward	0,8	0,8	0,3	0,8	0,2	0,8	0,8
Reverse	0,8	0,8	0,3	0,8	0,2	0,8	0,8
Taq	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
H2O	11,8	11,8	6,3	13	13,4	13	13
ADN	2	2	1	2	2	2	2
V totale	20	20	10	20	20	20	20

Annexe 06 :Préparation de la solution du gel d'acrylamide 6% :

- 1. Peser 25,2 g d'Urée .**
- 2. Ajouter 6 ml de TBE 10X .**
- 3. Ajouter 9 ml d'Acrylamide 40 % conservé**
- 4. Porter à 60 ml à l'aide d'eau désionisée dans un bécher**
- 5. Couvrir avec un film**
- 6. Poser sur agitateur magnétique jusqu'à obtenir une solution claire .**

Annexe07 : Marqueur de taille utilisé



2 % agarose

Marqueur de taille

Bench Top 100 bp DNA Ladder Cat. # G8291 (Promega)

Présenté et soutenu par :
MAGHBOUNE Ibtissem
NEKAA Farah

Année universitaire : 2019 – 2020

**Etude de la variabilité génétique chez l'espèce
(*Vicia faba L.* et *Vicia sativa L.*) par la technique des SSRs**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biodiversité et physiologie Végétale

Résumé

Dans un cadre de projet de recherche portant sur l'origine et la détermination du génome de *Vicia faba* et sa relation avec celui de *Vicia sativa*, nous nous sommes intéressés à l'analyse biochimique des protéines totales, en utilisant la technique de SDS-PAGE, d'une part et d'autre part, à l'analyse de la variabilité génétique grâce aux marqueurs microsatellites, et ceci sur cinq variétés de *Vicia faba* et deux variétés de *Vicia sativa*.

D'après nos résultats, la comparaison des profils protéiques des sept variétés, a révélé une différence significative. L'électrophorèse des protéines natives des graines par SDS-PAGE, paraît être une technique efficace pour la distinction interspécifique des deux espèces. Les profils électrophorétiques des sept variétés obtenus révèlent un polymorphisme très important et présentent au total 30 bandes claires, distinctes, bien séparées, et d'intensité différente de poids moléculaires variant de 2 KDa à 300 KDa avec un taux de polymorphisme conséquent supérieur à 80%.

De plus la classification hiérarchique illustrant les relations entre les sept variétés appartenant à deux espèces (*Vicia faba* et *Vicia sativa*), a montré que ces derniers sont généralement assez distants sauf les variétés Maltais, Aguadulce qui sont proches et qui présentent un taux de similarité égal à 72%. Et Mariana et Histale avec 63% de similarité.

Le calcul des fréquences alléliques pour chacune des espèces, *Vicia faba L.*, *Vicia sativa*, a permis de faire des distinctions entre ces différents espèces.

Le PIC moyen pour les 4 amorces utilisées est de 0,644. Le pourcentage moyen de polymorphisme est de 99,35 % avec allèles monomorphes parmi 10 allèles différents au total.

Une hétérozygotie attendue a varié entre 0.751 et 0.919 avec une moyenne de 0.835.

Mot clés: *Vicia faba*- *Vicia sativa*- SDS-page -SSR- allèle- polymorphisme

Jury d'évaluation :

Président du jury Dr. BOUZID salha (MCB- UFM Constantine).

Encadreur : Dr. HAMMOUDA-BOUSBIA Dounia (MCA- UFM Constantine).

Examinatrice : Dr. BOUDCHICHA Rima (MAB- C.R.Bt)