

## Université Constantine1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie et Ecologie Végétale  
Filière Sciences Biologiques

Université Constantine 1

### Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en  
Biologie et Génomique Végétales

### Thème

Marquage biochimique des hybrides interspécifiques blé  
dur/*Aegilops geniculata*

Présenté par : BOURENI Meriem Ibtissem  
KOURTELI Amel

Devant le jury d'évaluation :

**Président** : Mr. BENBELKACEM Abdelkader

Dr. INRAA Constantine.

**Encadreur** : Mr. KELLOU Kamel

MAA. Univ. Constantine – 1.

**Examineur** : Mlle. BENABDOUN Faiza Meriem

MAB. Univ. Constantine – 1.

Soutenu le : 22 juin 2014

Année universitaire 2013-2014

## **Remerciements**

*Nous remercions d'abord ALLAH de nous avoir donné la patience, le courage d'accomplir ce travail.*

*Nos remerciements s'adressent à l'encadreur Monsieur KELLOU.K, Maitre-assistant à l'Université Constantine 1. Nous tenons à le remercier pour son accueil, sa prise en charge et ses conseils.*

*Un grand merci aux membres du jury ainsi qu'à son président qui ont bien voulu évaluer et juger notre travail.*

*Nous vifs remerciements à Mlle BOULDJEDJE Rima.*

*Nous tenons à remercier toute nos familles, nos amies et toute personne ayant collaboré de près ou de loin à l'élaboration de notre travail.*

## Dédicaces

*Je Dédie ce travail à mes parents, mes chères sœurs, mes amies et à ma chère binôme dans ce mémoire Amel.*

*Meriem Ibtissem.*

## Dédicaces

*Je Dédie ce travail à ma mère, à l'esprit de mon  
cher père, ma sœur, mes frère, mes amies Nor  
elhoda et Oumaima, mon cher oncle Med Saleh,  
et à ma chère binôme Meriem.*

*Amel*

## Liste des abréviations

**4VP** : 4-VinylPyridine.

**Ae** : *Aegilops*.

**APS** : Ammonium Per Sulfate.

**C%** : Bisacrylamide (gr/(Acrylamide+bisacrylamide)(gr)x100.

**Chr** : Chromosome.

**CS** : Chinese Spring.

**DTT** : Dithiotreitol.

**H10** : Hybride numéro 10.

**IEF** : Iso Electro Focalisation.

**KDa** : Kilo Dalton.

**LMW** : Low Molecular Weight.

**MWS** : Molecular Weight of Sulphur.

**OZ** : Oued Zenati.

**PG** : Pool Génétique.

**Ph1** : Pairing Homeologous1.

**PI** : Point Isoélectrique.

**Qsp** : quantité suffisante pour.

**RIL** : *Recombinant* Inbred Lines.

**RM** : Mobilité Relative.

**SDS-PAGE** : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis.

**SG-FPM** : Sous unités Gluténines à Faible Poids Moléculaire.

**SG-HPM** : Sous unités Gluténines à Haut Poids Moléculaire.

**T%** : Acrylamide+Bisacrylamide (gr)/Total x100.

**Tris** : Trishydroxyméthylaminométhane.

**Var** : Variété.

## Liste des figures

<b>Figure 01</b> : Les étapes de l'évolution du blé dur.....	4
<b>Figure 02</b> : Composition protéique de la farine de blé.....	12
<b>Figure 03</b> : Localisation chromosomique des principaux gènes codant pour les gluténines et les gliadines chez le.....	13
<b>Figure 04</b> : Matériel végétal.....	22
<b>Figure 05</b> : Profils électrophorétiques des gluténines chez les 17 génotypes étudiés : (1) - Florence Aurore "variété standard", (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- <i>Aegilops geniculata</i> , (8)- Back Cross "H10/OZ", (9)- Oued Zneti, (10)- Chinese Spring "variété standard", (11)- H1815, (12)- H18, (13)- H1814, (14)- H1816, (15)- H1817, (16)- H1818, (17)- H1822, (18)- Marqueur de taille "Amersham LMW".....	27
<b>Figure 06</b> : Profils électrophorétiques des gluténines chez les 17 génotypes étudiés : (1) – Ziad "variété standard", (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- Oued Zneti, (8)- Back Cross "H10/OZ", (9)- <i>Aegilops geniculata</i> , (10)-Courtot "variété standard", (11)- Marqueur de taille "Amersham LMW", (12)- H1815, (13)- H18, (14)- H1814, (15)- H1816, (16)- H1817, (17)- H1818, (18)-H1822.....	28
<b>Figure 07</b> : Profils électrophorétiques des gliadines chez les 17 génotypes étudiés : (1)- Florence Aurore "variété standard", (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- <i>Aegilops geniculata</i> , (8)- Back Cross "OZ/H10", (9)- Oued Zneti, (10)- Chinese Spring "variété standard", (11)- H1815, (12)- H18, (13)- H1814, (14)- H1816, (15)- H1817, (16)- H1818, (17)- H1822, (18)- Marqueur de taille "Amersham LMW".....	39
<b>Figure 08</b> : Profils électrophorétiques des gliadines chez les 17 génotypes étudiés : (1) – Ziad "variété standard", (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- Oued Zneti, (8)- Back Cross "OZ/H10", (9)- <i>Aegilops geniculata</i> , (10)-Courtot "variété standard", (11)- Marqueur de taille "Amersham LMW", (12)- H1815, (13)- H18, (14)- H1814, (15)- H1816, (16)- H1817, (17)- H1818, (18)-H1822.....	40
<b>Figure 09</b> : Dendrogramme de similarité des lignées et de leurs parents blé dur/ <i>Aegilops geniculata</i> .....	41

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01</b> : Classification génomique des <i>Aegilops</i> .....	6
<b>Tableau 02</b> : Transfert chez le blé de gènes de résistance aux maladies et aux parasites, issues de différentes espèces du genre <i>Aegilops</i> .....	10
<b>Tableau 03</b> : Présentation du matériel végétal.....	21
<b>Tableau 04</b> : Types de diagrammes des sous unités de haut poids moléculaire observés chez les lignées <i>RILs</i> étudiées.....	31
<b>Tableau 05</b> : Types de diagrammes des sous unités de haut poids moléculaire observés chez les parents blé dur/ <i>Aegilops geniculata</i> .....	31
<b>Tableau 06</b> : Fréquences alléliques des différents loci répertoriés chez les individus étudiés.....	32
<b>Tableau 07</b> : Poids moléculaires des différentes bandes SG-HPM détectées chez les parents blé dur/ <i>Aegilops geniculata</i> .....	34
<b>Tableau 08</b> : Poids moléculaires des différentes bandes SG-HPM détectées chez les descendants.....	35
<b>Tableau 09</b> : Poids moléculaires des différentes bandes SG-FPM détectées chez les hybrides.....	38

# Sommaire

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
1. Amélioration des blés par les croisements interspécifique .....	3
1.1. Présentation génétiques de blé.....	3
1.2. Présentation du genre <i>Aegilops</i> .....	4
1.2.1. Description botanique du genre <i>Aegilops</i> .....	4
1.2.2. Classification des <i>Aegilops</i> .....	5
1.2.3. Génome d' <i>Aegilops</i> .....	5
1.3. Crossabilité entre blé et <i>Aegilops</i> .....	7
1.4. Les croisements interspécifiques.....	8
2. Les protéines de blé.....	10
2.1. Classification.....	11
2.1.1. Les protéines métaboliques.....	11
2.1.2. Les protéines de réserves.....	12
2.2. Importance des Protéines de réserves.....	13
2.2.1. Les gliadines.....	14
2.2.2. Les gluténines.....	15
2.3. Les protéines de réserve et la qualité technologique de blé.....	16
3. Les techniques d'analyse des protéines de réserve.....	17
3.1. SDS-PAGE (monodimensionnelle).....	18
3.2. Acid-PAGE (monodimensionnelle).....	19
3.3. IEF/SDS-PAGE, NEPHGE/SDS-PAGE (bidimensionnelle).....	20

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

1. Matériel végétal.....	21
2. Méthodes.....	22
2.1. Méthodes d'extraction des protéines de réserve .....	22
2.2. Technique d'électrophorèse.....	23
2.3. La séparation des protéines par SDS-PAGE.....	23
2.3.1. Préparation des gels.....	24
2.3.2. Migration.....	24
2.3.4. Coloration et décoloration des gels.....	25
2.3. Lecture des diagrammes électrophorétiques.....	25

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

1. Diversité génétique des sous unités gluténines HPM.....	27
1.1. Diagrammes types obtenus.....	30
1.2. Calcul des fréquences alléliques.....	32
1.3. Etude comparative des diagrammes électrophorétiques des sous unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM).....	33
2. Diversité génétique des sous unités gliadines HPM.....	37
3. Diversité génétique des gliadines.....	39
4. Etude de similarité des individus.....	41
<b>Conclusion</b> .....	43
<b>Références bibliographiques</b> .....	45

**Annexes**

**Résumé**

# Introduction

Depuis plusieurs millénaires, le blé n'a cessé de se diversifier à l'échelle de la planète. Il s'est enrichi, en particulier grâce à sa domestication par l'homme, qui a sélectionné à chaque récolte les grains qu'il a jugé les meilleurs pour les ressemer.

Le blé dur "tétraploïde avec le génome A et B  $2n = 28$ " et le blé tendre "hexaploïde avec les génomes A, B et D  $2n = 42$ ", résultent de l'hybridation entre des blés cultivés, et la graminée sauvage *Aegilops*. Ce qui permet l'introduction dans le blé des nouvelles variabilités, mais jusqu'à présent ces variabilités essentiellement été réalisée au travers de l'exploitation de la variabilité présente chez les espèces apparentées appartenant à la tribu des Triticées.

Le blé dur est principalement consommé sous forme de semoule et de pâtes alimentaires. Sa qualité technologique est évaluée au travers de plusieurs critères, parmi ceux-ci, on distingue la valeur semoulière et la valeur pastière. Le rendement semoulier varie selon la taille, le poids du grain et la vitrosité du grain tandis que la qualité pastière dépend de la composition qualitative et quantitative en protéines.

Du fait de leur abondance et de leur importance économique, les protéines de réserve des graines ont été historiquement presque les premières protéines étudiées. Dans les blés modernes ont été étudiées pour leurs propriétés technologiques et nutritionnelles. Elles font partie des prolamines et sont constituées par un mélange complexe de protéines. Les prolamines regroupent d'une part les protéines monomériques "les gliadines" et d'autre part les protéines polymérique "les gluténines" de haut et de faible poids moléculaire.

Les protéines de réserve, choisies dans notre étude comme marqueurs biochimiques, sont des constituants clés de la valeur d'utilisation des grains et graines de grande culture. Ainsi, le marquage génétique "biochimique ou moléculaire" permet d'observer, de façon plus ou moins fine, le polymorphisme de séquences d'ADN d'un certain nombre de sites ou de locus répartis sur le génome du blé.

Plusieurs techniques sont utilisées pour fractionner les protéines de réserve et parmi ces techniques la SDS-PAGE (monodimensionnelle) décrite par Laemmli 1970.

L'objectif de notre étude est d'analyser la variabilité génétique qui existe chez les lignées recombinantes ''RIL'' issues d'une série d'autofécondation des descendants de croisement interspécifique entre le blé dur (*Triticum durum* Desf.) et l'espèce sauvage *Aegilops geniculata* Roth. Par l'utilisation des protéines de réserves (gluténines et gliadines).

Le manuscrit est organisé en trois chapitres : le premier résume la similarité entre les génomes de blé et *Aegilops*, la possibilité de crossabilité entre eux par des croisements interspécifiques et la présentation des caractéristiques biochimiques et génétique des protéines de réserves et leurs effets sur la qualité technologique de blé, avec l'analyse de ces protéines par la SDS-PAGE.

Le matériel végétal et l'ensemble des méthodes qui ont été employées sont décrits au deuxième chapitre.

Le troisième chapitre concerne la présentation et l'interprétation des résultats.

# Chapitre II

## Synthèse bibliographiques

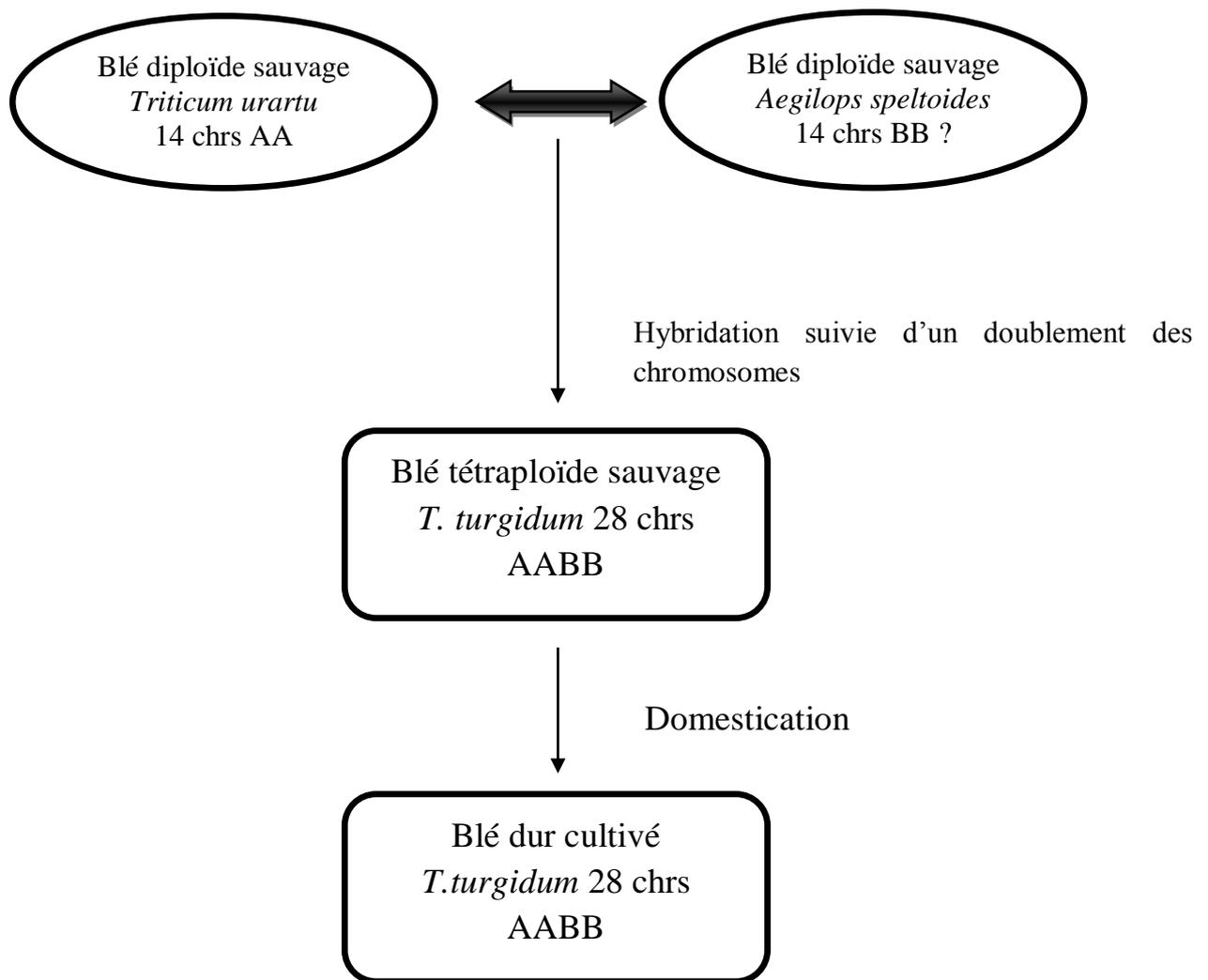
# 1. Amélioration des blés par les croisements interspécifique

## 1.1. Présentation génétiques de blé

Le blé est fait partie des trois grandes céréales avec le maïs et le riz, il peut être pris comme référent pour définir les caractères botaniques des céréales, ceci est due principalement à deux raisons : la première c'est sa large distribution et sa capacité à s'adapter à différents types de climat, et la deuxième, à cause des propriétés de la farine du blé dans les domaines d'alimentation. Sa culture est plus facile que celle du riz, elle ne demande pas d'aménagement du champ ni trop d'entretien.

Les deux espèces de blé les plus cultivées au monde sont le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) qui représente plus de 90% de la production mondiale et le blé dur (*T. durum* Desf.) qui constitue 5% de celle-ci et qui est traditionnellement cultivé dans le bassin méditerranéen (Gooding, 2009). D'un point de vue botanique, le blé est une monocotylédone appartenant à la famille des poacées (ou graminées), divisées génétiquement selon leur nombre de chromosomes ( $2n$ ). Le blé dur, utilisé pour la fabrication de pâtes alimentaires, présente un génome tétraploïde (génome AA BB). Chaque génome est constitué de 7 paires de chromosomes homéologues, soit un total de 28 chromosomes ( $2n = 4x = 28$ ). Le blé tendre, essentiellement utilisé pour la fabrication du pain, est hexaploïde (génome AA BB DD) avec un total de 42 chromosomes ( $2n = 6x = 42$ ), (Feillet, 2000).

Le blé dur est un hybride naturel, c'est un allotétraploïde avec la constitution génomique AABB. Ses deux génomes proviennent d'espèces diploïdes sauvages (*T. urartu* et probablement *Aegilops speltoides* respectivement) (Figure 01). Les deux progéniteurs originaires du Moyen Orient, se sont croisés dans la nature il y a 10.000 ans (Harlan, 1992) et ont donné naissance au blé tétraploïde « l'amidonner » (*T. turgidum* var *dicoccoides* Korn), qui par domestication a donné le blé dur (Huang et al., 2002).



**Figure 01: Les étapes de l'évolution du blé dur (D'après Jauhar et *al.*, 1999).**

## 1.2. Présentation du genre *Aegilops*

### 1.2.1. Description botanique du genre *Aegilops*

Quezel et Santa (1962) décrivent le genre comme suit : « épis simple, articulés avec la tige et tombant à maturité d'une seule pièce. Epillets indépendants, sessiles et alternes, placés par une de leur faces dans des excavations du rachis et appliqués contre lui, à deux fleurs fertiles accompagnées de rudiments ou multiflore, l'épillet terminal fait exception et s'applique sur le rachis par le côté, glumes très difficile à détacher du rachis par le côté. Concaves, souvent plus au moins renflées par le milieu, non carénées, à sommet tronqué et portant 1 à 5 arêtes ou dents, toute fois mutiques, non carénées. »

### 1.2.2. Classification des *Aegilops*

Depuis la découverte des *Aegilops*, plusieurs classifications ont été proposées. En effet, les avis entre botanistes et généticiens sont divergents, l'ambiguïté réside dans le fait de classer les *Aegilops* avec les *Triticum* ou les traiter séparément et vis versa. Ainsi Zhukovsky, (1928) et Eig, (1929) ont tout deux établi des classifications basées sur l'étude des caractères morphologiques et la distribution géographique. La classification de (Kihara, 1954) a été proposée sur une analyse des génomes, avec des formules pour les différents génomes. La classification la plus importante est celle de Van Slageren, (1994), elle traite les *Aegilops* en un genre séparé de *Triticum*. Selon lui deux genres sont retenus, le genre *Amblyopyrum* représenté par une seule espèce et le genre *Aegilops* divisé en cinq sections : *Aegilops*, *Comopyrum*, *Cylindricum*, *Sitopsis* et *Vertebrata*, (Zhukovsky, 1928 in Raskina et al., 2004).

### 1.2.3. Génomes d'*Aegilops*

Les 22 espèces *Aegilops* peuvent être divisées en trois groupes sur la base de leur ploïdie : 11 diploïdes, 10 tétraploïdes et 2 hexaploïdes. Les diploïdes d'*Aegilops* sont divisés selon le type du génome en 7 groupes : C (*Ae. markgrafii*), M (*Ae. comosa*), N (*Ae. uniaristata*), D (*Ae. tauschii* = *Ae. squarrosa*), U (*Ae. umbellulata*), T (*Ae. mutica*) et S (*section sitopsis*) (Tableau 01), (Van Slageren, 1994).

**Tableau 01 : Classification génomique des *Aegilops* selon Van Slageren (1994).**

<b>Section</b>	<b>espèce</b>	<b>Ploïdie</b>	<b>Génome</b>
<b>Section <i>Aegilops</i></b>	<i>Aegilops biuncialis</i> <b>(Vis).</b>	4x	UM
	<i>Aegilops geniculata</i> <b>(Roth).</b>	4x	UM
	<i>Aegilops neglecta</i> <b>(Req ex Bertol).</b>	4x et 6x	UM
	<i>Aegilops peregrina</i> <b>(Hack. In J.Fraser Marie et Weiller).</b>	4x	US
	<i>Aegilops umbellulata</i> <b>(Zhuk).</b>	2x	U
	<i>Aegilops columnaris</i> <b>(Zhuk).</b>	4x	UM
	<i>Aegilops triuncillis</i> L.	4x	UC
	<i>Aegilops kotschyi</i> Boiss.	4x	US
<b>Section <i>Comopyrum</i> (Jaub. et Spach) Zhuk.</b>	<i>Aegilops comosa</i> <b>(Sm. In Sibth. Et Sm).</b>	2x	M
	<i>Aegilops uniaristata</i> <b>(Vis).</b>	2x	N
<b>Section <i>cylindropyrum</i> (Jaub.et Spach) Zhuk.</b>	<i>Aegilops caudata</i> L.	2x	C
	<i>Aegilops cylindrica</i> <b>(Host).</b>	4x	DC
<b>Section <i>Sitopsis</i> (Jaub et Spach) Zhuk</b>	<i>Aegilops bicornis</i> <b>(Forssk.)( Jaub. et Spach)</b>	2x	S
	<i>Aegilops longissima</i> <b>(Schweinf. Et Muschl).</b>	2x	S
	<i>Aegilops searsii</i> <b>(Feldmen et Kislev ex Hammer)</b>	2x	S
	<i>Aegilops sharonensis</i> <b>(Eig)</b>	2x	S
	<i>Aegilops speltoides</i> <b>(Tausch)</b>	2x	S
<b>Section <i>Vertebrata</i> Zhuk.emend. Kihara Ae.juvenalis (Thell ).Eig</b>	<i>Aegilops tauschii</i> <b>(Coss).</b>	2x	D
	<i>Aegilops vavilovii</i> <b>(Zhuk.)(Chenav)</b>	6x	DMS
	<i>Aegilops crassa</i> <b>(Boiss).</b>	4x et 6x	DDM
	<i>Aegilops ventricosa</i> <b>(Tausch)</b>	4x	DN
<b><i>Amblyopyrum</i> (Jaub. et Spach) Eig</b>	<i>Amblyopyrum muticum</i> (Boiss.) <b>(Eig)</b>	2x	T

### 1.3. Crossabilité entre blé et l'*Aegilops*

Le réservoir de variabilité exploitable dans l'amélioration du blé peut être divisé en trois pools génétiques :

- PG 1 : pool génétique primaire qui comprend tout le matériel appartenant à la même espèce (intra-spécifique).
- PG 2 : pool génétique secondaire dont font partie tous les autres blés (2x, 4x, 6x), les progénitures du blé et les *Aegilops* qui possèdent au moins un génome homologue de ceux du blé.
- PG 3 : pool génétique tertiaire formé par les Triticées ne possédant pas de génome homologue de ceux du blé tendre. L'orge et seigle en font partie.

Il est évident que la recherche de gènes se fait d'abord dans PG 1 puis dans PG 2 et, enfin dans PG 3, (Doussinault et *al.*, 2002).

Les chromosomes correspondants des deux génomes du blé sont appelés homéologues et du point de vue de l'évolution, il est considéré qu'ils ont une origine commune (Kimber et Feldman, 1987).

En dépit d'une certaine affinité, les chromosomes homéologues des génomes A, B et D ne s'apparient normalement pas à la méiose, l'appariement se fait seulement entre chromosomes homologues. Toutes les espèces de blés, même polyploïdes, ne présentent que des bivalents à la méiose et l'hérédité est de type disomique. Le comportement de diploïde des blés polyploïdes est contrôlé génétiquement par un ensemble de gènes, dont le plus important est le gène *Ph1* « *Pairing homeologous 1* » situé sur le bras long du chromosome 5B (Feldman, 1994), qui empêche les appariements entre chromosomes homéologues.

Les études caryologiques de Sears, (1941) in Kimber et Yen, (1989), sur plusieurs espèces d'*Aegilops* ont démontré que leur nombre chromosomique ( $x = 7$ ) est le même que celui du blé.

Parmi les espèces polyploïdes d'*Aegilops* et de *Triticum* on distingue trois groupes dont chacun d'eux renferme des espèces polyploïdes ayant un génome en commun, appelé

génomique « pivot » (A, U ou D) qui a peu changé par allopolyploïdisation et par spéciation (Zohary et Feldman, 1962). Pendant que le deuxième génome (ou bien le troisième) (M, N, C et S) a connu des modifications.

Cette structure génétique (un génome en commun et un ou deux différenciés) peut expliquer le taux comparativement élevé d'hybridation spontanée réussie (et par conséquent le flux de gènes) entre polyploïdes (Kimber et Yen, 1989). L'hybridation est facilitée par le génome commun, qui agit comme un tampon, assurant ainsi une certaine fertilité dans les hybrides résultants.

Au sein des *Aegilops*, quelques gènes peuvent supprimer l'effet du locus *Ph1* et donc permettre l'appariement des chromosomes homéologues (Hegde et Waines, 2004). Cette suppression a été observée la première fois, sur des hybrides entre le blé tendre et *Aegilops speltoides* (Feldman et Mello-sampayo, 1967. Dover et Riley, 1972).

Depuis, cet effet a été observé sur des hybrides avec certains génotypes d'*Aegilops*. Il se peut que tous les diploïdes d'*Aegilops* et de *Triticum* effectuent cette suppression (Van Slageren, 1994).

Par contre, il n'est pas encore clair si les gènes au sein des espèces polyploïdes sont aussi capables de supprimer l'effet du locus *Ph1*, favorisant ainsi l'appariement des chromosomes homéologues et donc l'introgession (Hegde et Waines, 2004).

#### **1.4. Les croisements interspécifiques**

L'hybridation interspécifique ouvre des perspectives nouvelles complémentaires des méthodes d'hybridation intraspécifique.

Les premières hybridations du blé ont été réalisées par Rayndrid en 1851, et ont été suivies par Henry de Vilmorin en 1873. Mais c'est surtout à partir du concept de lignée pure défini par Johanssen en 1903, que la sélection généalogique a été mise au point dans un premier temps à l'intérieur des populations, puis à partir de croisement, (Gallais et Bannerot, 1992).

Les hybrides interspécifiques permettent de créer des espèces entièrement nouvelles. L'obtention du triticale est l'exemple le plus célèbre de création d'une espèce

végétale entièrement nouvelle par l'homme. Il est issu de croisement entre le blé et le seigle (*Secale cereale* L.) (Lukaszewski et Gustafson, 1987 in Gupta et Tsuchiya, 1991).

De nombreuses espèces cultivées sont des hybrides interspécifiques naturels, c'est le colza qui résulte du croisement du chou (*Brassica oleracea* Dedyver) et de la navette (*Brassica campestris*).

Donc, les croisements interspécifiques sont un moyen efficace dans l'amélioration des plantes pour le transfert des gènes et la production d'haploïdes. En biologie, ils sont intéressants pour l'étude des génomes, le comportement des chromosomes et les relations phylogéniques (Chandler et *al.*, 1986).

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

Lorsque les espèces présentent une homologie génétique suffisante, les barrières génétiques peuvent parfois être surmontées à l'aide de différentes techniques. Ainsi, l'utilisation de la technique de sauvetage d'embryon sur milieu synthétique aide l'embryon hybride à survivre.

Le sauvetage d'embryon après croisement interspécifique est parmi les techniques les plus utiles et les plus efficaces de la culture des cellules et tissus (Bridgen, 1994).

Cette technique a ainsi permis d'étudier certains phénomènes dont l'observation est compliquée comme les facteurs induisant l'embryogenèse, la nutrition de l'embryon et de suivre les changements accompagnent le développement de l'embryon.

Les espèces de *Triticum* peuvent être croisées à la main avec les genres *Aegilops*, *Secale*, *Agropyron*, *Haynaldia*, *Hordeum* et *Elymus*, dont, des hybrides trigeniriques sont aussi formés dans certains cas, (Jiang et *al.*, 1994). Les croisements du *Triticum* avec les espèces d'*Aegilops* tétraploïdes a eu comme conséquence des graines hybrides avec lesquelles des lignées d'addition, de substitution et de translocation pour les gènes de résistance aux stress biotique et abiotique ont été sélectionnées (Spetsov et *al.*, 1996).

**Tableau 02 : Transfert chez le blé de gènes de résistance aux maladies et aux parasites, issues de différentes espèces du genre *Aegilops* (Zaharieva, 1996).**

Maladies et parasites	Espèces	Gènes	Références
Rouille brune ( <i>Puccinia recondita</i> )	<i>Aegilops. umbellulata</i>	<i>Lr 9</i>	Sears (1956)
Rouille noire ( <i>Puccinia graminis</i> )	<i>Ae. comosa</i>	<i>Sr34</i>	McIntosh <i>et al.</i> , (1982)
Rouille jaune ( <i>Puccinia striiformis</i> )	<i>Ae. tauschii</i>	<i>Yr28</i>	McIntosh <i>et al.</i> , (1988)
Oïdium ( <i>Erysiphe graminis</i> )	<i>Ae. speltoides</i>	<i>Pm12</i>	Miler <i>et al.</i> , (1988)
Nématodes à kystes ( <i>Heterodera avenae</i> )	<i>Ae. ventricosa</i>	<i>Mn1</i>	Dosba and Rivoal (1981) (Rivoal <i>et al.</i> , (1986, 1993)
Punaise du blé ( <i>Schizaphis graminum</i> )	<i>Ae. speltoides</i>	<i>Gb5</i>	Tyler <i>et al.</i> , (1987)
Cécidomyie ( <i>Mayetiola destructor</i> )	<i>Ae. ventricosa</i> <i>Ae. tauschii</i>	<i>H27</i> <i>H13, H22, H23, H24</i>	/ Raupp <i>et al.</i> , (1993)

## 2. Les protéines de blé

Les protéines sont des macromolécules constituées par assemblage de longues chaînes d'acides aminés, elles sont présentes dans tous les organismes vivants et elles assurent l'essentiel des fonctions de la cellule.

Elles ont des propriétés fonctionnelles variables notamment en fonction de la structure et de la conformation des protéines (l'état de dénaturation, comme la dissociation, l'hydrolyse), ainsi que des conditions physico-chimiques (pH, température, force ionique). (Dumas, 2007).

Les végétaux représentent une source importante de protéines, qui sont essentiellement les prolamines, gluténines et les globulines. Les aliments qui procurent le plus de protéines dans une alimentation végétarienne sont les légumineuses (pois, haricot, lentille et soja) ainsi que les céréales (blé, avoine, riz et orge).

Les protéines de blé sont les plus connues parmi les protéines des céréales (Benmbarek, 2004). Chez le grain de blé, les protéines représentent entre 10 et 15% de la matière sèche et se retrouvent dans tous les tissus du grain de blé avec une concentration plus importante dans le germe et la couche à aleurone (Pomeranz, 1988). En

plus d'autres constituants comme l'amidon qui représente environ 70% et les pentosanes (polysaccharides non amylicés) représentent quant à eux entre 2 et 3% de la matière sèche et sont les principaux constituants des parois cellulaires de l'albumen (70 à 80%).

## **2.1. Classification**

Osborne en 1907, a été le premier à s'intéresser à la classification des protéines du grain de blé. En 1924, il définit quatre groupes de protéines caractérisés par leur solubilité dans différents milieux (Osborne, 1924) :

- \* Les albumines qui sont solubles dans l'eau.
- \* Les globulines qui sont solubles dans les solutions salines.
- \* Les gliadines qui sont solubles dans des mélanges hydro-alcooliques
- \* Les gluténines qui sont solubles dans des solutions basiques ou acides.

Cette classification a été revue en 1986 par Shewry et collaborateurs qui ont proposé deux grandes catégories :

### **2.1.1. Les protéines métaboliques**

#### **a) Les albumines et globulines**

Les albumines et globulines représentent 15 à 20% des protéines présentes dans la farine de blé et sont solubles respectivement dans l'eau et les tampons salins. Ce groupe de protéines est très diversifié de par ses propriétés physicochimiques (compositions en acides aminés, points isoélectriques et poids moléculaires). Ces protéines participent à la formation du grain et à l'accumulation des réserves dans l'albumen (Vensel *et al.*, 2005).

#### **b) Les protéines amphiphiles**

Les protéines amphiphiles représentent entre 5 et 9% des protéines présentes dans la farine de blé. Elles possèdent un pôle hydrophobe et un pôle hydrophile. Ces protéines sont solubles dans le détergent Triton X114 et sont liées aux membranes. Elles jouent un rôle important dans la qualité, notamment les puroindolines qui sont connues pour avoir un effet sur les propriétés technologiques de la pâte (Igrejas *et al.*, 2001). Les travaux réalisés par (Amiour *et al.*, 2003) ont permis d'assigner certaines de ces protéines sur les chromosomes du blé tendre.

### 2.1.2. Les protéines de réserves

Les protéines de réserves sont synthétisées et accumulées dans l'endosperme au cours du développement de la graine pour la germination éventuelle de la graine. Elles sont composées de 10% d'albumine et globuline et 90% de gluten (Schofield et *al.*, 1983). Elles ont un rôle métabolique ou de défense en plus de leur importance dans la qualité technologique.

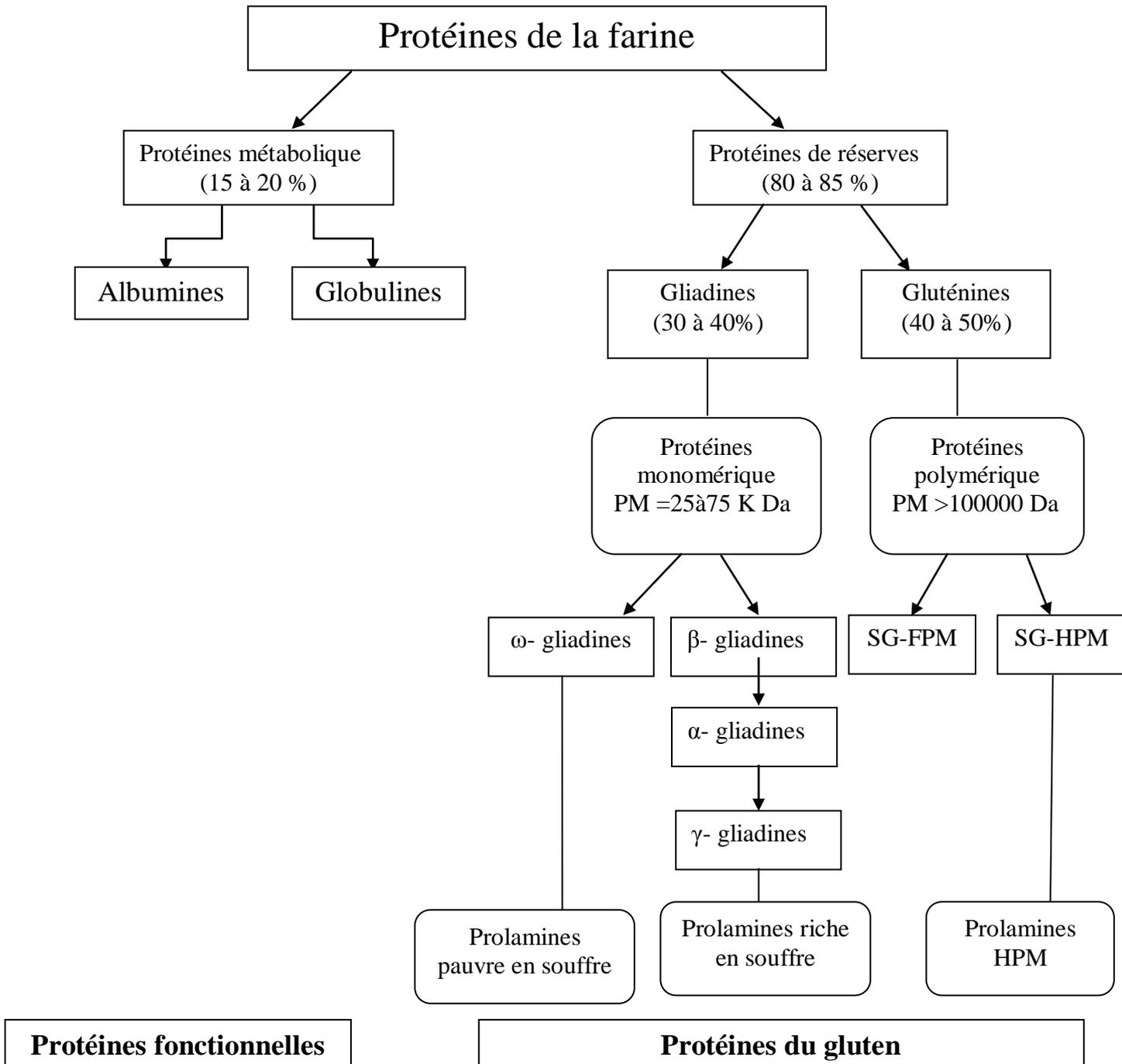


Figure 02 : Composition protéique de la farine du blé  
(Rapprochement des classifications d'après Osborne et Shewry 1986).

## 2.2. Importance des protéines de réserves

Du fait de leur abondance et de leur importance économiques, les protéines de réserve des graines ont été historiquement presque les premières protéines étudiées. Au début du siècle dernier (Osborne, 1924). Font partie des prolamines et sont constituées par un mélange complexe de protéines. Chez le blé, les gènes codant pour ces protéines sont situés sous forme de « cluster » de 2 à plus de 40 séquences codantes et dépourvues d'introns (Wrigley, 2006).

L'Analyse génétique de ces protéines est aujourd'hui bien avancée. Ainsi, sur les vingt une paires de chromosomes du génome du blé tendre, six d'entre elles sont responsable de la synthèse des gliadines et trois de celles des gluténines. Chez le blé tendre, ces protéines sont codées par des gènes situées sur douze principaux locus complexe (Branlard et al., 1992).

Les locus *Glu-1*, *Glu-3* code respectivement pour les SG-HPM et les SG-FPM et les *Gli-1* pour les  $\omega$ -gliadines, sont situées sur les chromosomes 1A, 1B et 1D, tandis que les locus *Gli-A2*, *Gli-B2* et *Gli-D2* codant pour les  $\alpha$ - $\beta$ - et  $\gamma$ -gliadines sont sur les bras court des chromosomes 6A, 6B et 6D (Branlard, 2009).



Figure 03 : Localisation chromosomique des principaux gènes codant pour les gluténines et les gliadines chez le blé (in Amri, 2011).

Les protéines monomériques formées d'une seule chaîne polypeptidique (Les gliadines) et d'autre part les protéines polymériques car elles sont formées de l'association de plusieurs sous-unités par des ponts disulfures intermoléculaires (les gluténines), qui sont elles mêmes constituées de deux sous groupes :

- Les sous unités de gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM) sont moins polymorphes et ont une masse molaire comprise entre 100 et 160 KDa.
- Les sous unités de gluténines de faible poids moléculaire (SG-FPM) sont très polymorphes et ont des masses molaires comprises entre 30 et 70 KDa (Debiton, 2010).

D'une manière générale, la proportion entre ces différentes prolamines est la suivante : 40% de gliadines, 40% SG-FPM et 20% de SG-HPM.

Ces protéines ont aussi été classées selon leur composition et séquences. On distingue :

- Les prolamines riches en soufre : représentent 70% des prolamines et sont constituées des gliadines de type  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et des SG-FPM.
- Les prolamines pauvres en soufre : représentent entre 10 et 12% des prolamines totales et sont exclusivement constituées des gliadines de type  $\omega$ .
- Les prolamines de haut poids moléculaire : représentent 20% des prolamines, et sont de deux types différents : x et y. Ces prolamines ont la capacité de former des structures polymériques avec les SG-FPM et certaines gliadines par l'intermédiaire de ponts disulfures (Debiton, 2010).

### **2.2.1. Les gliadines**

Les gliadines représentent 45 % des prolamines totales. Elles présentent le plus grand polymorphisme, selon les variétés, elles peuvent renfermer 20 à 40 constituants différents (Brown et Flavell, 1981), et sont responsables des propriétés d'extensibilité des pâtes.

On distingue 3 fractions de gliadines définies en fonction de leur mobilité électrophorétique à pH acide: les  $\alpha$ - $\beta$ , 44-60 %, les  $\gamma$ , 30-46 et les  $\omega$ -gliadines, 6-20 % (Wieser et *al.*, 1998). Leurs masses moléculaires sont comprises entre 30 et 40 KDa pour les  $\alpha$ - $\beta$  et  $\gamma$ -gliadines, entre 60 et 80 KDa pour les  $\omega$ -gliadines (Bunce et *al.*, 1984).

Les gliadines sont parmi les protéines connues les moins chargées. Elles ne renferment que 6 à 11 résidus basiques par molécule et 95 % des résidus glutamiques et aspartiques sont amides. Les  $\omega$ -gliadines ont des points isoélectriques compris entre 5.5 et 7.0, et ceux des  $\alpha$ - $\beta$  et  $\gamma$ -gliadines sont compris entre 6.5 et 8.

Les  $\omega$ -gliadines se distinguent des autres familles par leur poids moléculaire (55-75 KDa), une forte teneur en glutamine et en proline et surtout par l'absence de cystéine. Alors que les  $\alpha$ - $\beta$ , et  $\gamma$ -gliadines contiennent moins de glutamines et de prolines, mais elles sont riche en acides aminées soufré avec des poids moléculaires variant de 30-60 KDa (Blanch et *al.*, 2003).

La particularité de la composition en acides aminées des gliadines a une influence sur la charge, la structure et la conformation des valeurs nutritionnelles (Fido, 1997)

### **2.2.2. Les gluténines**

Les gluténines représentent 40 à 50 % des protéines de réserves totale de grain de blé, elles jouent un rôle déterminant dans la qualité de la farine de blé (Gupta et *al.*, 1990). Selon leur mobilité dans un gel SDS-PAGE, ces gluténines sont regroupés en 2 classes de sous unités : une plus mobile regroupent les gluténines à faible poids moléculaire (FPM) et l'autre moins mobile et représentent par les gluténines à haut poids moléculaire (HPM).

#### **a) Les sous unité des gluténines à faible poids moléculaire (SG-FPM)**

Ce sont des sous unité solubles en milieux acide ou dans 70% en présence d'agent réducteur (Payne et *al.*, 1987), ces protéines sont riche en acide aminée sourds, ayant la capacité de se polymériser, les (SG-FPM) constituant un important groupe de polypeptides représentant 60-70% des gluténines impliqué dans les propriétés rhéologique du gluten (Sei Meier et *al.*, 1991 in Benmoussa, 1999), dont les poids moléculaire sont compris entre 30 KDa et 75 KDa (Macritchie et *al.*, 1990).

Les sous unités des gluténines à faible poids moléculaire ont été classés en 3 groupes (Jackson et *al.*, 1983) :

- **Groupe B** : Groupe majeur, qui correspondant à les sous unité basique ayant une faible mobilité en SDS-PAGE que les  $\omega$ -gliadines.

- **Groupe C** : Il est mal défini car il correspond à la même mobilité que les  $\alpha$ - $\beta$ - $\gamma$ -gliadines en SDS-PAGE. Leur poids moléculaire varie entre 31 à 36 KDa.

- **Groupe D** : Ces constituants représentent une forte mobilité en SDS-PAGE. Ce groupe représente les protéines les plus acides de l'endosperme.

### **b) Les sous-unités des gluténines à haut poids moléculaire (SG-HPM)**

Plusieurs études ont été rapportées sur la variation des gluténines à HPM et leur contribution à la qualité de la farine (Gupta *et al.*, 1990, Macritchie *et al.*, 1990, Kloster *et al.*, 1991). Précisément, un effet significatif de la variation de leurs allèles sur l'élasticité de la pâte qui a été rapporté par Payne *et al.*, (1984) c'est un groupe qui représente 30 à 40 % des gluténines.

En se basant sur la position des sous-unités HPM dans un gel SDS-PAGE (Payne *et al.*, 1981) ont suggéré leur subdivision en deux sous-groupes : l'un dont les sous-unités de type Y qui migrent plus rapidement sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide SDS avec un poids moléculaire variant de 67 à 74 KDa et l'autre dont les sous-unités de type X migrent plus lentement avec un poids moléculaire de 83 à 120 KDa (Shewry *et al.*, 1984).

### **2.3. Les protéines de réserve et la qualité technologique de blé**

L'amélioration de la qualité du blé est un objectif d'une grande ampleur et en constante évolution. En effet, les critères biochimiques et technologiques, impliqués dans la fabrication des produits, sont nombreux et la composition du grain résulte de l'expression de multiples gènes plus ou moins en interaction avec les facteurs agronomiques et climatiques du milieu de culture du blé. Le rôle des principaux constituants biochimiques du grain de blé au cours des processus technologiques est bien connu. Les constituants les plus explicatifs des différences variétales se situent au niveau des protéines de réserve. Ces protéines constitutives du gluten jouent un rôle dans l'expression de la qualité. D'une variété à l'autre, peuvent exister de très grandes différences d'aptitudes. Le milieu de culture et la fertilisation ont une importance dans l'expression des différences et des fluctuations du comportement technologique que peut présenter une variété. La connaissance des caractéristiques protéiques et technologiques des blés représente un grand intérêt pour l'orientation et l'utilisation de la production à laquelle il est destiné: panification, biscuiterie, couscous (Khelifi *et al.*, 2004).

Les propriétés de la pâte, généralement différentes d'une variété à l'autre, résultent des caractéristiques des nombreuses protéines constitutives du gluten alors il y a une relation entre la présence (ou l'absence) de ces protéines de réserve de l'albumen et les caractéristiques technologiques des blés (Branlard, 1999).

Les propriétés viscoélastiques des pâtes alimentaires sont en grande partie déterminées par les propriétés fonctionnelles des protéines de réserve du blé qui, à l'état hydraté, s'associent pour former une masse viscoélastique : le gluten. L'élasticité et la ténacité du gluten sont associées à la gluténine alors que la viscosité et l'extensibilité sont associées à la teneur en gliadine (Wall., 1979 in Simoes Larraz Ferreira, 2011).

En 1990, McRitchie et *al.*, confirment ces résultats à l'aide d'une expérience qui montre que la fraction des gliadines isolée donne une masse visqueuse, tandis que la fraction des gluténines donnait elle une masse élastique. Une extraction progressive des protéines de réserves permet l'obtention des fractions successives, les premières contenant essentiellement des gliadines provoque une diminution de la force alors que les dernières essentiellement des gluténines l'augmentent.

### **3. Techniques d'analyse des protéines de réserve**

Dans leur forme native, les protéines se replient dans une variété en deux formes, certaines compactes et d'autres allongées. Le taux de migration des protéines natives à travers un milieu de tamisage est donc, plus un reflet de leur relative compacité et moins une mesure précise du poids moléculaire. La dénaturation des protéines annule les effets structurels sur la mobilité, permettant la séparation sur une base de rapport charge / masse vrai. Il sépare également les sous-unités des protéines multimères, permettant l'analyse de grands agrégats complexes.

Il existe plusieurs techniques de fractionnement, qui reposent sur les variations de solubilité des protéines en fonction de la force ionique, et de la constante diélectrique du solvant ou du pH. Le relargage (*salting out*) des protéines à force ionique élevée varie suivant les protéines. Et parmi ces techniques les plus couramment utilisées sont :

SDS-PAGE (monodimensionnelle), Acid-PAGE (monodimensionnelle), et IEF/SDS-PAGE, NEPHGE/SDS-PAGE (bidimensionnelle) (Khelifi et Hamdi, 2007).

### 3.1. SDS-PAGE (monodimensionnelle)

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), une simple et peu coûteuse méthode, consiste à séparer des protéines ayant une masse moléculaire relative moins d'un 10 KD (très petites protéines) selon leurs poids moléculaires, par migration de celles-ci sous l'effet d'un champ électrique dans un gel de polyacrylamide (Laemmli, 1970) en conditions dénaturantes en présence d'un tampon de Tris-Glycine contenant du SDS (tampon de migration ou tampon de Laemmli).

C'est une technique largement utilisée pour analyser les protéines dans des extraits complexes. Les méthodes les plus couramment utilisés sont dérivés à partir du système de SDS- PAGE discontinu décrit par Laemmli (1970). Le système se compose en réalité de deux gels un gel de résolution dans lequel les protéines sont résolues sur la base de leur poids moléculaire (MWS) et un gel d'empilement dans lequel les protéines sont concentrées avant d'entrer dans le gel de résolution. Les différences dans les compositions de gel de concentration, gel de séparation et le tampon d'électrophorèse de produire un système qui est capable de résoudre finement les protéines en fonction de leurs poids moléculaire.

L'électrophorèse SDS-PAGE, repose comme toute technique électrophorétique, sur la séparation des molécules chargées dans un champ électrique. Une cuve à électrophorèse est reliée à deux bornes (une cathode (-) et une anode (+)) alimentées par un générateur électrique ; les molécules que l'on intercale dans ce champ migreront, selon leur charge, vers le pôle complémentaire.

La particularité de la SDS-PAGE est de soumettre les échantillons protéiques à un prétraitement dénaturant. Les protéines sont soumises à l'action de deux composés :

- Le  $\beta$  mercaptoéthanol : composé qui exerce une action dénaturante sur les protéines oligomériques en rompant les ponts disulfures ce qui désorganise leur structure tridimensionnelle. Les sous unités des protéines sont donc dissociées.
- Le SDS (Sodium Dodécyl Sulfate) : c'est un composé capable de venir se fixer sur la périphérie des chaînes de protéines tout en leur conférant une charge négative.

Ainsi les protéines recouvertes par le SDS auront donc toute une charge négative. Influencées ainsi par le SDS, elles migreront donc toutes vers l'anode (+) : la Charge réelle des protéines n'est donc plus mise en jeu et donc seule leur masse moléculaire influencera leur migration (Anonyme, 2014).

#### \* Intérêt de la manipulation

- 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 une masse moléculaire donnée.
- SDS-PAGE offre un moyen rapide et relativement précis pour déterminer les poids moléculaires de protéines
- Déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et déterminer leur masse molaire respective et évaluer le degré de purification d'une protéine.

### 3.2. Acid-PAGE (monodimensionnelle)

Acide-PAGE, est l'une des techniques d'électrophorèse les plus récentes pour être appliqués à l'étude des protéines de réserves de céréales (Bean et *al.*, 1998).

Elle a été utilisée pour isoler et purifier des fractions de gliadine. Cette méthode se fonde sur la méthode d'analyse de (Bushuk et Zillman., 1978 in Waga et Zientarski, 2007).

La séparation des protéines en acides page est basée sur la charge électrique et la taille moléculaire de protéines. Les protéines avec plus de frais de positif déplacé plus loin que celles de moins positives charges. Les protéines qui ont le même degré de positif sont séparées sur la base de leur taille moléculaire, la migration des molécules de plus petit poids moléculaire est plus rapide que les molécules les plus grosses (Saini, 2007).

A-PAGE permet la séparation des gliadines en quatre groupes en fonction de leur rapport mobilité (RM) :  $\omega$ -gliadines qui migrant jusqu'à (RM = 39),  $\gamma$ -gliadines (RM = 40-56),  $\beta$ -gliadines (RM = 57-68) et  $\alpha$ - gliadines (RM = 69-80) (Mammdouh Alnaddaf et *al.*, 2011).

### **3.3. IEF/SDS-PAGE, NEPHGE/SDS-PAGE (bidimensionnelle)**

L'électrophorèse 2D consiste à séparer les protéines selon 2 caractéristiques biochimiques indépendantes, le point isoélectrique (pI) et le poids moléculaire (O'Farrell, 1975). La 1<sup>ère</sup> dimension de séparation, appelée Iso Electro Focalisation (IEF), est une méthode non dénaturante, basée sur la migration des protéines selon leur pI, le long d'un gradient de pH, dans un champ électrique (Bjellqvist et *al.*, 1982). La 2<sup>ème</sup> dimension de séparation est la SDS-PAGE.

# Chapitre II

## Matériel et méthodes

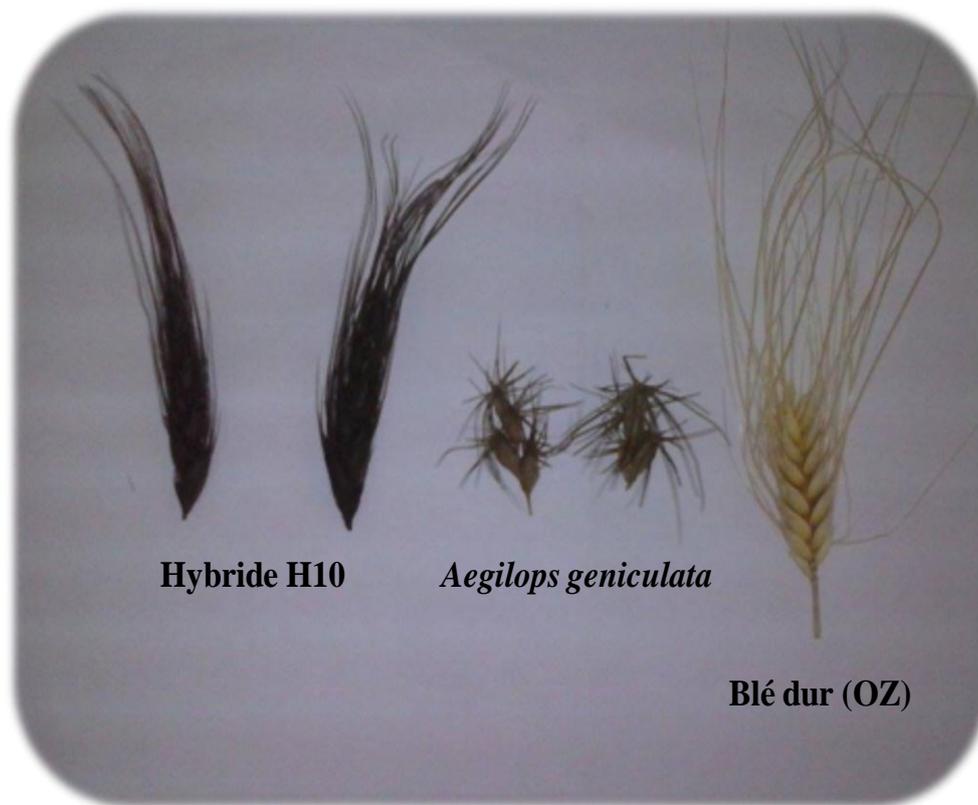
## Matériel et méthodes

### 1. Matériel végétal

Notre étude est effectuée sur 12 lignées recombinantes ‘‘*RIL Recombinant-Inbred Line*’’ issues d’une série d’autofécondation des descendants de croisement interspécifique, blé dur (*Triticum durum* Desf) ‘‘variété Oued Zenati 368’’ × *Aegilops geniculata* Roth. Et une lignée backcross, produites par KELLOU (2003) du laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale (GBBV), équipe de Biotechnologie et Amélioration des Plantes. Ces lignées ont été analysées et comparées par rapport à leurs parents Oued Zenati 368 et *Aegilops geniculata*. Les expérimentations ont été réalisées au laboratoire de GBBV équipe de biotechnologie et amélioration des plantes, université Constantine 1. Quatre variétés standards de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) sont utilisées pour la lecture génétique. Les caractéristiques principales de ce matériel utilisé sont présentées dans le tableau 03.

**Tableau 03 : Présentation du matériel végétal.**

Les Variétés		Caractéristiques
Les parents	Oued Zneti 368 parent femelle Variété locale	C’est une variété tardive dont le tallage est moyen, tolérante à la septoriose, sensible aux rouilles brunes et jaunes et à la fusariose.
	<i>Aegilops geniculata</i> parent mâle De la région de Constantine	Espèce tétraploïde du genre <i>Aegilops</i> au génome UUMM
Les lignées obtenues	H10	Génération F6, obtenue par Mr KELLOU, 2003
	H1013	
	H 1022	
	H1032	
	H1033	
	H 18	
	H1814	
	H1815	
	H1816	
	H1817	
	H1818	
	H1822	
Les variétés standards	Back Cross	Utilisées comme références et fournies par ITGC, Khroub et ICARDA, Syrie.
	Ziad	
	Courtot	
	Flaurence Aurore	
	Chinese Spring	



**Figure 04 : Matériel végétal.**

## **2. Méthodes**

### **2.1. Méthodes d'extraction des protéines de réserve**

La technique de Singh et *al.*, (1991) est une technique de séparation séquentielle des protéines, en fonction de leur solubilité dans 3 solutions de bases (**Annexe 1**).

Le matériel de départ est la farine blanche ou complète d'un demi-grain, broyé dans un mortier. Après l'introduction de 1 ml de solution A (**Annexe 1**) on mélange au vortex quelque second et incubé 30 minute à 65 C° avec deux agitations intermédiaires toutes les 10 minutes puis une centrifugation finale à 10.000 g pendant 1min. La fraction gliadine présente dans le surnageant est éliminée par aspiration, est récupéré dans un autre Eppendorf, et vaporisés minimum 1 nuit. On introduit pour la deuxième fois 1 ml de la solution A au culot, on mélange au vortex et on porte à l'étuve à 65 C° pendant 30 minutes, cette fois sans vortex intermédiaire, puis centrifugé à 10.000 g pendant 1 minute, le surnageant est éliminé par aspiration. On réintroduit au résidu pour la troisième et

dernière fois 0,5 ml de la solution A, on porte au vortex, on centrifuge à 10.000 g pendant 5 minutes sans étuver, ces trois étapes d'extraction à la solution A ont pour but d'extraire et d'éliminer la quasi-totalité des gliadines pour ne laisser dans la farine que les gluténines.

A cette étape, le culot ne contient que des gluténines, pour leur extraction on utilise deux solutions, chacune à base de la solution B (**Annexe 1**). La solution B1 contient le DTT (Dithiotreitol), qui permet la réduction des gluténines. L'avant dernière étape consiste à ajouter 0.1 ml de solution B2, elle contient le 4-vinylpyridine, son rôle est l'alkylation des protéines.

Enfin, on récupère 100µl du surnageant dans un autre Eppendorf dont le quel on ajoute 0.1 ml de solution C contenant du SDS qui chargera les protéines négativement et permettra ainsi leur séparation selon leurs poids moléculaires, le mélange est ensuite agité, incubé 15 min à 65 C° puis centrifugé 2 min à 10.000 g. À ce stade les gluténines sont réduites, alkylées et mélangées au SDS, reste à révéler leurs composants par SDS-PAGE.

Après l'évaporation minimum 1 nuit à 65 C° du surnageant contenant les gliadines, le culot est repris avec 0.2 ml de la solution C, on mélange au vortex et on porte à l'étuve à 65°C pendant 15 minutes, puis centrifugé à 10.000 g pendant 5 minutes, et on révèle sur SDS-PAGE.

## **2.2. Technique d'électrophorèse**

L'électrophorèse est une technique biochimique dont le principe est de fractionner des molécules protéique selon leur mobilité différentielle en les soumettant à un courant électrique dans un support poreux. L'électrophorèse SDS-PAGE, repose comme toute technique électrophorétique, sur la séparation de molécules chargées dans un champ électrique.

## **2.3. La séparation des protéines par SDS-PAGE**

La séparation des protéines est réalisée par une électrophorèse monodimensionnelle sur gel de vertical, discontinue, en présence d'un détergent anionique SDS suivant la méthode Laemmli (1970).

### 2.3.1. Préparation des gels

La séparation par la technique SDS-PAGE nécessite la préparation de deux types de gels : un gel de séparation (running gel) à T=12.8% et un gel de concentration (Stacking gel) à T=12.8 %. Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 35%, de bis-acrylamide à 2 %, du SDS à 10% et de Tris-HCl 1,5M, à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence de catalyseurs, le Temed et de l'APS 10 % (**Annexe 2**).

Le gel de séparation permet le fractionnement des protéines selon leurs poids moléculaires, alors que le gel de concentration permet de stocker des impuretés et de tasser les protéines, avant leur entrée dans le gel de séparation.

On prépare le gel de séparation en premier puis on le coule entre deux plaques de verre verticales (bien nettoyés avec éthanol, en présence des séparateurs), en laissant un vide d'environ 3 cm pour le gel de concentration, à fin de niveler la surface du gel de séparation et de le protéger de l'air, on ajoute une fine couche de butanol pour régler la surface. La polymérisation s'effectue à une température ambiante pendant environ 15 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé au dessus du gel de concentration après avoir éliminer la couche de butanol, puis des peignes à 18 puits sont délicatement insérés. Le gel de concentration prend en l'espace de 15 à 20 min, les peignes sont retirées soigneusement pour ne pas détruire les puits formés, sans oublié le marquer de taille, on verse le tampon d'électrophorèse (**Annexe 3**) dans les puits puis on procède au dépôt des échantillons (après la décongélation, centrifuger à 10 000 g pendant 5 minutes) à raison de 30 µl.

### 2.3.2. Migration

Le bac supérieur qui porte les deux plaques est rempli de tampon à un niveau dépassant les gels et on le place dans la cuve d'électrophorèse ou bac inférieur, remplis au paravent de la solution tampon de façon à ce que les faces inférieurs des gels soient immergées. On ferme la cuve et on branche le générateur qui lui est relié, fournissant le courant électrique. La migration démarre, et les protéines chargées négativement migrent vers l'anode.

### **2.3.3. Coloration et décoloration des gels**

Avant la sortie du front de migration et après 8 heures et 30 minutes pour les gluténines et 7 heures et 15 minutes pour les gliadines, on arrête la migration, les gels sont démoulés soigneusement et placés dans des bacs en plastique et recouverts de solution de coloration (**Annexe 3**). On les place sur l'agitateur. Les gels sont ensuite décolorés par l'eau distillée puis mis dans une solution de décoloration (**Annexe 3**) pendant quelques jours d'agitation et sont prêts à la photographie.

### **2.3. Lecture des diagrammes électrophorétiques**

Après avoir photographié les gels par un système de détection d'image de gels E-Box, le traitement des diagrammes électrophorétiques a été fait à l'aide du logiciel E-Capt qui sert à déterminer les poids moléculaires des bandes obtenues et leurs rapports frontaux.

# Chapitre III

## Résultats et discussion

L'étude biochimique des lignées recombinantes F6 issues du croisement interspécifique blé dur (var. Oued Zenati 368) et *Aegilops geniculata*, par une électrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS (SDS-PAGE), révèle des bandes claires et bien distinctes après l'étape de l'extraction, nous a permis de séparer l'ensemble des sous unités gluténines et d'obtenir des profils électrophorétiques. Deux groupes de bandes avec des mobilités différentes sont dénombrés : les bandes lentes correspondent aux sous unités gluténines SG-HPM (zone A) tandis que les bandes rapides correspondent aux sous unités gluténines SG-FPM (zone B) (Figures 05 & 06).

L'obtention de bandes bien distinctes est le résultat de l'étape de réduction suivie de l'alkylation en utilisant le 4-vinylpyrimidine, ce dernier va empêcher les chaînes peptidique de se reliées et donc à la protéine native de se reformée.

Pour la lecture des diagrammes, nous sommes intéressés seulement aux sous unités gluténines de HPM (zone A). Qui sont d'une importance majeure dans la détermination des caractères technologiques de la qualité des blés. Cette zone a fait l'objet de nombreuses études, portant sur des collections mondiales de blé cultivés, apparentés et sauvages, entre autre : les travaux de Branlard et *al.*, (1989) et Bandou et *al.*, (2009).

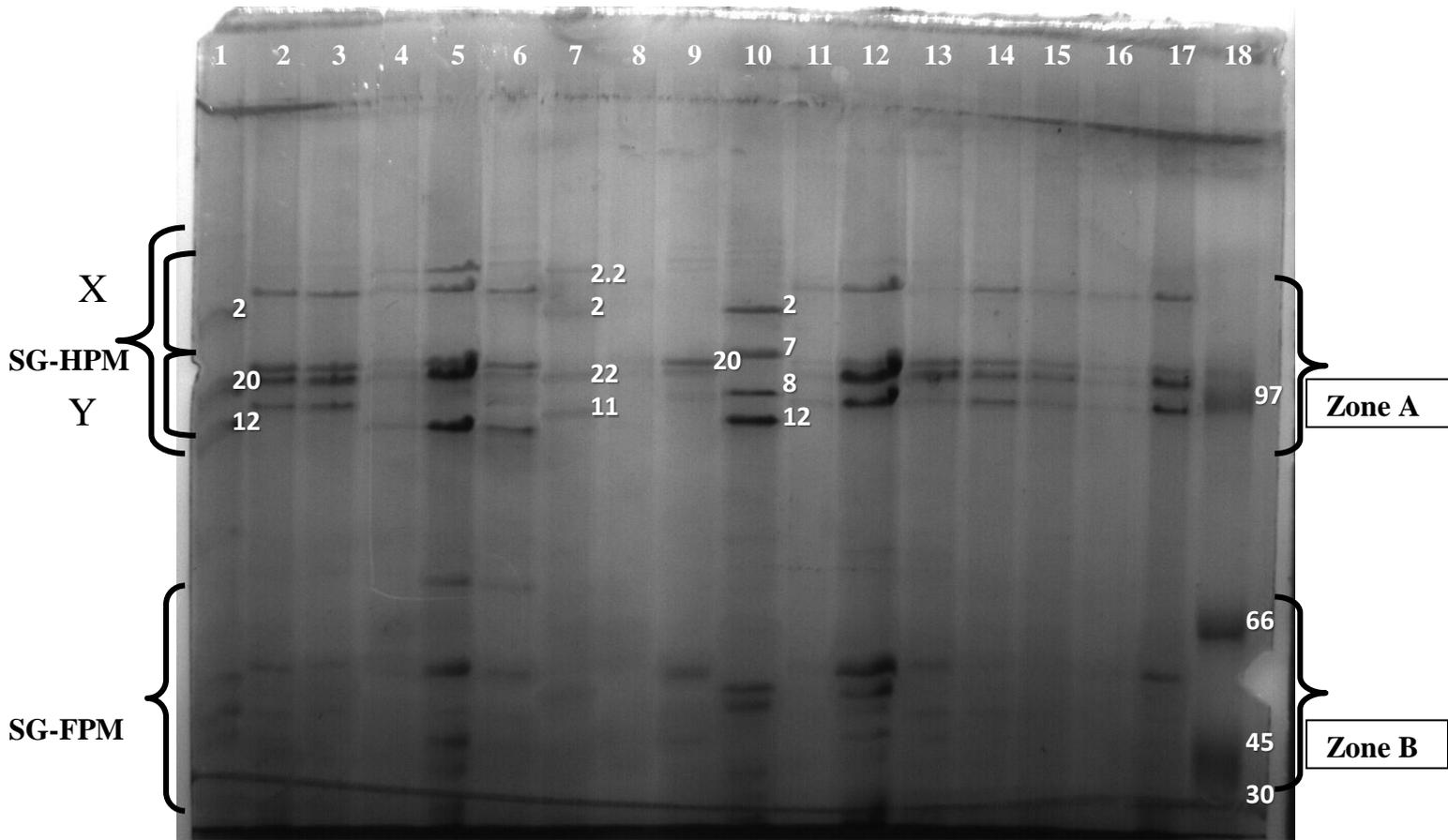
Les descendants utilisés dans cette étude sont des octoploïdes avec  $2n = 56$  chromosomes (génomes AABBMMUU), obtenus après hybridation intergénérique entre *Triticum durum* Desf. ( $2n = 28$ , génomes AABB) et *Aegilops geniculata* Roth. ( $2n = 28$ , génomes MMUU).

Les SG-HPM sont codée par les gènes localisés sur le bras longs des chromosomes homéologues du groupe 1, les locis sont nommés *Glu-A1*, *Glu-B1*. Le locus *Glu-A1*, comporte deux gènes étroitement liés le premier code pour une ou très rarement deux sous unités de type-x, et le deuxième est responsable de la sous unité dite de type-y, différentes par leurs mobilités relatives, les bandes de type-x sont plus lentes que celles de type-y (Rodríguez-Quijano et *al.*, 2001).

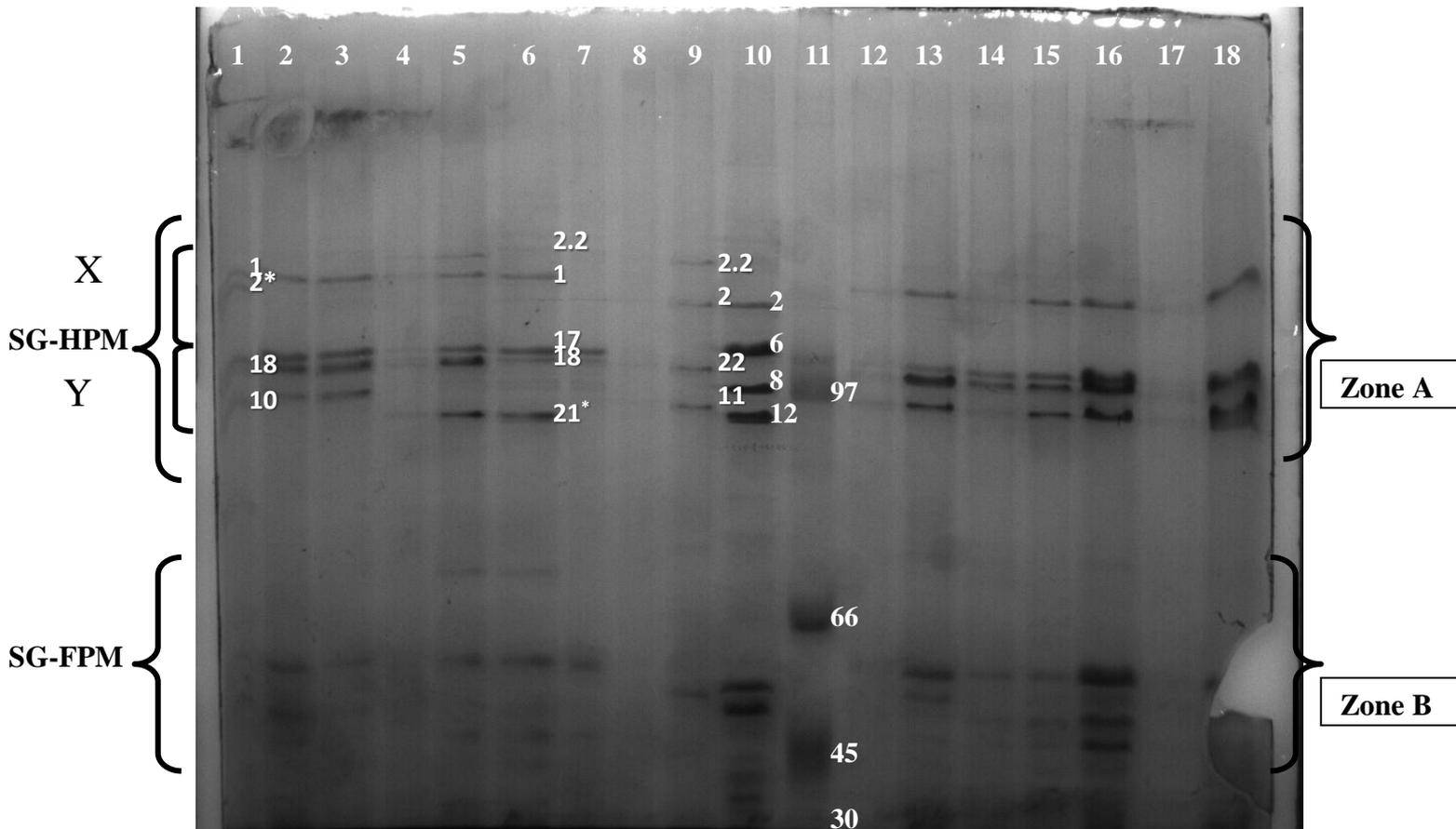
Pour toutes les lignées utilisées, la lecture consiste à faire une analyse descriptive des diagrammes (nombre de bandes, mobilité relative, fréquence allélique,...etc.). Puis identifier les variations existantes entre les descendants et leurs parents. Pour ce faire, les diagrammes obtenus sont comparés avec les diagrammes des variétés standards.

Pour la lecture de nos gels, nous avons utilisé la nomenclature de Payne et Lawrence (1983) complétée par Branlard et *al.*, (1990). (Annexe 05) (Figure 05).

### 1. Diversité génétique des sous unités gluténines HPM



**Figure 05 : Profils électrophorétiques des gluténines chez les 17 génotypes étudiés :**  
 (1) - Florence Aurore "variété standard", (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- *Aegilops geniculata*, (8)- Back Cross "H10/OZ", (9)- Oued Zneti, (10)- Chinese Spring "variété standard", (11)- H1815, (12)- H18, (13)- H1814, (14)- H1816, (15)- H1817, (16)- H1818, (17)- H1822, (18)- Marqueur de taille "Amersham LMW".



**Figure 06 : Profils électrophorétiques des gluténines chez les 17 génotypes étudiés :**  
 (1) – Ziad ‘variété standard’, (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- Oued Zneti, (8)- Back Cross ‘H10/OZ’, (9)- *Aegilops geniculata*, (10)- Courtot ‘variété standard’, (11)- Marqueur de taille ‘Amersham LMW’, (12)- H1815, (13)- H18, (14)- H1814, (15)- H1816, (16)- H1817, (17)- H1818, (18)-H1822.

Les caractéristiques biochimiques (du SDS PAGE) des 13 lignées analysées sont intermédiaires par rapport à celles des deux parents. Elles montrent un profil électrophorétique constant (Figures 05 & 06), formé par deux zones de mobilités électrophorétiques différentes : une zone A dont la mobilité électrophorétique est lente représentée par plusieurs bandes dans les gels, on a trois bandes qui ont une mobilité dépasse de loin la sous unité 2 de Chinese Spring (locus *Glu D1*) et d'*Aegilops geniculata* (locus *Glu M1*). La sous unité 2.2 est exprimé chez les lignées issues de l'hybride H10 hérité probablement du parent sauvage donneur du génome M. Alors que les sous unités 1 et 1.1 sont exprimées chez les descendants de l'hybride H18, sans les avoir chez les deux parents. Ceci peut être expliqué par la supériorité de l'hybride, qui est recherché ici, c'est

que l'un des deux parents qui sont croisés aperçoit souvent les effets défavorables récessifs (généralement du parent sauvage) masqués par les effets favorables dominants. Néanmoins, l'hybridation permet de cumuler des caractères présents dans des lignées différentes et de bénéficier de l'effet d'hétérosis.

Le poids moléculaire dans cette zone varie entre 100 KDa et 115 KDa. Chez tous les descendants, cette zone est présentée par une seule bande à l'exception des lignées H1022, H1032 et H1033 qui sont présentées par deux bandes.

Ainsi, on a un groupe de sous unités de mobilité plus rapide et sont apparues en bas de la bande 7 du locus *Glu B1* du témoin Chinese Spring (Figure 05) comme les couples «17-18», «14-19» et «20-22» et un autre groupe constitué par deux sous unités '11 du locus *Glu M1*' et '21\*' du locus *Glu A1*' très proche de la bande 12 du témoins Chinese Spring du génome D. Ces deux groupes ont un poids moléculaire inférieur de 100 KDa.

Beaucoup d'études indiquent que chez la majorité des espèces diploïdes apparentées au blé, le locus *Glu1*, comporte deux gènes étroitement liés : *Glu 1-1* et *Glu 1-2*, le premier code pour une ou très rarement deux sous unités du type x-, et le deuxième est responsable de l'expression d'une sous unité du type y- (Morrison et al., 2002). Ceci expliquerait la présence de deux bandes pour les SG-HPM du type x- qui est la sous unités «1» codé par l'allèle « a ». Leur absence au niveau des lignées H18, H1814, H1815, H1816 et H1817 est probablement due à la non expression du locus *Glu-1-1*, et une bande du type y- qui est la sous unités « 21\* » codé par l'allèle « w » (Xueli et al., 2005).

Branlard, (1989), rapporte que la sous-unité 1 'chr.1 A, codé par l'allèle a' et le couple 17+18 'chr.1 B, codé par l'allèle i' sont associées à la bonne qualité boulangère des blés. Elles contribuent positivement à l'extensibilité des pâtes. Cas des lignées H10, H1013 et H1033 issus de l'hybride H10.

La zone de mobilité plus rapide est composée de deux sous unités « 11 » située entre la bande 8 et 12 du témoin Chinese spring et « 21\* » très proches située en bas de la bande 12 du témoin, à l'exception des lignées H10, H1013 et les descendants de l'hybride H18 (Figure 05) qui sont présentées par une seule bande. (Johansson et al., 1993), ont montré qu'il y a une corrélation positive entre la présence de la sous-unité 21\* et l'élévation des volumes de sédimentation du test de Zelini.

Les deux sous unités gluténine HPM de type y- des descendants apparaissent comme des doublets très proches. Il a été suggéré par (Holt et *al.*, 1981) que ces doublets sont soit les produits d'un même gène ou bien de deux gènes dupliqués étroitement liés. Cette supposition est basée sur les résultats obtenus par la similarité des deux sous unités en électrophorèse bidimensionnelle, sur la composition en acides aminés, et sur les résultats des profiles de digestion par les protéases (Galili et Feldman, 1985).

Levy et *al.*, (1988) ont trouvé les mêmes bandes chez des blés tétraploïdes et indiquent qu'elles sont contrôlées par un seule gène, puisqu'elles sont toutes deux présentes ou toutes deux absentes. Tandis que, si elles étaient contrôlées par deux gènes, cela se traduirait par une variation allélique. Ces mêmes auteurs expliquent que plusieurs mécanismes moléculaires peuvent produire deux polypeptides d'un même gène mais Fernandez et Orellana, (1990) ont exclus cette supposition.

A partir de nos résultats on peut déduire que ces deux bandes sont contrôlées par un seul gène ou deux gènes étroitement liée puisque les électrophorègrammes présentent une stabilité allélique (présence et/ou absence des deux bandes parallèles) pour toutes les lignées.

La présence de 3 et 4 bandes de SG-HPM peut aussi être expliquée par l'existence d'individus hétérozygotes pour les loci qui les expriment. Par conséquent, (Fernandez-Calvin et Orellana, 1990) ont soumis les plantes présentant plus de deux bandes à une autopollinisation, leur progénitures sont analysées par SDS-PAGE, dans tout les cas les profiles sont similaires aux parentaux, sauf pour les individus ayants deux sous unités de type x- ou une ségrégation a été observée, ce ci confirme l'explication que nous avons donné pour nos génotypes.

### **1.1. Diagrammes types obtenus**

L'analyse des diagrammes électrophorétiques nous a permis de recenser un ensemble de 12 bandes de haut poids moléculaire de différentes mobilités relatives, y compris la bande nul. Chaque diagramme renferme selon les génotypes de 1 à 4 bandes, plus de deux codées par le locus *Glu-A1* ; *Glu-B1*, une ou deux codée par le locus *Glu-M1* et 0 bande par les locus *Glu-D1* et *Glu-U1* au tableau 4 et 5, sont portés les différents types de diagrammes.

**Tableau 04 : Types de diagrammes des sous unités de haut poids moléculaire observés chez les lignées *RILs* étudiées.**

Types	Diagramme	Glu-A1	Glu-B1	Glu-M1	Lignées
I	1+17+18+11	a	I	e	H10, H1013
II	2.2+1+14-19+21*	a, w	L	f	H1022, H1032
III	2.2+1+17+18+21*	a, w	I	f	H1033
IV	1.1+20+22+11	/	e, k	e	H18, H1814, H1816, H1817, H1815
V	1+20+22+11	a	e, k	e	H1818, H1822

**Tableau 05 : Types de diagrammes des sous unités de haut poids moléculaire observés chez les parents blé dur/ *Aegilops geniculata*.**

Les parents	Diagrammes	Glu-A1	Glu-B1	Glu-D1	Glu-M1	Glu-U1
<b>Oued Zneti 368</b>	Nulle+20	c	e	/	/	/
<i>Aegilops geniculata</i>	2.2+2+22+11	/	/	/	f, a, e	k

L'analyse de ces tableaux révèle l'existence de 5 types de diagrammes pour notre collection (blé, *Ae. geniculata* et lignées recombinantes). La variation des groupes des bandes reflète le grand polymorphisme des protéines de réserve de cette collection. Nous pouvons dire que la diversité des SG-HPM est importante et que les sélectionneurs peuvent introduire quelques sous unités pouvant améliorer ainsi la qualité technologique de blés.

Le diagramme le plus fréquent est (1.1, 20, 22, 11) qui se trouve dans le type IV, un ensemble de cinq lignées partage chaque diagramme de ces derniers. (Tableau 04).

Vient après les diagrammes de type I, II et V concernant les diagrammes (1, 17+18, 11), (2.2, 1, 14+19, 21\*) et (1, 20, 22, 11) caractérisant chacun deux lignées qui sont respectivement H10, H1013, H1022, H1032, H1818 et H1822. Et en finis par le diagramme (2.2, 1, 17+18, 2\*) qui est correspondant à une seule lignée H1033.

Dans le deuxième tableau (Tableau 05), le parent Oued zeneti 368 est caractérisé par la présence d'une seule bande (e) avec le nulle (c), et pour le parent *Aegilops geniculata* ayant le diagramme (2.2, 2, 22, 11) du locus *GluM1* et *GluU1*.

Les résultats que nous avons trouvés se concordent à ceux trouvés par plusieurs auteurs. Les blés durs ne possèdent pas les mêmes allèles que les autres blés (Branlard et al., en 1989) ont analysé par SDS-PAGE une collection de 14 variétés de blé, ils ont trouvé uniquement 5 Diagrammes types, 12 bandes de différentes mobilités et un total de 11 allèles sont identifiés. Et 0.08 de la collection analysée l'allèle nul « *Glu-A1c* » qui est presque absent de la collection étudiée sauf chez le parent Oued Zeneti 368.

## 1.2. Calcul des fréquences alléliques

Les calculs des fréquences des différentes formes alléliques portées par les loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-M1* et *Glu-U1* ont donné des résultats résumés dans le (Tableau 06).

**Tableau 06 : Fréquences alléliques des différents loci répertoriés chez les individus étudiés.**

Loci	Allèle	Fréquence
<i>Glu-A1</i>	a (1)	0,33
	w (21*)	0,16
	c nulle	0,08
	x (1.1)	0,08
<i>Glu-B1</i>	i (17+18)	0,16
	l (14+19)	0,08
	e (20)	0,25
	k (22)	0,16
<i>Glu-M1</i>	e (11)	0,33
	f (2.2)	0,25
	a (2)	0,08
<i>Glu-U1</i>	K (22)	0,08

- La fréquence allélique est calculée par la formule suivante :

$$\text{Fréquence} = \frac{\text{Nombre de bandes par locus}}{\text{Nombre totale des bandes}}$$

Pour le locus *Glu-A1*, la distribution des quatre allèles dans la collection des 13 lignées a été de 0,33 pour l'allèle « a » exprimant la bande « 1 », de 0,16 pour la deuxième forme allélique répertoriée sur ce locus qui est la « w » codant pour la bande « 21\* » et de

0,08 pour les deux dernières allèles « c » et « x » expriment les bandes nul et « 1.1 » respectivement.

Pour le locus *Glu-B1*, quatre formes alléliques, la plus fréquente a été 0,25 pour l'allèle « e » suivi par deux formes sont répondues de la même proportion était de 0,16 pour les allèles « i » et « k » en dernier lieu l'allèle « 1 » qui partagent la plus faible fréquence de 0,08.

Pour le locus *Glu-M1*, trois formes alléliques, 0,33 pour l'allèle « e » exprimant la bande « 11 », 0,25 pour l'allèle « f » codant la bande « 2.2 » et 0,08 pour l'allèle « a » exprimant la bande « 2 ».

Pour le locus *Glu-U1*, une seule forme allélique, 0,08 pour l'allèle « k » exprimant la bande « 22 ».

Nous constatons que, presque toutes les lignées ont en commun, la première et la deuxième bande « e » et « f » du parent *Aegilops geniculata* du locus *Glu-M1*, ces bandes sont présentes avec les fréquences 0,33 et 0,25 respectivement, alors que les lignées de l'hybride H18 ont hérités une seule bande « e » du locus *Glu-B1* du parent Oued Zenati 368, avec une fréquence de 0,25.

En plus de la seule bande héritée du parent Oued Zenati, la majorité des hybrides présentent des SG-HPM dont la mobilité est supérieure aux premières. Les mobilités des ces bandes avoisinent celle d'*Aegilops geniculata*. Ce fait, laisse supposer qu'elles sont héritées du parent mâle (*Ae. geniculata*). Pour l'hybride H1013 la première bande présente une mobilité de 115,8 KDa, celle de l'hybride H1033 est de 115,6 KDa.

Nos résultats concordent avec les résultats des autres auteurs comme pour l'équipe de Cherdouh *et al.*, (2005) qui ont travaillé sur une collection de 5 variétés de blé dur Algérien, des espèces de *Triticum turgidum* L. et également des espèces du blé sauvage, dont ils ont détecté 12 modèles de gluténine pour les HPM.

### **1.3. Etude comparative des diagrammes électrophorétiques des sous unités gluténines de haut poids moléculaire (SG-HPM)**

Selon Rodriguez-Quijano *et al.*, 2001, le poids moléculaires des bandes SG-HPM se situ entre 84 et 137 KDa. Cependant, la zone A renferme deux sous groupes de bandes de différentes mobilité, celles qui ont un poids moléculaire situé entre 120 et 137 KDa font

partie aux bandes de types X, alors qu'il existe un autre type Y où le poids moléculaire varie entre 84 et 101 KDa.

Nous avons observé une grande variabilité pour les SG-HPM, aussi bien pour le nombre de bandes que pour la mobilité. La mobilité des sous unités HPM est comprise entre 93,6 et 115,6 KDa. Ainsi le nombre des SG-HPM varie de 1 à 4 pour les parents (tableau 1), les hybrides présentent de 1 à 5 sous unités HPM (Tableau 07).

**Tableau 07 : Poids moléculaires des différentes bandes SG-HPM détectées chez les parents.**

/		Poids moléculaire KDa	
Espèces	Nombre de bandes	Mobilité de type X	Mobilité de type Y
Oued Zenati	1	/	102,6
<i>Aegilops geneculata</i>	4	114,6	109,5
			100,2
			95,5

**Tableau : 8 : Poids moléculaires des différentes bandes SG-HPM détectées chez les descendants**

Espèces	Nombre de bandes	Poids moléculaire KDa	
		Mobilité de type X	Mobilité de type Y
H10	4	112,432	101,467
			100,249
			96,018
H1013	4	112	102,4
			101
			96,5
H1022	5	115,6	102,5
		112,9	101
H1032	5	115,6	103,1
		112,9	101,1
H1033	5	115,6	102,7
		112,7	101,5
H18	4	112,7	93,6
			100,9
			98,1
H1814	4	112,7	94,8
			103,1
			102,1
H1815	4	111,7	94,5
			103,7
			101,8
H1816	4	112,7	95,5
			102,8
			101,2
H1817	4	112,4	93,8
			98,8
			97,5
H1818	4	111,5	93,5
			99,8
			97,2
H1822	4	111,2	93,2
			102,3
			99,5
			93,8

Pour le poids moléculaire des SG-HPM qui sont d'une importance majeure dans la détermination des caractères technologiques de la qualité des blés (Branlard et *al.*, 1997) et Yan et *al.*, 2003). Les lignées et leurs parents étudiés présentent des poids moléculaires et des bandes à des différentes mobilités. Les diagrammes de ces dernières sont complètement différents l'un de l'autre, pour le parent mâle (*Aegilops geniculata*) quatre

bandes ont été obtenues, trois dans la zone Y et une seule bande au niveau de la zone X, qui est un peu lente par rapport aux types Y mais à un poids moléculaire élevé (114,6 KDa).

En outre chez le parent femelle (Oued Zenati) une seule bande a été détectée pour les SG-HPM de poids moléculaire (102,6 KDa) est située dans la zone Y, et aucune bande observée dans la zone X. (Tableau 07).

Pour la majorité des lignées des hybrides quatre bandes ont été obtenues, à l'exception des H1032 et H1033 qui ont montré 5 bandes (Tableau 08).

Hamdi et *al.*, (2007) ont inventé deux bandes au maximum de mobilités différentes dans la zone A, de type X qui sont un peu lentes par rapport aux types Y.

Les diagrammes des hybrides octoploïdes présentent pour la plupart une seule bande au niveau de la zone X, sauf les H1022 ; H1032 et H1033 qui ont montré deux bandes pour chaque lignée, avec des mobilités proches H1022 (115,6 et 112,9 KDa), H1032 (115,6 et 112,9 KDa) et H1033 (115,6 et 112,7 KDa). Tandis que dans la zone Y la totalité est exprimée par trois bandes à des différentes mobilités.

Dans l'ensemble et par comparaison avec les résultats de Fragna, (2009) qui a utilisé les lignées des hybrides interspécifiques de la F5, on a noté qu'à la génération F6, trois lignées ont démontré des profils électrophorétiques différents. Ceci peut être expliqué par l'existence de la recombinaison génétique exprimée chez les descendants F6 d'une façon différente à celle de la génération F5.

D'autre part, on a détecté 55 bandes au total dans les zones des SG-HPM du diagramme électrophorétique des hybrides octoploïdes ; résultent de l'activité des loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-U1* et *Glu-M1* de leurs parents. Certaines bandes sont détectées chez quelques hybrides alors que les autres sont répétées plusieurs fois :

-La bande de 112 KDa existe chez les neuf accessions (H10, H1013, H1022, H1032, H1033, H18, H1814, H1816, H1817).

-La bande de 111 KDa existe chez les trois accessions (H1815, H1818, H1822).

-La bande de 101 KDa existe chez les sept accessions (H10, H1013, H1022, H1032, H1033, H1815, H1816).

-La bande de 93 KDa existe chez les sept accessions ( H1022 , H1032 , H1033 , , H1816, H1817, H1818, H1822)

Les résultats obtenues sont annoncés un polymorphisme électrophorétique, apparaît premièrement au niveau du nombre des bandes et deuxièmement sur la diversité du poids moléculaire des bandes, on a estimé 36 bandes trouvés entre 93,2 et 115,6 KDa. Ce large spectre de polymorphisme peut être exploité pour l'amélioration de la qualité des blés cultivés.

## **2. Diversité génétique des sous unités gluténines FPM**

La typologie des SG-FPM n'a pas été mise en évidence pour l'analyse électrophorétique effectuée pour toutes les lignées étudiées. Le manque de précision de la préparation du gel de concentration est probablement à l'origine d'un retard de la séparation des bandes dans cette région mais nous avons aussi observé que la mobilité des bandes SG-FPM n'est pas claire et lisible. Ceci est lié à une erreur dans le C% du gel de concentration (probablement le C% est très élevé par rapport au C% du gel de séparation).

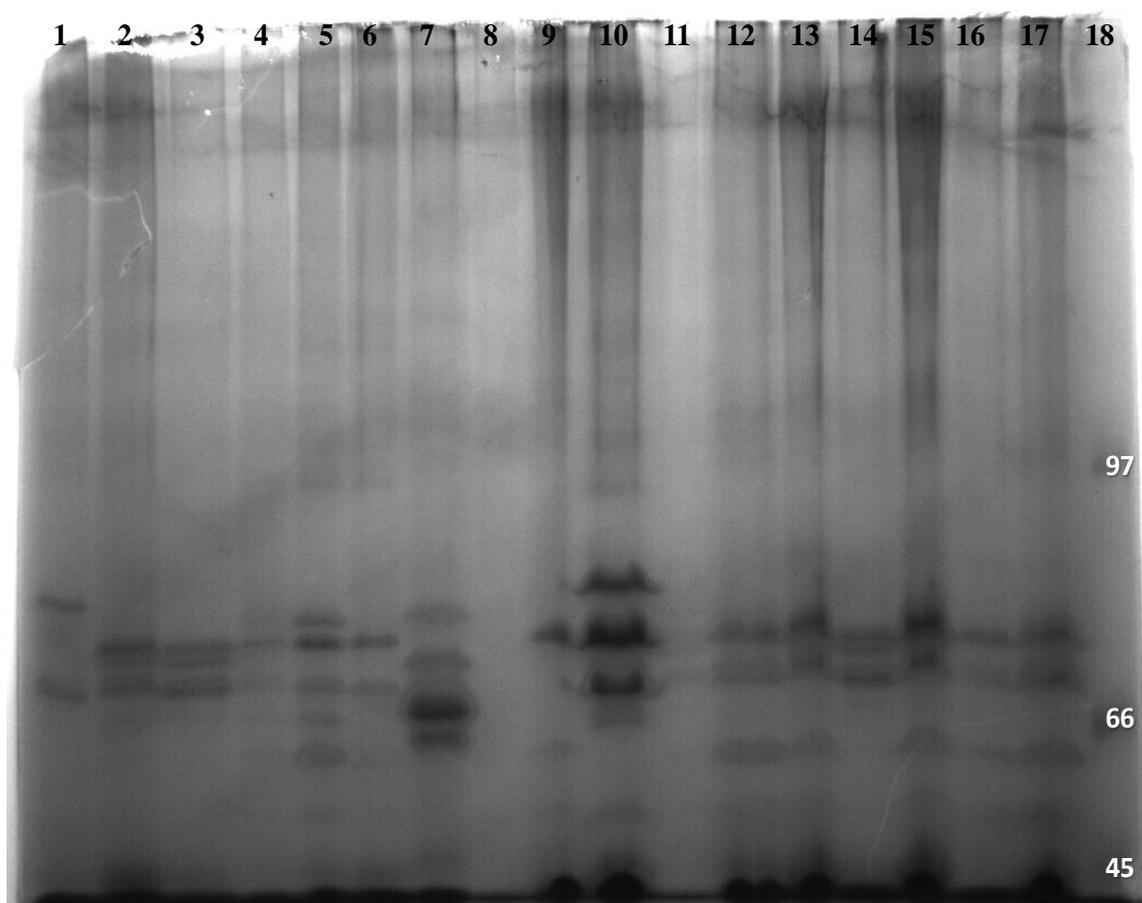
En ne tenant pas compte de ces données erronées, nos résultats indiquent l'existence d'un polymorphisme entre les différentes lignées étudiées. Au tableau 09 sont portés les 38 types de diagrammes des sous-unités gluténines faible poids moléculaire observés chez les lignées étudiées. L'analyse de ce tableau nous montre que la diversité des SG-FPM est un outil nécessaire pour identifier les géotypes. Cependant, la prise en compte de bandes appartenant à ce groupe des sous-unités de faible poids moléculaire nous aurait vraisemblablement permis d'observer davantage de diagrammes différents.

**Tableau 09 : Poids moléculaire des différentes bandes SG-FPM détectées chez les hybrides**

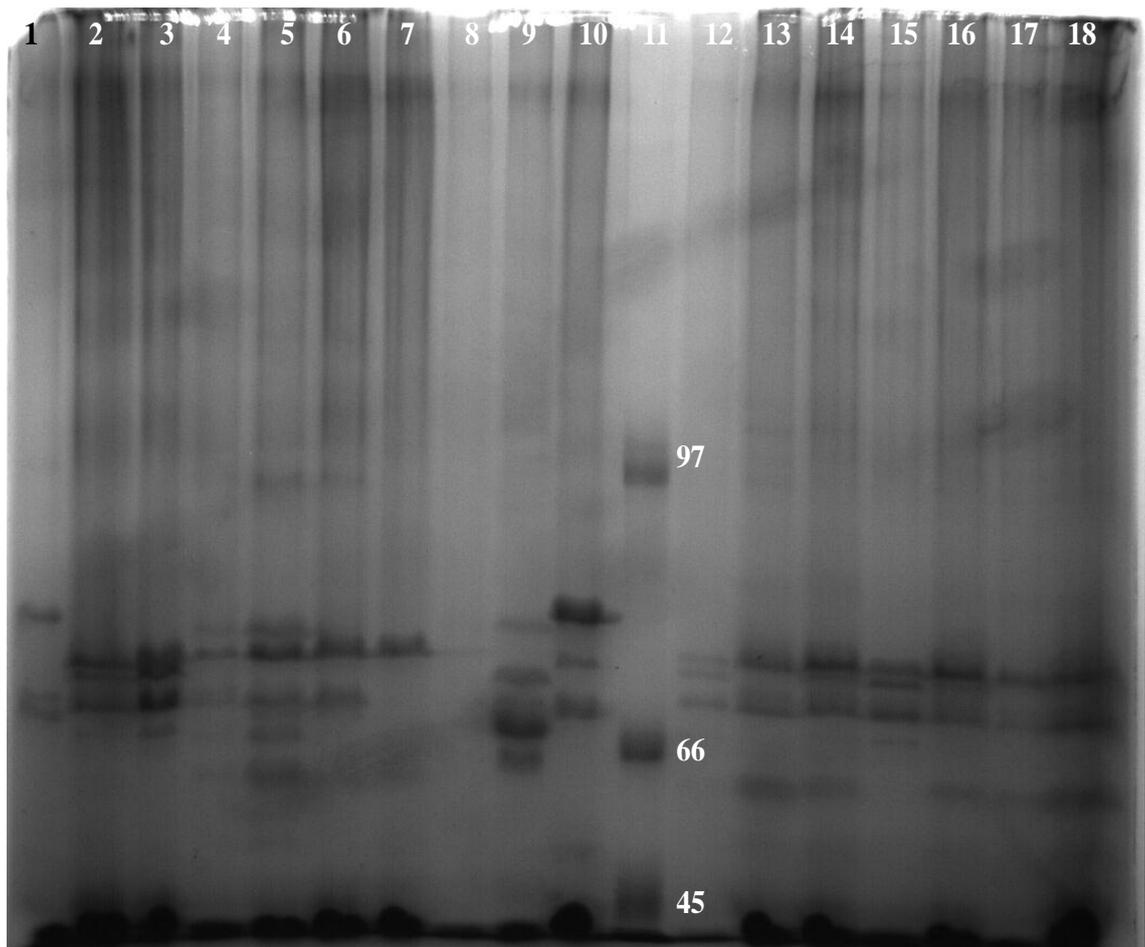
Espèces	Nombre de bandes	Poids moléculaire KDa	
		Mobilité de type X	Mobilité de type Y
H10	4	/	74.2
			72.6
			69.6
			69.2
H1013	4	/	74
			72.8
			69.1
			67.3
H1022	3	/	76.8
			74.2
			69.7
H1032	5	/	77.4
			74.3
			69.2
			67
			63.8
H1033	2	/	75
			69.5
H18	3	/	75.8
			72.9
			63
H1814	3	/	76.9
			73.5
			63.4
H1815	2	/	74.5
			73.4
H1816	3	/	74.1
			70.9
			68.4
H1817	4	/	76.9
			71.7
			68.1
			63.6
H1818	3	/	75.3
			72.3
			63
H1822	3	/	75
			72.3
			64.2

### 3. Diversité génétique des gliadines

Tous les génotypes étudiés ont donné un profil électrophorétique très médiocre, à cause des mauvaises séparations des gliadines dans les gels (Figures 07 et 08), ces signes sont souvent associés à la nature du gel où une différence entre les taux de C% entre le gel de concentration et le gel de séparation engendre un retard dans la séparation des protéines, entre autres, une mauvaise exploitation des potentialités des génotypes étudiés avec une mauvaise maîtrise de la technique en question.



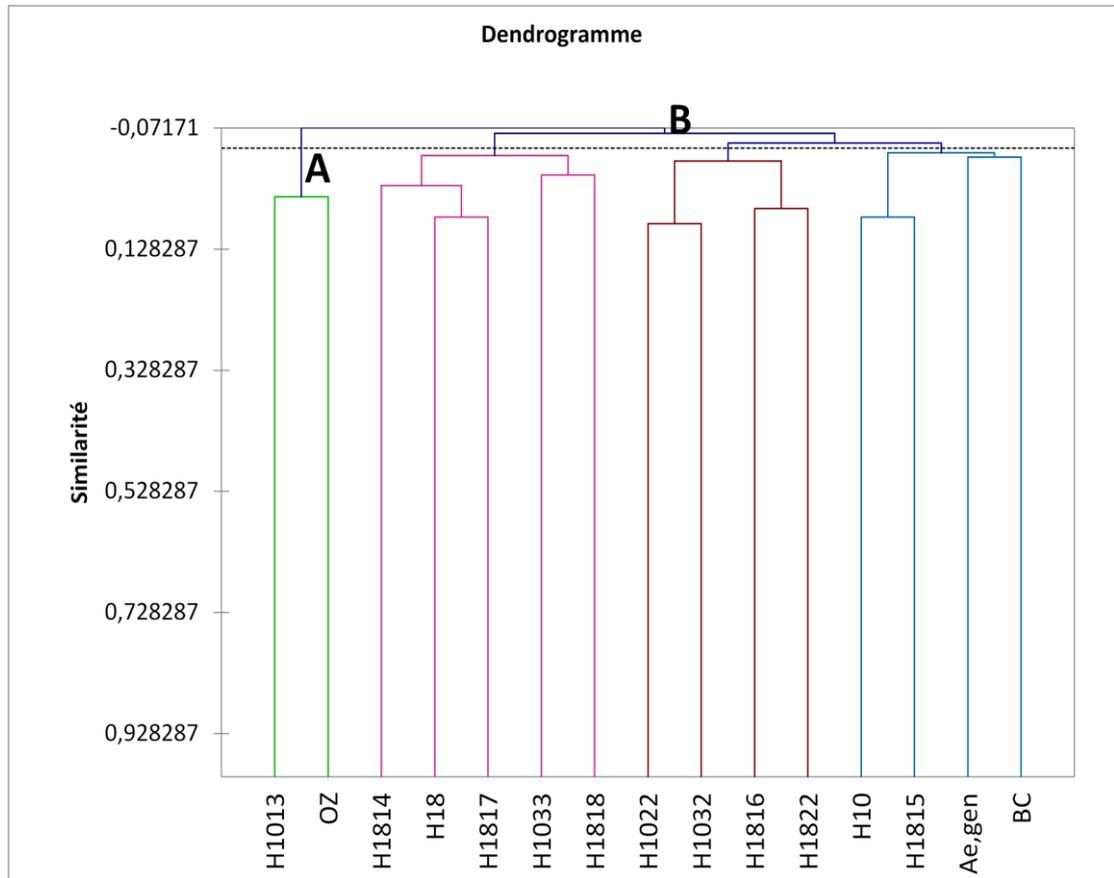
**Figure 07 : Profils électrophorétiques des gliadines chez les 17 génotypes étudiés : (1)- Florence Aurore "variété standard", (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- *Aegilops geniculata*, (8)- Back Cross "OZ/H10", (9)- Oued Zneti, (10)- Chinese Spring "variété standard", (11)- H1815, (12)- H18, (13)- H1814, (14)- H1816, (15)- H1817, (16)- H1818, (17)- H1822, (18)- Marqueur de taille "Amersham LMW".**



**Figure 08 : (Gel 2) Profils électrophorétiques des gliadines chez les 17 géotypes étudiés : (1) – Ziad ‘variété standard’, (2)- H10, (3)- H1013, (4)- H1022, (5)- H1032, (6)- H1033, (7)- Oued Zneti, (8)- Back Cross ‘OZ/H10’, (9)- *Aegilops geniculata*, (10)-Courtot ‘variété standard’, (11)- Marqueur de taille ‘Amersham LMW’, (12)- H1815, (13)- H18, (14)- H1814, (15)- H1816, (16)- H1817, (17)- H1818, (18)-H1822.**

#### 4. Etude de similarité des individus

L'analyse de la similarité des individus étudiés nous a permis de réaliser une matrice générale à base de présence / absence de bandes, (**Annexe 6**), à partir de cette matrice, un dendrogramme a été établi. (Figure 09).



**Figure 09 : Dendrogramme de similarité des lignées et de leurs parents.**

Le dendrogramme obtenu nous a permis de distinguer 2 clusters A et B :

Le cluster A s'est dégagé avec le parent cultivé (variété Oued Zenati 368) et la lignée H1013, ainsi le cluster B regroupe le parent sauvage (*Aegilops eniculata*) avec le reste de leurs descendants, où on note l'apparition de trois groupes ou sous clusters selon leur degré de similarité.

Les hybrides H10, H1815 ainsi que la lignée backcross sont regroupés ensemble sous le même cluster, les lignées H1822, H1816, H1032 et H1022 sont apparus en un seul groupe, alors que les hybrides H1818, H1033, H1817, H18 et H1814 font parti du même sous cluster.

A travers ce dendrogramme on peut dire que les hybrides de la 6<sup>eme</sup> génération tendent vers le parent sauvage *Aegilops geniculata*.

# Conclusion

Nous avons entrepris ce travail afin d'atteindre notre objectif qui est d'analyser la variabilité génétique qui existe chez la descendance F6 issue d'un croisement interspécifique entre le blé dur et *Aegilops geniculata* par l'utilisation des marqueurs biochimiques et donc l'évaluation de la qualité des cultivars du blé par l'analyse des protéines de réserve.

La technique d'électrophorèse en présence de SDS (SDS-PAGE), nous a permis de séparer et d'analyser les sous unités gluténines de haut poids moléculaire, afin de détecter le polymorphisme existant chez les différentes lignées.

En se basant sur la mobilité et le poids moléculaire, le groupe de bandes à mobilité lente correspond aux sous unités gluténines de haut poids moléculaire (zone Ax et Ay), d'autre groupe de bandes plus rapides correspond aux sous unités gluténines de faible poids moléculaires (Zone B).

Les hybrides, blé dur/ *Ae. geniculata* présentent des profils électrophorétiques dont le nombre de bandes et les mobilités des sous unités des haut poids moléculaire (SG-HPM) sont similaires à ceux des deux parents spécialement *Ae. geniculata*.

Les résultats obtenu sont annoncé un polymorphisme électrophorétique, apparaitre premièrement au niveau du nombre des bandes et deuxièmement sur la diversité du poids moléculaire de ces derniers, on a estimé 55 bandes trouvé entre 33 et 115 KDa.

Les hybrides présentent des profils électrophorétiques dans la région des SG-HPM dont le nombre de bandes est de trois à cinq chez tous les hybrides.

L'hybride H10 et les descendants de l'hybride H18 ont bénéficié respectivement de l'expression des sous unités 2.2 du locus *Glu-M1* et 1 et 1.1 du locus *Glu-A1* qui ne sont pas exprimé chez les deux parents.

Les lignées H10, H1013 et H1033 ont des critères de qualité puisqu'elles expriment les allèles a et i qui codent pour la sous unité 1 "locus *GluA1*" et le couple 17+18 "locus *GluB1*" respectivement. Ces allèles sont associés à la bonne qualité boulangère des blés et elles contribuent positivement à l'extensibilité des pâtes.

D'autres lignées de l'hybride H10 (H1022, H1032, et H1033) ont présenté une autre bande de qualité, il s'agit de la sous unité 21\* qui a un effet sur l'élévation des volumes de sédimentation lors du test de Zelini.

Pour l'ensemble des hybrides octoploïdes, les bandes de différentes mobilités répétées dans la zone A (x et y), résultante de l'activité des loci *Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-U1* et *Glu-M1* de leurs parents.

Pour conclure, nous pouvons dire que les marqueurs biochimiques ont un grand tournant dans l'étude des variations, qui peuvent jouer un rôle dans l'amélioration de la qualité technologique du blé, par le transfert de nouvelles sous unités et/ou augmenter le nombre de ces dernières.

# Références bibliographiques

- Amiour N, Merlino M, Leroy P et Branlard G., (2003).** Chromosome mapping and identification of amphiphilic proteins of hexaploid wheat kernels. *Theoretical and Applied Genetics* **108**. USA. P 62-72.
- Amri, S., (2011).** Diversité des sous-unités gluténines HPM et FPM, sous-unités sécalines HPM et 75k gamma-sécalines d'une collection de triticales hexaploïdes. Mémoire de magistère. *Université Mentouri Constantine*. Algérie. P 33.
- Anonyme., (2014).** Electrophorèse SDS PAGE : principe et exemple d'application en STL Biotechnologies [En ligne]. Adresse URL: <http://biotech.spip.ac-rouen.fr/spip.php?article155>. Consultée le 04.05.2014.
- Bandou H, Rodriguez-Quijano M, Carrillo J. M, Branlard G, Zaharieva M, et Monneveux P., (2009).** Morphological and genetic variation in *Aegilops geniculata* from Algeria. *Plant Systematics and Evolution* **277**. USA. P 85–97.
- Bean S. R, Bietz J. A et Lookhart G. L., (1998).** High-performance capillary electrophoresis of cereal proteins. *Journal of Chromatography A* **814**. USA. P 25- 41.
- Bellil I, Chekara Bouziani M et Khelifi D., (2012).** Genetic Diversity of High and Low Molecular Weight Glutenin Subunits in Saharan Bread and Durum Wheats from Algerian Oases. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* **48**. République tchèque. P 23-32.
- Benmebarek H., (2004).** Diversity des gluténines HPMn sécalines HPM et 75 sécalines d'une collection du CIMMYT de triticales hexaploïdes. Mémoire de magister. *Université Mentouri Constantine*. Algérie. P 69.
- Benmoussa M., (1999).** Production d'une gluténine à faible poids moléculaire dans les feuilles de la luzerne et les tubercules de la pomme de terre. Thèse de doctorat. *Université Laval*. Canada. P 91.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti P. G, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R et Postel W., (1982).** Isoelectric focusing in immobilized pH gradients" Principle, methodology and some applications. *Journal Biochemical Biophysical Methods* **6**. USA. P 317-339.
- Blanch E. W, Kasarda D. D, Hecht L, Nielsen K, et Barron L. D., (2003).** New Insight into the Solution Structures of Wheat Gluten Proteins from Raman Optical Activity. *American Chemical Society* **42**. USA. P 5665–5673
- Branlard G et Le Blanc A., (1985).** Les sous-unités gluténines de haut poids moléculaire des blés tendres et des blés durs cultivés en France. *Agronomie* **5**. France. P 467-477.
- Branlard G, Autran J. C et Monneveux P., (1989).** HMW glutenin subunits in durum wheat (*T. durum*). *Theoretical and applied genetics* **78**. USA. P 8- 353.

**Branlard G, Autran J. C, Rousset M, Dardevet M. E et Koenig G., (1990).** Catalogue des sous unités de haut poids moléculaire des gluténines des blés (*T.aestivum* et *T.durum*). *INRA*. Paris. France. P 56.

**Branlard G, Khelifi D et Lookhart G., (1992).** Identification of some wheat proteins separated by two-step acid polyacrylamide gel electrophoresis and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *American Association of Cereal Chemists, Inc* **69**. USA. P 677-678.

**Branlard G., (1999).** Des protéines sélectionnées pour améliorer la valeur d'utilisation des blés. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **6**. France. P 7-513.

**Branlard G., (2009).** Les bases génétiques et utilisation des marqueurs associés à l'amélioration de la qualité des blés. *Cahiers Agricultures* **18**. France. P 11-506.

**Bridgen M., (1994).** A review of plant embryo culture. *HortScience* **29**. USA. P 1243-1246.

**Brown J. W et Flavell R. B., (1981).** Fractionation of Wheat Gliadin and Glutenin Subunits by Two-dimensional Electrophoresis and the Role of Group 6 and Group 2 Chromosomes in Gliadin Synthesis. *Theoretical and Applied Genetics* **59**. USA. P 349-359.

**Bunce N. A, White R. P et Shewry P. R., (1984).** Variation in Estimates of Molecular Weights of Cereal Prolamins by SDS-PAGE. *Journal of Cereal Science* **3**. Wageningen. USA. P 131-142.

**Casnin C., (2013).** Les étapes de la domestication du blé. *FORMAVIE*. Vendôme. France. P 1-20.

**Chandler J. M, Jan C. C et Beard B. H., (1986).** Chromosomal differentiation among the annual *Helianthus* species. *Systematic Botany* **11**. USA. P 354-371.

**Cherdouh A, Khelifi D, Carrillo J .M et Nieto-Taladriz M. T., (2005).** The high and low molecular weight glutenin subunit polymorphism of Algerian durum wheat landraces and old cultivars. *Plant Breeding* **124**. République Tchèque. P 338-342.

**Debiton C., (2010).** Identification des critères du grain de blé (*Triticum aestivum* L.) favorables à la production de bioéthanol par l'étude d'un ensemble de cultivars et par l'analyse protéomique de lignées isogéniques waxy. Thèse de doctorat. *Université Blaise Pascal*. France. P 2-7.

**Doussinault G, Pavoine M. T, Jaudeau B et Jahier J., (2002).** Évolution de la variabilité génétique chez le blé. *INRA* **21**. France. P 91-103.

**Dover G. A et Riley R., (1972).** Prevention of pairing of homeologous meiotic chromosomes of wheat by an activity of supernumerary chromosomes of *Aegilops*. *Nature* **240**. UK. P 159-161.

**Dumas C., (2007).** Apport en protéines: consommation, qualité, besoins et recommandations. *Afssa*. France. P 21-28.

**Feillet P., (2000).** Le grain de blé : composition et utilisation. *INRA. Paris. France. P 17-80.*

**Feldman M et Mello-sampayo T., (1967).** Suppression of homeologous pairing in hybrid of polyploidy wheat x *Triticum speltoides*. *Journal canadien de génétique et de cytologie* **9**. Canada. P 307-313.

**Feldman M., (1994).** Cytogenetic activity and mode of action of the pairing homoeologous (*Ph1*) gene of wheat. *Crop Science* **33**. USA. P 894-897.

**Fernandez-Calvin B et Orellana J., (1990).** High-molecular-weight glutenin subunits variation in the *Sitopsis* section of *Aegilops*. Implications for the origin of the B genome of wheat. *Heredity* **65**. USA. P 455-463.

**Fido R. J., (1997).** Effects of a-, b-, c- and  $\omega$ -Gliadins on the Dough Mixing Properties of Wheat Flour. *Journal of Cereal Science* **26**. Wageningen. USA. P 271–277.

**Galili G et Feldman M., (1985).** Structural homology of endosperm high molecular weight glutenin subunit of common wheat (*Triticum aestivum*). *Theoretical and applied genetics* **70**. USA .P 634-642.

**Gallais A et Bannetot H., (1992).** Amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. *INRA*. Paris. France. P 14-38.

**Gooding M. J., (2009).** The Wheat Crop. In ‘‘Wheat: chemistry and technology’’. *American Association of Cereal Chemists, Inc* .USA. P 19-49.

**Gueguen J, Sanchez-Vioque R et Malabat C., (1999).** Diversification/ Qualité Les protéines végétales : un réservoir de macromolécules multi-fonctionnelles. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides* **6**. France. P 498-504.

**Gupta R. B et Shepherd K. W., (1990).** Two–step one dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin **2**. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheat. *Theoretical and applied genetics* **80**. USA. P 65-74.

- Gupta R. B et Tsuchiya T., (1991).** Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution Part A. *Elsevier Science Publishers B.V.* Amsterdam. Hollande. P 243-312.
- Gupta R. B. et MacRitchie F., (1991).** A rapid one-step one-dimensional SDS-PAGE procedure for analysis of subunit composition of glutenin in wheat. *Journal of Cereal Science* **14**. Wageningen. USA. P 105-109.
- Gupta R.B et Shepherd K. W., (1990).** Two-step one dimensional SDS-PAGE analysis of LMW subunits of glutenin 1. Variation and genetic control of the subunits in hexaploid wheat. *Theoretical and applied genetics* **80**. USA. P 65-74.
- Hadzhiivanova B, Bozhanova V et Dechev D., (2012).** Interspecific hybridization between durum wheat and *Aegilops umbellulata* (zhuk). *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **18**. Bulgaria. P 713-721.
- Harlan J. R., (1992).** Crops and man. *American Society of Agronomy*. USA. P 295.
- Hegde S. G et Waines J. G., (2004).** Hybridization and Introgression between Bread Wheat and Wild and Weedy Relatives in North America. *Crop Science* **44**. USA. P 1145-1155.
- Holt L. M, Astin R et Payne P. I., (1981).** Structural and genetical studies on the high molecular-weight subunits of wheat glutenin. 2. Relative isoelectric points determined by two-dimensional fractionation in polyacrylamide gels. *Theoretical and applied genetics*. USA. P 237- 243.
- Huang S, Sirikhachornkit A, Su X, Faris J, Gill B, Haselkorn R, et Gornicki P., (2002).** Genes encoding plastid acetyl-coa carboxylase and 3-phosphoglycerate Kinase of *Triticum/Aegilops* complex and the evolution history of polyploidy wheat. *The National Academy of Sciences* **99**. USA. P 8133–8138.
- Igrejas G, Gaborit T, Oury F. X, Chiron H, Marion D et Branlard G., (2001).** Genetic and environmental effects on puroindoline-a and puroindoline-b content and their relationship to technological properties in French bread wheats. *Journal of Cereal Science* **34**. USA. P 37 47.
- Jackson E. A, Holt L. M et Payne P. I., (1983).** Characterisation of high molecular weight gliadin and low-molecular-weight glutenin subunits of wheat endosperm by two-dimensional electrophoresis and the chromosomal localisation of their controlling genes. *Theoretical and applied genetics* **66**. USA. P 29-37.

- Jauhar P. P, Almouslem A. B, Peterson T. S et Joppa L. R., (1999).** Inter- and Intragenomic Chromosome Pairing in Haploids of Durum Wheat. *The Journal of Heredity* **90**.USA. P 437-445.
- Jiang, J, Friebe B, Gill B. S., (1994).** Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica* **73**. USA. P 199-212.
- Khelifi D et Hamdi O., (2007).** Utilisation des marqueurs biochimiques et génétiques dans l'amélioration de la qualité des blés en Algérie. *Université Mentouri Constantine*. Algérie. P 2-22.
- Khelifi D, Hamdi O et Benbelkacem A., (2004).** Caractéristiques biochimiques et technologiques des blés cultivés en zone semi-aride. *CIHEAM*. Zaragoza. Espagne. P 189-192.
- Kihara H., (1954).** Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analyser-method. *Cytologia* **19**. Tokyo. Japon. P 336-357.
- Kimber G et Yen Y., (1989).** Hybrids involving wheat relatives and autotetraploid *Triticum umbellulatum*. *Génome* **32**. Canada. P 1-5.
- Kimber G et Feldman M., (1987).** Wild wheat : an introduction. *University of Missouri*. Columbia. P 99-103.
- Kloster D. D, Krechting F. K et Van Gelder W. M., (1991) :** Quantitative variation in individual high-molecular-weight glutenin subunits of wheat in relation to variation in environmental conditions. *Journal of the science of food and agriculture* **57**. USA. P 405-415.
- Laemmli U. K., (1970) :** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**. UK. P 680-685.
- Levy A. A, Galili G et Feldman M., (1988) :** Polymorphism and genetic control of high molecular weight glutenin subunits in wild tetraploid wheat *Triticum turgidum* var.*dicoccoides*. *Heredity* **61**. UK. P 63-72.
- MacRitchie F, Du Cros, D. L et Wrigley C. W., (1990).** Flour polypeptides related to wheat quality. *Advances in cereal science and technology*. USA. P 79-145.
- Mammdouh Alnaddaf L, Moualla M. Y et Kalhout A. R., (2011).** Genetic Variability in Some Syrian Wheat Genotypes using Storage Proteins. *Asian Journal of Agricultural Sciences* **3**. Taiïwan. P 506-515.

- Morrison L. A, Riera-Lizarazu O, Crémieux L. et Mallory-Smith C. A., (2002).** Jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica* Host) x Wheat (*Triticum aestivum* L.) Hybrids: Hybridization Dynamics in Oregon Wheat Fields. *Crop Science* **42**. USA. P 1863-1872.
- O'Farrell P. H., (1975).** High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *The Journal of Biological Chemistry*. USA. P 4007-4021.
- Osborne T. B., (1907).** The proteins of the wheat kernel. *Carnegie Institute of Washington*. USA. P 1-119.
- Osborne T. B., (1924).** The vegetables proteins 2nd edition. *Longmans Green et Co edition*. New York. USA. P 3-100.
- Payne P. I, Corfield K. G, Holt L. M et Blackman J. A., (1981).** Correlation between the inheritance of certain high molecular weight subunit of glutinin and breakmaking quality in progenies of six crosses of bread wheat. *Journal of the science of food and agriculture* **32**. USA. P 51-60.
- Payne P. I, Holt L. M et Lawrence G. J., (1983).** Detection of a Novel High Molecular Weight Subunit of Glutenin in Some Japanese Hexaploid Wheats. *Journal of Cereal Science* **1**. Wageningen. USA. P 3-8.
- Payne P. I, Jackson E. A., Holt L. M. et Law C. N., (1983).** Genetic linkage between endosperm storage protein genes on each of the short arms of chromosomes IA and IB in wheat. *Theoretical and applied genetics* **67**. USA. P 235-243.
- Payne P. I, Nightingale M. A, Krattiger A. F. et Holt L. M., (1987).** The relationship between HMW glutenin composition and the bread-making quality of british grown varieties. *Journal of the science of food and agriculture* **40**. USA. P 51-65.
- Pomeranz Y., (1988).** Chemical composition of kernel structures. In "Wheat: chemistry and technology. *American Association of Cereal Chemists*. USA. P 514.
- Quezel P et Santa S., (1962).** Nouvelle Flore de l'Algérie des régions désertiques méridionales. *Centre national de la Recherche scientifique*. Moscou. Russie. P 1027-1028.
- Raskina O, Belyayev A, Nevo E., (2004).** Quantum speciation in *Aegilops*: molecular cytogenetic evidence from rDNA cluster variability in natural populations. *The National Academy of Sciences* **101**. Washington. USA. P 14818-14823.
- Rodríguez-Quijano M, Nieto-Taladriz M.T. et Carrillo J.M., (2001).** Polymorphism of high molecular weight glutenin subunits in three species of *Aegilops*. *Genetic Resources and Crop Evolution* **48**. Hollande. P 599-607.

- Saini R., (2007).** Physicochemical Properties of Flour Proteins in Relation to the Textural and structural properties of white salted noodles. *ProQuest*. USA. P 3-18.
- Schofield J. D, Bottomley R. C, Timms M.F et Booth M.R., (1983).** The Effect of Heat on Wheat Gluten and the Involvement of Sulphydryl-Disulphide Interchange Reactions. *Journal of Cereal Science* **1**. Wageningen. USA. P 241-253.
- Sharma C. H., (1999).** Embryo rescue following wide crosses. *Methods In Molecular Biology* **111**. USA. P 292-304.
- Sharma H, El Khelifi O, Chamlal H et Benhabib O., (2003).** Interspecific cross between *Durum Wheat* and *Aegilops geniculata* to transfer resistance to *Hessian fly* (*Mayetiola destructor* Say). *Acta Botanica Malacitana* **28**. Espagne. P 49-154.
- Shewry P. R, Bradberry D, Franklin J, White R. P., (1984).** The chromosomal locations and linkage relationships of the structural genes for the prolamin storage proteins (secalins) of rye. *Theoretical and applied genetics* **69**. USA. P 63-69.
- Shewry P. R, Tatham A. S, Forde J, Kreis M, et Mifflin B. J., (1986).** The classification and nomenclature of wheat gluten proteins: a reassessment. *Journal of Cereal Science* **4**. Wageningen. USA. P 97-106.
- Simoès Larráz Ferreira M., (2011).** Dynamique d'assemblage des protéines de réserve et du remplissage du grain de blé dur. Thèse doctorat. *Centre Infranational d'études Supérieur en Sciences Agronomique de Montpellier*. France. P 9-27.
- Singh N. K, Shepherd K. W et Cornish G. B., (1991).** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science* **14**. Wageningen. USA. P 203- 208.
- Sinhg N. K et Shepherd K. W., (1988).** Linkage mapping of genes controlling endosperm storage proteins in wheat. 1. Genes on the short arms of group 1 chromosomes. *Theoretical and applied genetics* **75**. USA. P 628-641.
- Spetsov P, Mingeot D, Jacquemin J. M, Samardjieva K et Marinova E., (1997).** Transfer of powdery mildew resistance from *aegilops variabilis* into bread wheat. *Euphytica* **93**. USA. P 49-54.
- Van Slageren M. W., (1994).** Wild Wheat : a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. Et Spach.) Eig. (*Poaceae*). *Wageningen Agriculture University Papers*. Hollande. P 512.

- Vensel W. H, Tanaka C. K, Cai N, Wong J. H, Buchanan B. B et Hurkman W. J., (2005).** Developmental changes in the metabolic protein profiles of wheat endosperm. *WILEY-VCH 5*. Wageningen. USA. P 1594-1611.
- Waga J et Zientarski J., (2007).** Isolation and purification of individual gliadin proteins by preparative acid polyacrylamide gel electrophoresis [A-PAGE] for allergenic research. *Journal of the Science of Food and Agriculture 4*. USA. P 91-96.
- Wieser H, Antes S et Seilmeier W., (1998).** Quantitative Determination of Gluten Protein Types in Wheat Flour by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *American Association of Cereal Chemists 75*. USA. P 644-650.
- William M, Peña R. J et Mujeeb-Kazi A., (1993).** Seed protein and isozyme variations in *Triticum tauschii* (*Aegilops squarrosa*). *Theoretical and applied genetics 87*. USA. P 257-263.
- Wrigley C. W, Békés F et Bushuk W., (2006).** Gliadin and Glutenin : the unique balance of wheat quality. *American Association of Cereal Chemists* .USA. P 446.
- Xueli A, Qiaoyun L, Yueming Y, Yinghua X, Hsam S. L et Zeller F. J., (2005).** Genetic diversity of European spelt wheat (*Triticum aestivum* ssp. *spelta* L. em. Thell.) revealed by glutenin subunit variations at the *Glu-1* and *Glu-3* loci. *Euphytica 130*. USA. P 377–385.
- Zadri F., (2009).** Obtention d'hybrides F1 issus du croisement *Aegilops* X Blé dur (*Triticum durum* Desf) : Amélioration à la tolérance à la sécheresse. Mémoire du magister. *Université Mentouri Constantine*. Algérie. P 66.
- Zaharieva M. N., (1996).** Etude des ressources génétiques d'*Aegilops* de Bulgarie. Thèse de doctorat. *Ecole pratique des hautes études*. Paris. France. P 184.
- Zohary D et Feldman M., (1962).** Hybridization between amphiploids and evolution of polyploids in the Wheat (*Aegilops-Triticum*) group. *The Hebrew University 16*. Jerusalem. Palestine. P 44-61.

# Annexes

### Annexe 1 : Solutions d'extraction des protéines de réserves

Les solutions	Constituants	Quantités
<b>Solution A</b>	Propanol-1	50 ml
	Eau distillée	q.s.p 100 ml
<b>Solution B</b> (Conservation environ 2 semaines à 4C°)	Propanol-1	5 ml
	Tris HCl 1M pH 8	0.8 ml
	Eau distillée	q.s.q 10 ml
<b>Solution B1 (à préparer ex temporairement)</b>	Solution B	3 ml
	DDT (Dithiotreitol)	30 mg
<b>Solution B2 (à préparer ex temporairement)</b>	Solution B	3 ml
	4-vinyl-pyridine	42 µl
<b>Solution C</b> (Conservation environ 2 semaines à 4C°)	SDS	0.2 g
	Glycérol	4 ml
	Bleu de bromophénol	2 ml
	Tris HCl 1M	0.8 ml
	Eau distillée	q.s.p 10 ml

## Annexe 2 : Constituants des gels de séparation et de concentration

Gels	Constituants	Quantités (pour deux gels)
<b>Gel de séparation (running gel)</b> Pour les gluténines	Acrylamide à 35%	35 ml
	Bisacrylamide à 2%	6 ml
	Eau distillée	16.6 ml
	Tris HCl ph 8.8	37.6 ml
	SDS à 10 %	1 ml
	APS à 1%	2.5 ml
	Temed	50 µl
<b>Gel de séparation</b> Pour les gliadines	Acrylamide à 35%	28.91 ml
	Bisacrylamide à 2%	6.65 ml
	Eau distillée	22.45 ml
	Tris HCl ph 8.8	37.9 ml
	SDS à 10 %	1 ml
	APS à 1%	2.52 ml
	Temed	85 µl
<b>Gel de</b>	Acry/Bis	1.5 ml
	Tris PH 6.8	3.75 ml
	SDS 10%	150 µl

<b>concentration 4%</b>  (Stacking gel)	Eau distillée	9.51 ml
	APS 10%	75 µl
	Temed	22.5 µl

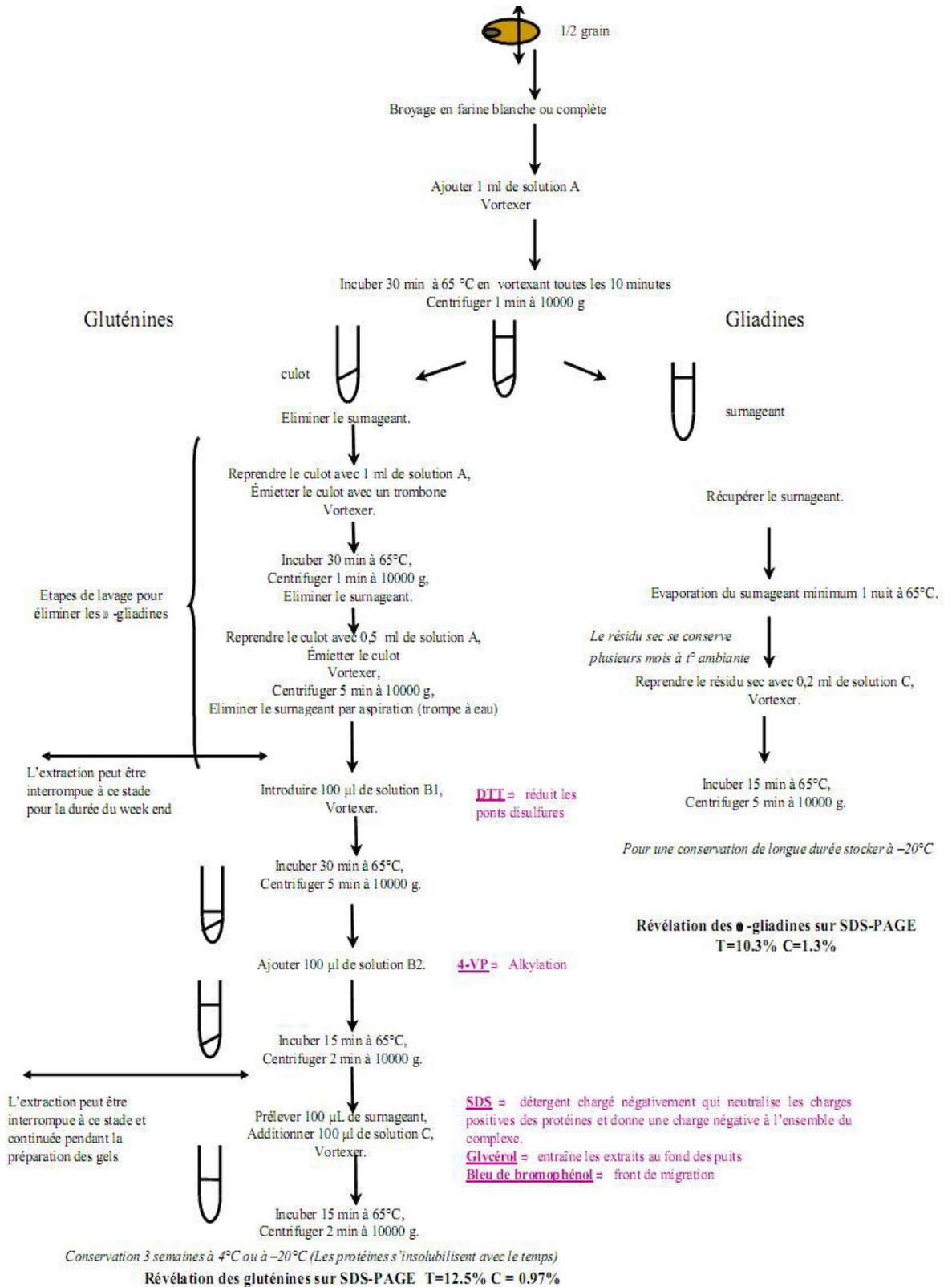
### Annexe 3 : Solutions mère d'électrophorèse (SDS-PAGE)

Solutions	Constituants	Quantités
<b>Solution mère d'acrylamide à 35%</b> (à préparer avec gants et masque)	Acrylamide	35 g
	Eau distillée	100 ml
<b>Solution mère de bisacrylamide à 2%</b> (à préparer avec gants et masque)	Bisacrylamide	0.5 g
	Eau distillée	25 ml
<b>Solution stock de SDS à 10%</b>	Sodium Dodécyl Sulfate	1 g
	Eau distillée	10 ml
<b>Solution d'APS à 10%</b> (à préparer ex temporement)	APS (Ammonium Per Sulfate)	1 g
	Eau distillée	10 ml
<b>Tampon Tris HCl pH 8.8</b> (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)	Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	30.285 g
	Eau distillée	200 ml
	Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant	4 à 6 ml
	Eau distillée	250 ml
<b>Tampon Tris HCl pH 6.8</b> (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)	Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	30.285 g
	Eau distillée	200 ml
	Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant	15 à 20 ml
	Eau distillée	250 ml
<b>Tampon d'électrophorèse</b>	Glycine	35.275 g
	Tris	7.5 g
	SDS	2.5 g
	Eau distillée	250 ml
<b>Solution mère de bleu de Coomassie R250</b>	Bleu de Coomassie R250	2.5 g
	Ethanol 95%	100 ml
<b>Solution de coloration 1 L</b>	Bleu de Coomassie 0.025%	250 mg
	Méthanol	400 ml
	Acide acétique 7%	70 ml
	Eau distillée	q.s.p 1L
<b>Solution de décoloration 1 L</b>	Méthanol 5%	50 ml
	Acide acétique 7%	70 ml
	Eau distillée	q.s.p 1 L

- Solution mère de bleu de comassie

Ethanol est mis en agitateur avec un barreau magnétique, le bleu de comassie est ajouté en neige pour éviter le dépôt, laisser en agitateur pendant 2 heures puis filtrer.

**Annexe 4 : Extraction des gluténines selon la méthode de Singh et *al.*, 1991, (in Zadri., 2009)**





PM	H10	H1013	H1022	H1032	H1033	Ae,gen	BC
116,0	0	0	0	0	0	0	0
115,8	0	1	0	0	0	0	0
115,6	0	0	1	1	1	0	0
115,1	1	0	0	0	0	0	0
115,0	0	0	0	0	0	1	0
112,9	0	0	1	1	0	0	0
112,7	0	0	0	0	1	0	0
112,4	0	0	0	0	0	0	0
112,2	1	0	0	0	0	0	0
112,0	0	1	0	0	0	0	0
111,7	0	0	0	0	0	0	0
111,5	0	0	0	0	0	0	0
111,2	0	0	0	0	0	0	0
110,3	0	0	0	0	0	0	0
109,4	0	0	0	0	0	1	0
109,0	0	0	0	0	0	0	0
108,8	0	0	0	0	0	0	0
103,7	0	0	0	0	0	0	0
103,1	0	0	0	1	0	0	0
102,8	0	0	0	0	0	0	0
102,7	0	0	0	0	1	0	0
102,6	0	0	0	0	0	0	0
102,5	0	0	1	0	0	0	0
102,3	0	1	0	0	0	0	0
102,1	0	0	0	0	0	0	0
101,9	0	0	0	0	0	0	1
101,8	1	0	0	0	0	0	0
101,5	0	0	0	0	1	0	0
101,3	0	0	0	1	0	0	0
101,2	0	0	0	0	0	0	0
101,0	0	1	1	0	0	0	0
100,9	0	0	0	0	0	0	0
100,6	1	0	0	0	0	0	0
100,4	0	0	0	0	0	1	0
99,8	0	0	0	0	0	0	0
99,7	0	0	0	0	0	0	0
99,5	0	0	0	0	0	0	0
99,4	0	0	0	0	0	0	0
98,8	0	0	0	0	0	0	0
98,1	0	0	0	0	0	0	0
97,8	0	0	0	0	0	0	0
97,6	0	0	0	0	0	0	0
97,5	0	0	0	0	0	0	0
97,2	0	0	0	0	0	0	0

96,5	0	1	0	0	0	0	0
96,1	1	0	0	0	0	0	0
95,5	0	0	0	0	0	0	1
94,8	0	0	0	0	0	0	0
94,5	0	0	0	0	0	0	0
93,8	0	0	1	0	0	0	0
93,6	0	0	0	0	1	0	0
93,5	0	0	0	1	0	0	0
93,2	0	0	0	0	0	0	0
92,9	0	0	0	0	0	0	0
76,3	0	0	0	0	0	0	0
73,6	0	0	0	0	0	0	0
73,2	0	0	0	0	0	0	0
72,1	0	0	0	1	0	0	0
71,2	0	0	0	0	1	0	0
66,9	0	0	1	0	0	0	0
64,1	0	0	0	0	0	0	0
63,6	0	1	0	0	0	0	0
63,1	0	0	0	0	0	0	0
62,9	0	0	1	0	0	0	0
62,3	0	0	0	0	0	0	0
62,1	0	0	0	0	0	0	0
62,0	0	0	0	0	1	0	0
61,8	0	0	0	1	0	0	0
61,5	1	0	0	0	0	0	0
61,3	0	0	0	0	0	0	0
60,7	0	1	0	0	0	0	0
60,3	0	0	1	0	0	0	0
60,1	0	0	0	0	0	0	0
59,4	0	0	0	0	0	0	0
59,3	0	0	0	0	0	0	1
59,2	0	0	0	0	0	0	0
58,6	0	0	0	0	0	0	0
58,1	0	0	0	0	0	0	0
57,8	0	1	0	0	0	0	0
57,2	0	0	0	0	0	0	0
56,9	1	0	0	0	0	0	0
56,4	0	0	0	0	0	0	1
56,1	0	0	0	0	0	0	0
55,6	0	0	0	0	1	0	0
55,2	0	0	0	1	0	0	0
54,9	0	1	0	0	0	0	0
54,3	0	0	0	0	0	0	1
53,8	1	0	0	0	0	0	0
53,5	0	0	0	0	0	0	0

53,2	0	0	0	0	0	0	0
52,9	0	0	0	0	0	0	0
52,4	0	0	0	1	0	0	0
52,2	0	0	0	0	0	0	0
52,1	0	0	1	0	0	0	0
51,3	0	0	0	0	0	0	0
51,0	0	0	0	0	0	0	0
50,3	0	0	0	0	1	0	0
50,0	0	0	0	1	0	0	0
49,6	0	0	0	0	1	0	0
49,1	0	0	0	0	0	0	0
48,4	0	0	0	0	0	0	0
48,0	0	0	0	0	0	0	0
47,1	0	0	0	0	0	0	0
46,2	0	0	0	0	0	0	0
45,4	0	0	0	0	1	0	0
44,6	0	0	0	1	0	0	0
43,6	0	1	0	0	0	0	0
43,5	0	0	0	1	0	0	0
43,2	1	0	0	0	0	0	0
40,8	0	0	0	0	0	0	0
39,3	0	0	0	0	0	0	0
38,2	0	0	0	0	0	0	0
37,3	1	0	0	1	0	0	0
36,8	0	0	0	0	0	0	0
36,3	0	0	1	0	0	0	0
34,7	0	1	0	0	0	0	0
33,5	0	0	0	0	0	0	0

OZ	H18	H1814	H1815	H1816	H1817	H1818	H1822
1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	0



0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	1	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	1	1	0
0	0	0	0	0	1	0	0	1
0	1	0	0	0	0	0	0	0

0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	1	0	0	0	0	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	1	0

# Résumés

## Résumé

Traditionnellement, l'appréciation de la diversité génétique des céréales d'une façon générale, était basée essentiellement sur les caractères morphologiques. Plus récemment, l'utilisation des marqueurs biochimiques qui sont représentés chez le blé et l'*Aegilops* par les protéines de réserves, gluténines et gliadines, ayant différents poids moléculaires. Dans cette étude la technique électrophorétique nous a permis d'estimer une grande variabilité génétique des SG-HPM chez les lignées recombinantes 'RIL'. Les diagrammes électrophorétiques des hybrides, obtenus par SDS-PAGE, révèlent une grande similitude avec ceux de parent sauvage (*Ae. geniculata*). L'ensemble des résultats obtenus conduit à proposer aux sélectionneurs les lignées de l'hybride H10 pour l'amélioration de la qualité technologique des blés.

**Mots-clés :** lignées recombinantes, variabilité génétique, protéines de réserve, SDS-PAGE.

## **Abstract**

Traditionally, the assessment of the genetic diversity of cereals in general, was based primarily on morphological characters. More recently, the use of biochemical markers are represented in wheat with Aegilops and reserve proteins, glutenins and gliadins, having different molecular weights. In this study the electrophoretic technique has allowed us to estimate genetic variability of HMW-GS in recombinant "RIL" lines. The electrophoretic diagrams of hybrids, obtained by SDS-PAGE revealed a great similarity with those of wild relative parent (*Ae. geniculata*). The overall results led to propose to breeders the lines of the hybrid H10 to improve the technological quality of wheat.

**Keywords:** recombinant inbred line, storage proteins, genetic variability, SDS-PAGE.