

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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

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



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie et Ecologie Végétale

قسم : البيولوجيا و علم البيئة النباتية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie et Génomique Végétale

Intitulé :

Etude de l'expression du gène *TaSTRG* suite aux stress abiotiques chez les lignées du croisement blé dur X *Aegilops geniculata* Roth.

Présenté et soutenu par : MENASRIA Belkacem

Le : 16 /06/2015

TEMAGOULET Lakhdar

Jury d'évaluation :

- **Président du jury:** Dr. BENBELKACEM Abdelkader. M.R. « A » INRA Constantine
- **Rapporteur :** Mr. KELLOU Kamel. M.A.A U.F.M Constantine
- **Examineurs :** Dr. BENABDOUN Faiza Meriem. M.A.A U.F.M Constantine

Année universitaire
2014 – 2015

Nom : MENASRIA. **Prénom :** Belkacem.

TEMAGOULET. Lakhdar.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de : Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Master Biologie et Génomique Végétale.

Option : Biologie et Génomique Végétal

Thème : Etude de l'expression du gène *TaSTRG* suite aux stress abiotiques chez les lignées du croisement blé dur X *Aegilops geniculata* Roth.

Résumé : Le blé est exposé à de divers stress abiotiques. Comme la salinité et le stress hydrique qui affectent les conditions de croissances et de développements. Dans une étude réalisée en 2009 un gène candidat *TaSTRG* a été impliqué dans le stress hydrique et salin. L'objectif de ce travail est de tester l'expression du gène *TaSTRG* chez les hybrides issus des croisements interspécifiques entre le blé dur (variété Oued Zenati368) et *Aegilops geniculata*. Par comparaison avec la variété *Chinese spring* de blé tendre. Les résultats obtenus après une analyse PCR sur ADNc indiquent des profils d'expression distincts chez les génotypes parentales (*Aegilops geniculata* et la variété Oued Zenati368 du blé dur) et la variété de blé tendre (*Chinese spring*) utilisée comme témoin de référence dans la biologie végétale. Il apparaît que ce gène s'exprime aussi dans les conditions des stress biotiques, ce qui permet de proposer ce gène dans l'amélioration de la résistance vis-à-vis les différents stress.

Mots clé :

Aegilops geniculata, *Triticum aestivum*, *TaSTRG*, ADNc, ARN, PCR, stress.

Jury d'évaluation :

- **Président du jury :** Dr. BE.NBELKACEM Abdelkader.
M.R. « A » INRA Constantine.
- **Rapporteur:** Mr. KELLOU Kamel. M.A.A U.F.M Constantine.
- **Examineurs :** Dr. BENABDOUN Faiza Meriem M.A.A U.F.M Constantine.

Année universitaire : 2014/2015

REMERCIEMENTS :

AU TERME DE CE TRAVAIL,

ON REMERCIE D'ABORD LE BON DIEU DE NOUS AVOIR DONNÉ LA PATIENCE, LE COURAGE D'ACCOMPLIR CET HUMBLE TRAVAIL.

*ON TIENT À EXPRIMER NOS REMERCIEMENTS LES PLUS SINCÈRES ET NOS PROFOND RESPECT À **MR KELLOU.K**, MAITRE ASSISTANT À L'UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1, POUR SES ORIENTATIONS, SES CONSEILS ET SON SUIVI PERMANENT.*

*AU PRÉSIDENT DU JURY **DR.BENBELKACEM.A**, MAITRE DE RECHERCHE À L'INRA CONSTANTINE QUI NOUS A FAIT L'HONNEUR DE PRÉSIDER LE JURY.*

*NOS SINCÈRES REMERCIEMENTS VONT À **DR. BENABDOUN.M**, MAITRE ASSISTANT À L'UNIVERSITÉ CONSTANTINE 1, POUR AVOIR ACCEPTÉ D'EXAMINER CE TRAVAIL.*

UN GRAND MERCI À TOUS NOS ENSEIGNANTS QUI ONT CONTRIBUÉ À NOTRE FORMATION.

DES REMERCIEMENTS PARTICULIERS À NOS PARENTS ET À , QUI AVEC, LEUR SOUTIEN MORAL PERMANENT, IL NOUS ONT PERMIS D'ARRIVER À CETTE ÉTAPE TRÈS IMPORTANTE DE NOTRE VIE.

MERCI À NOS AMIS (ES) ET COLLÈGUES DE PROMOTION DE NOUS AVOIR BIEN SOUTENU ET AIDÉ.

NOUS TENONS À REMERCIER TOUTE PERSONNE AYANT COLLABORÉ DE PRÈS OU DE LOIN À L'ÉLABORATION DE CE DOCUMENT.

DEDICACE :

Nous dédions ce modeste travail à nos chers parents

Source d'amour et d'affection.

A nos chers frères et sœurs.

A toutes nos familles.

A tous nos amis (es).

Lakhdar & Kacem

Résumé :

Le blé est exposé à de divers stress abiotiques. Comme la salinité et le stress hydrique qui affectent les conditions de croissances et de développements. Dans une étude réalisée en 2009 un gène candidat *TaSTRG* a été impliqué dans le stress hydrique et salin. L'objectif de ce travail est de tester l'expression du gène *TaSTRG* chez les hybrides issus des croisements interspécifiques entre le blé dur (variété Oued Zenati368) et *Aegilops geniculata*. Par comparaison avec la variété *Chinese spring* de blé tendre. Les résultats obtenus après une analyse PCR sur ADNc indiquent des profils d'expression distincts chez les génotypes parentales (*Aegilops geniculata* et la variété Oued Zenati368 du blé dur) et la variété de blé tendre (*Chinese spring*) utilisée comme témoin de référence dans la biologie végétale. Il apparaît que ce gène s'exprime aussi dans les conditions des stress biotiques, ce qui permet de proposer ce gène dans l'amélioration de la résistance vis-à-vis les différents stress.

Mots clé :

Aegilops geniculata, *Triticum aestivum*, *TaSTRG*, ADNc, ARN, PCR, stress.

ملخص

يتعرض القمح لمختلف الإجهادات اللاحيوية، على غرار الملوحة الزائدة و الجفاف مما يؤثر على نمو، و هذا في وجود الإجهاد المائي *TaSTRG* تطور النبتة. في دراسة أجريت سنة 2009 على الجين والملحي. الهدف من هذه الدراسة هي اختبار التعبير للجين المذكور سابقا وهذا في عينات ناتجة عن بالمقارنة مع نوع من القمح اللين *Aegilops geniculata* تصالب القمح الصلب مع النوع البري تظهر نمط ADNc على PCR. النتائج المتحصل عليها بعد اختبار *Chinese Spring* التحمل ضد الإجهادات اللاحيوية، هذا ووجدنا أيضا أن الجين الذكور سابقا يستطيع أن يعبر أيضا في وجود الإجهادات الحيوية. لذلك نقترح استعماله في تطوير قدرة تحمل النباتات في وجود مختلف الإجهادات.

الكلمات المفتاحية :

Aegilops geniculata, *Triticum aestivum*, *TaSTRG* , ADNc, ARN, PCR, PEG.

Abstract

Wheat is exposed to various abiotic stresses, as salinity and water drought affecting growing conditions and developments. In a study realized in 2009, a candidate gene *TaSTRG* was involved in drought and salinity. The aim of this study is to test the expression of *TaSTRG* gene in hybrid resulted from interspecific crosses between durum wheat (Oued Zenati 368 variety) and *Aegilops geniculata* by comparison with the soft wheat (*Chinese spring* variety). The obtained results after PCR analysis of cDNA indicate distinct expression profiles, in the parental genotypes (*Aegilops geniculata* , Oued Zenati368 variety of durum wheat) , and the variety of soft wheat Chines spring used as reference control in plant biology. It appears that this gene is also expressed in the conditions of biotic stress, which allows to propose this gene in the improvement of the resistance toward various stress.

Key words :

Aegilops geniculata, *Triticum aestivum*, *TaSTRG* , cDNA, RNA, PCR, PEG.

Liste des abréviations

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire.

Ae : *Aegilops geniculata*.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

BET : Bromure d'éthidium.

DEPC : Diethylpyrocarbonate.

dNTP : Mélange des quatre désoxyribonucléotides.

MMLV (RT) : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase.

NaCl : Chlorure de sodium.

OZ : Oued Zenati.

PCR : Polymerase chain reaction.

PEG: Polyéthylène glycol.

RNase : Ribonucléase.

Rpm : Rotation par minute.

RT-PCR : *Reverse transcriptase PCR*

T : Témoin.

TaSTRG : *Triticum aestivum* salt tolerance-related gene.

TBE : Tris, Borate, EDTA.

TP : tampon.

Liste des figures

Figure 1 : Organisation du génome du blé hexaploïde <i>Triticum aestivum</i> L.....	1
Figure. 2 : Vue d'ensemble de la diversification des blés <i>Triticum</i>	5
Figure3 : Les différents étapes de la méthode Serial analysis of gene expression (SAGE).....	10
Figure 4 : schéma représentatif de la technique Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS).....	11
Figure 5 : la technique Differential Display.....	12
Figure 6 : l'approche cDNA- AFLP.....	13
Figure 7 : Changements induits par les stress abiotiques dans la majorité des voies métaboliques du blé	18
Figure 8 : Vérification de la qualité d'extraction d'ARN des racines et des feuilles sur un gel d'agarose de 1% à 130 v.....	30
Figure 9 : vérification de la digestion enzymatique par DNase sur un gel d'agarose de 1% à 100v.....	31
Figure 10 : Vérification de l'expression du gène <i>TaSTRG</i> dans les racines et des feuilles sur un gel d'agarose de 1.7 % à 130 v.....	32
Figure 11 : vérification de l'expression du gène β -Actin dans les racines et des feuilles sur un gel d'agarose de 1.7 % à 130 v.....	33

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les différentes espèces et sous espèces appartenant au genre <i>Triticum</i>	3
Tableau 2 : Formules génomiques et niveaux de ploïdies des espèces du genre <i>Aegilops</i>	6
Tableau 03 : Liste des espèces d' <i>Aegilops</i> considérées comme sources potentielles de résistance aux stress abiotiques.....	8
Tableau 4 : Gènes utilisés dans l'amélioration du blé.....	16
Tableau 5 : Principales caractéristiques de lignées étudiées.....	23

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Chapitre I : Revue Bibliographique

Introduction

1. Génomique du blé	1
1.1 Organisation du génome de blé	1
1.2 Evolution des espèces du blé	2
1.3 Origine des génomes du blé	3
2. Génomique d' <i>Aegilops</i>	5
3. Génome du blé et d' <i>Aegilops</i> : Affinité de croisements	6
4. La transcriptomique	8
4.1 Approches de la transcriptomique	9
4.1.1 Le séquençage des EST	9
4.1.2 SAGE	10
4.1.3 MPSS	11
4.1.4 Differential Display	12
4.1.5 cDNA-AFLP	13
4.1.6 Les puces à ADN	14
4.2 Application de la transcriptomique pour caractériser la réponse aux stress abiotiques.....	14
5. Gènes utilisés dans l'amélioration du blé	15
6. Changement du proteome de blé en conditions de stress hydrique et salin	17
6.1 Changement du protéome du blé en condition de stress salin	17
6.2 Changement du proteome du blé sous stress hydrique	19
7. Les étapes de la désignation d'un gène candidat	20
7.1 Les principaux outils d'annotation	20

Chapitre II : Matériel et Méthodes

1. Matériel végétal	23
2. Démarche expérimentale	23
2.1 Mise en germination	24
2.2 Application des stress hydrique et salin avec du PEG et NaCl	24
2.3 Extraction d'ARN total au TRIzol et purification	25
2.4 Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ADN en solution	26
2.5 Contrôle de la qualité des ARN totaux par électrophorèse	26
2.6 Synthèse de la cDNA par transcription inverse	27
2.7 PCR (polymerase chain reaction ou réaction de polymérase en chaîne)	27

Chapitre III : Résultats et Discussion

1. Mise en germination	29
2. Quantification des ARNs totaux	29
3. Qualité d'extraction des ARNs totaux	29
4. Digestion d'ADN génomique avec DNase	30
5. Synthèse de l'ADNc	31
6. L'expression des gènes	31
7. Recherche <i>in silico</i> de gènes homologues	33

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

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

La production annuelle du blé à travers le monde est d'environ 671 million de tonnes couvrant 215 millions d'hectares de la superficie totale cultivée (FAO, 2012). Il est estimé que la demande en blé augmentera à 60% en 2050. Cependant les facteurs de stress biotiques et abiotiques peuvent causer une baisse de la production d'environ 29% (Manickavelu et *al.*, 2012)

Le blé cultivé dans les pays à climat méditerranéen, caractérisé par une période d'augmentation de la température couplée par une baisse de précipitation, subit une fluctuation de facteurs abiotiques affectant les conditions de croissance et de développement.

La résistance globale d'une plante au stress abiotiques apparait comme le résultat de nombreuses modifications phénologiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires qui interagissent pour permettre le maintien de la croissance, du développement et de la production (Hsissou, 1994).

Grace aux progrès réalisés dans le domaine de la génomique, les scientifiques sont capables de connaître les gènes qui interviennent dans la tolérance des plantes aux contraintes abiotiques.

La génomique fonctionnelle s'intéresse à l'ensemble des transcrits et des protéines. Elle étudie les méthodes d'analyses de l'expression des gènes et des protéines. En comparant l'expression des gènes ou protéines, au sein d'un même organisme et sous diverses conditions de croissance, il est possible de prédire la fonction des gènes induits (De Leonardis et *al.*, 2007)

Zhou et *al.*, (2009) ont pu étudier la variation quantitative de la protéine *TaSTRP* en condition de stress abiotique, et de mettre en évidence un gène annoté *TaSTRG* (*Triticum aestivum* Stress Tolerant Related Gene), ce gène qui est induit par le sel et le PEG confère aux géotypes un niveau de tolérance élevé à la sécheresse et à la salinité.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence l'expression du gène *TaSTRG* chez les lignées recombinantes du croisements interspécifiques blé dur X *Aegilops geniculata*, sous conditions de stress hydrique induit par le PEG et stress salin induit par le NaCl, par la méthode de RT-PCR semi quantitative.

1. Génomique du blé

1.1. Organisation du génome de blé

Le génome du blé est structuré en 21 paires chromosomiques regroupées en sept groupes homéologues représentant les génomes de chaque ancêtre, ce qui donne la formule $2n=4x=28$, pour le blé dur et $2n=6x=42$ pour le blé tendre. X étant le nombre chromosomique de base, c'est le nombre de chromosomes dans un génome (**Figure. 1**).

Les chromosomes de chaque génome sont appelés homologue, le terme homologue correspond à une paire de chromosome qui ont des allèles pour le même gène, à l'intérieur du génome.

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

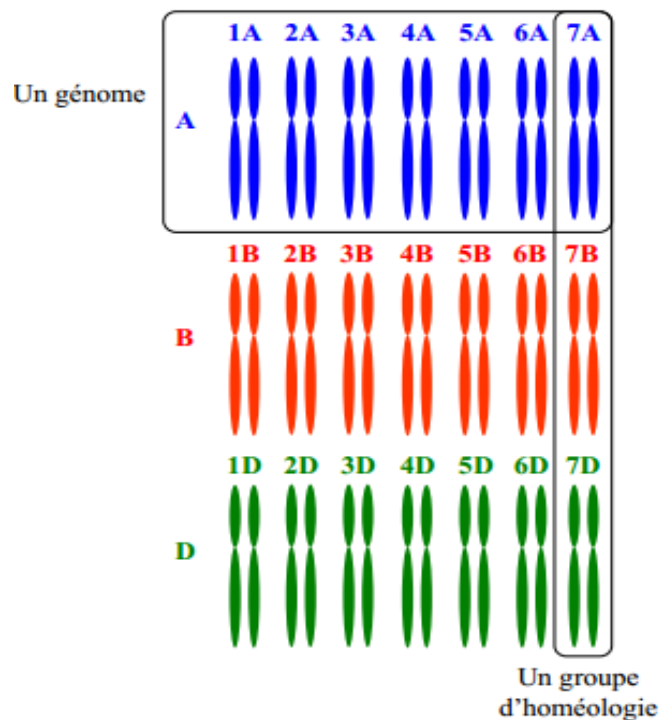


Figure1 : Organisation du génome du blé hexaploïde *Triticum aestivum* L. (Matthieu Bogard, 2012)

1.2. Evolution des espèces du blé

Le genre *Triticum* consiste en six espèces : *Triticum monococcum* L (génomé AA) ; *Triticum urartu* Tumanian ex Gandilyan (génomé AA) ; *Triticum turgidum* L (génomé AABB) ; *Triticum timopheevii* (Zhuck.) Zhuck. (génomé AAGG) ; *Triticum aestivum* L. (génomé AABBDD) et *Triticum zhukovskyi* Menabde & Ericz. (Génomé AAAAGG). Ces espèces sont regroupées dans trois sections : la Section des Monococcon (Comprenant les espèces diploïdes) ; la Section des Dicoccoidea (qui englobent les espèces tétraploïdes) ; et la section des *Triticum* (qui consiste en des espèces hexaploïdes).

Parmi ces espèces, *Triticum urartu* existe seulement dans l'état sauvage, par contre *T. aestivum* et *T. zhukovsky* existe seulement dans la forme cultivée. Les autres espèces *T. monococum*, *T. turgidum*, et *T. timopheevii* ont à la fois la forme sauvage et la forme domestiquée. Toutes les espèces du genre *Triticum* sont originaires du «Croissant Fertile» du Proche-Orient, qui englobe la Méditerranée orientale, sud ouest de la Turquie, le nord de l'Irak et l'ouest de l'Iran, et ses régions voisines de la Transcaucasie et le nord de l'Iran.

Tableau 1 : Les différentes espèces et sous espèces appartenant au genre *Triticum*

(http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/GrainTax/index.shtml)

Espèce	Génome	Autre appellation
Diploïdes :		
<i>Triticum monococcum</i>		<i>Triticum monococcum</i>
<i>ssp. monococcum</i>	A ^m	<i>Triticum boeoticum</i>
<i>ssp. aegilopoides</i>	A ^u	
<i>Triticum urartu</i>	A ^u	
Tétraploïdes :		
<i>Triticum turgidum</i>		
<i>ssp. durum</i>	BA ^u	<i>Triticum durum</i>
<i>ssp. dicoccoides</i>	BA ^u	<i>Triticum dicoccoides</i>
<i>ssp. dicoccon</i>	BA ^u	<i>Triticum dicoccon</i>
<i>ssp. carthlicum</i>	BA ^u	<i>Triticum carthlicum</i>
<i>ssp. turanicum</i>	BA ^u	<i>Triticum turanicum</i>
<i>ssp. polonicum</i>	BA ^u	<i>Triticum polonicum</i>
<i>ssp. paleocolchicum</i>	BA ^u	<i>Triticum karamyshevii</i>
<i>Triticum timopheevii</i>		
<i>ssp. timopheevii</i>	GA ^u	<i>Triticum timopheevii</i>
<i>ssp. armeniacum</i>	GA ^u	<i>Triticum araraticum</i>
Héxaploïdes :		
<i>Triticum aestivum</i>		
<i>ssp. aestivum</i>	BA ^u D	<i>Triticum aestivum</i>
<i>ssp. compactum</i>	BA ^u D	<i>Triticum compactum</i>
<i>ssp. macha</i>	BA ^u D	<i>Triticum macha</i>
<i>ssp. spelta</i>	BA ^u D	<i>Triticum spelta</i>

<i>ssp.sphaerococcum</i>	BA ^u D	<i>Triticum sphaerococcum</i>
<i>ssp. vavilovii</i>	BA ^u D	<i>Triticum vavilovii</i>
<i>Triticum zhukovsky</i>	GA ^m A ^u	

1.3. Origine des génomes du blé

Le blé tendre ($2n=6x=42$) a émergé à partir de deux événements de croisements interspécifiques, qui ont eu lieu entre trois espèces diploïdes distinctes. Il est supposé que *Triticum urartu* (donneur du génome A), qui est étroitement lié à *Triticum monococcum* et *Aegilops speltoides* (donneur du génome B), ont participé dans le premier événement d'hybridation qui a donné lieu à la formation du *Triticum turgidum* ($2n=4x=28$, AABB). Le blé tendre est le résultat de la deuxième hybridation qui a eu lieu entre *T. turgidum* et *Aegilops tauschii* donneur du génome D (Dvorak et Akhunov, 2005).

L'alloploidisation par hybridation avec une espèce du genre *Aegilops* était la force majeure menant à la diversification au cours de l'évolution des espèces du genre *Triticum* (Tsunewaki 2009). Les espèces du génome diploïde AA, *T. monococcum* et *T. urartu* ont divergé il ya moins d'un million d'années (Huang et al., 2002). Des études basées sur la morphologie, la cytologie et la génétique suggèrent qu'après la divergence de *T. monococcum* et *T. urartu*, le génome des espèces tétraploïdes AABB et AAGG a évolué il ya moins de 0.5 millions d'années par hybridation entre *T. urartu* avec une espèce qui appartient à une lignée des espèces de blé sauvages courantes, *Aegilops speltoides* Tausch (génome SS). Dans ce processus, au moins deux événements d'hybridation indépendants sont censés avoir eu lieu : une associée avec l'origine de *T. turgidum* (génome AABB) et l'autre avec l'origine de *T. timopheevii* (génome AAGG), (Sarkar et Stebbins, 1956, Shands et Kimber, 1973, Chapman et al., 1976, Dvorak, 1976, Dvorak et al., 1988, 1993, Ogihara et Tsunewaki, 1988, Noda et Ge, 1989, Dvorak et Zhang, 1990, Miyashita et al., 1994, Huang et al., 2002 et Kilian et al., 2007a. In : Matsuoka, 2011)

La genèse des espèces tétraploïdes ayant le génome AABB et AAGG a préparé le terrain pour de plus amples diversification par spéciation allopolypléide quelques centaines de milliers d'années plus tard. Pendant le développement de l'agriculture dans le croissant fertile il ya 10,000 années, *T. turgidum* et *T. timopheevii* ont été domestiqués et leurs formes cultivées sont apparus (Feldman 2001, Salamini et al., 2002). Le diploïde *T. monococcum* a été également domestiqué dans la même zone. Après cette période, le blé hexaploïdes *Triticum aestivum* a émergé par hybridation naturelle entre les cultivars tétraploïdes et l'espèce diploïde *Aegilops* et les espèces du genre *Triticum*. *T. aestivum* (génome AABBDD) a surgi à travers hybridation entre *T. turgidum* et les espèces du blé sauvages *Aegilops tauschii* Coss. (génome DD) (Kihara 1944, McFadden and Sears 1944). *T. zhukovskyi* (génome AAAAGG) est le résultat d'une hybridation entre *T. timopheevii* avec un engrain cultivé *T. monococcum* en Transcaucasie. In : Matsuoka, 2011. (**Figure. 2**).

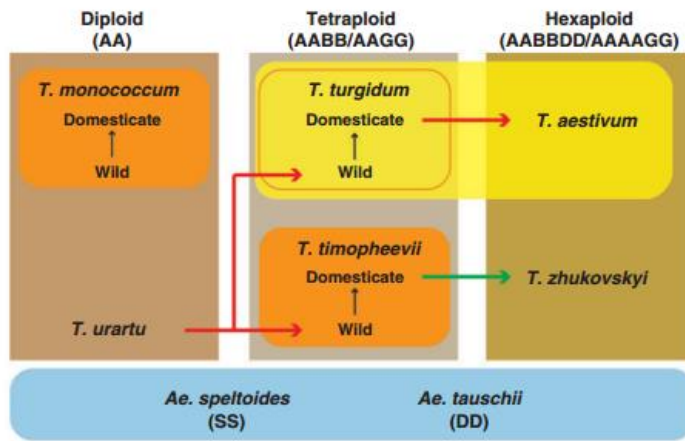


Figure. 2 : Vue d'ensemble de la diversification des blés *Triticum*.

Les flèches rouges indiquent les événements d'allopolyploïdisation dont les espèces d'*Aegilops* représenté en bas sont impliquées, tandis que la flèche verte indique l'événement d'allopolyploïdisation dont les espèces du genre *Triticum* sont impliquées. Les flèches noires verticales indiquent les événements de domestication.

2. Génomique d'*Aegilops*

Quezel et Santa (1962) décrivent le genre comme suit : « Epis 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. »

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

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

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

Tableau 2 : Formules génomiques et niveaux de ploïdies des espèces du genre *Aegilops*. In : Boutebba, (2013)

section <i>Aegilos</i>	espèces diploïdes	génomés	Espèces tétraploïdes	génomés	Espèces hexasploïdes	Génomés
<i>Aegilops L.</i>	<i>Ae.umbellulata</i>	U	<i>Ae. Biuncialis</i> <i>Ae.columnaris</i> <i>Ae.geniculata</i> <i>Ae.kotschy</i> <i>Ae.neglecta ssp</i> <i>Ae.peregrina</i> <i>Ae. triuncialis</i>	UM UM MU SU UM SU UC	<i>Ae.neglecta ssp.recta</i>	UMN
Comopyrum (Jaub et Spach) Zhuk.	<i>Ae. comosa</i> <i>Ae.uniaristata</i>	M N	<i>Ae.cylindrica</i>	DC		
Cylindropyron (Jaub et Spach) Zhuk.	<i>Ae.markgrafii</i>	C				
Sitopsis(Jaub et Spach) Zhuk .	<i>Ae.bicornis</i> <i>Ae.longissima</i> <i>Ae.sharonensis</i> <i>Ae.searsii</i> <i>Ae.speltoides</i>	Sb SI Ssh Ss S				
Vertebrata Zhuk. emend. Kihara	<i>Ae. tauschii</i>	D	<i>Ae.crassa ssp</i> <i>Ae. venricosa</i>	DM DN	<i>Ae.crassa ssp. (6x)</i> <i>Ae.vavilovii</i> <i>Ae .juvenalis</i>	DDM DMS DMU
Subgenus Amblyopirum	<i>Ae.mutica</i>	T				

3. Génome du blé et d'*Aegilops* : Affinité de croisements

Les genres *Triticum* et *Aegilops* appartiennent à un complexe d'espèces sauvages et domestiquées, dont les membres allopolyploïdes se sont évolués par spéciation des hybrides (Kimber & Sears, 1987).

Le pool génétique primaire du blé comprend tout le matériel appartenant à l'espèce *T. aestivum*.

Le pool génétique secondaire est composé de tous les autres blés (2X, 4X, 6X), les progéniteurs du blé tendre et les *Aegilops* qui possèdent au moins un génome homologue de ceux du blé tendre.

Les études caryologiques de (Kihara, 1937) et (Sears, 1941), sur plusieurs espèces d'*Aegilops* ont démontré que leur nombre chromosomique ($x=7$) est le même que celui du blé.

Kimber (1988), distingue parmi les espèces polyploïdes d'*Aegilops* et de *Triticum* trois groupes dont chacun d'eux renferme des espèces polyploïdes ayant un génome en commun, appelé génome « pivot » (A, U ou D) qui a peu changé par allopolyploïdisation et par spéciation (Zohary & 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 & Yen, 1988). L'hybridation est facilitée par le génome commun, qui agit comme un tampon, assurant ainsi une certaine fertilité dans les hybrides résultants. Les génomes différenciés qui proviennent de parents différents peuvent échanger leurs matériels génétiques et former des génomes recombinés (Zaharieva & Monneveux, 2006)

L'existence, chez les espèces sauvages apparentées au blé, d'un important réservoir de gènes utiles est évidente si l'on prend en compte l'adaptation de ces diverses espèces à des environnements très différents, on les rencontre dans une multitude de climats allant des montagnes froides et humides, jusqu'aux vallées chaudes et sèches. Elles sont porteuses de nombreux gènes à fort potentiel économique qui interviennent dans les caractères tels que la résistance aux maladies, la tolérance au froid, la tolérance à la salinité, la résistance à la sécheresse et la qualité des protéines de réserves (**Tableau 3**)

Tableau 03 : Liste des espèces d'*Aegilops* considérées comme sources potentielles de résistance aux stress abiotiques. In : Zadri, (2009)

Stress abiotiques	Espèces	Génomes	Références
Stress salin	<i>Ae. tauschii</i>	D	Farook et al., 1989 ; Gorham 1990 ; Xu et al., 1993 ; Farook, 1994
	<i>Ae. comosa</i>	M	
	<i>A. umbellulata</i>	U	
	<i>Ae. cylindrica</i>	CD	
	<i>Ae. neglata</i>	UM	
	<i>Ae. triuncialis</i>	UC	
	<i>Ae. Kotschy</i>	SU	
	<i>Ae. crassa</i>	DDM	
	<i>Ae. juvenalis</i>	DMU	
	<i>Ae. vavilovii</i>	DMS	
Froid	<i>Ae. tauschii</i>	D	Barashkova, 1981 ; Limin & fowler, 1981 ; Barashkova & vavilov, 1991.
	<i>A. umbellulata</i>	U	
	<i>Ae. cylindrica</i>	CD	
	<i>Ae. neglata</i>	UM	
	<i>Ae. triuncialis</i>	UC	
Déficit hydrique	<i>Ae. tauschii</i>	D	Mayoral et al., 1981; Shimshi et al., 1993; Rekika et al., 1995.
	<i>Ae. sharonensis</i>	SI	
	<i>Ae. longissima</i>	SI	
	<i>Ae. Kotschy</i>	SU	
	<i>Ae. geniculata</i>	MU	
	<i>Ae. triuncialis</i>	UC	

4. La transcriptomique

Les approches transcriptomiques offrent une analyse compréhensive de l'expression des gènes dans une cellule, contrairement au génome d'un organisme qui est hautement stable, le transcriptome est dynamique puisque les changements de l'ARNm dépendent du stade de développement et des conditions environnementales.

L'hybridation northern est la technique la plus ancienne de l'étude du profile transcriptomique, dans laquelle une sonde marqué est hybridé avec un ARN ciblé. Ensuite, la Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) a été développé comme technique robuste, rapide et reproductible pour la quantification de l'expression de gène singulier. Les avancées réalisées dans la génomique permettent la mesure des niveaux de transcrit de milliers de gènes à la fois. Ces approches de transcriptomique à haut débit peuvent être groupées en deux catégories.

- La première approche rend l'analyse directe des niveaux de transcription déduits à partir du séquençage de nucléotide et la mesure des fragments. L'exemple de ces techniques utilisant le séquençage de nucléotide est : EST, SAGE, et la MPSS, le cDNA-AFLP repose sur la taille des fragments.

- Dans la deuxième catégorie, l'expression du gène est indirectement évaluée dans des puces à ADN en utilisant le principe de l'hybridation du mRNA ou cDNA. (Lee et *al.* , 2004 ; Koh et *al.* , 2007)

4.1. Approches de la transcriptomique

4.1.1. Le séquençage des EST

Le séquençage des fragments du cDNA ou EST à grand échelle est une méthode rapide pour la découverte de nouveaux gènes et d'évaluer leurs niveaux d'expression dans un tissu particulier. Dans cette approche, des séquences de 300-500 pb à partir d'une ou deux extrémités sont déterminées à partir de clones de cDNA, choisis aléatoirement de divers tissues. Les ressources d'EST sont disponibles dans des bases de données publique (NCBI et TIGR gene indices). Les ressources d'EST sont précieuses pour la découverte de gènes, le développement de marqueurs moléculaires et pour l'analyse de l'expression des gènes pour les espèces qui n'ont pas une séquence génomique complète disponible.

Les séquences complètes des ADNc sont utilisées pour l'annotation des génomes, l'identification des jonctions exons - introns, les variant d'épissage et les gènes d'ARN antisense qui pourrait jouer un rôle dans la régulation des gènes.

La comparaison de la fréquence de l'occurrence des EST dans différents types de tissues sous différentes conditions environnementales ou différents stades de développements peut donner une évaluation préliminaire du profil d'expression d'un gène.

4.1.2. SAGE

Serial analysis of gene expression (SAGE) est une méthode basée sur la similarité des séquences comme le séquençage des EST (Donson et *al.*, 2002). C'est une technique à haut débit et à coût réduit pour une évaluation et comparaison des gènes exprimés. Dans cette technique, 10 à 14 pb d'étiquètes à partir d'une position unique au sein de chaque espèce d'ARNm est extraite, concentré et cloné avant séquençage. Ces étiquètes sont utilisées pour identifier les gènes correspondant dans la base de données (**Figure3**).

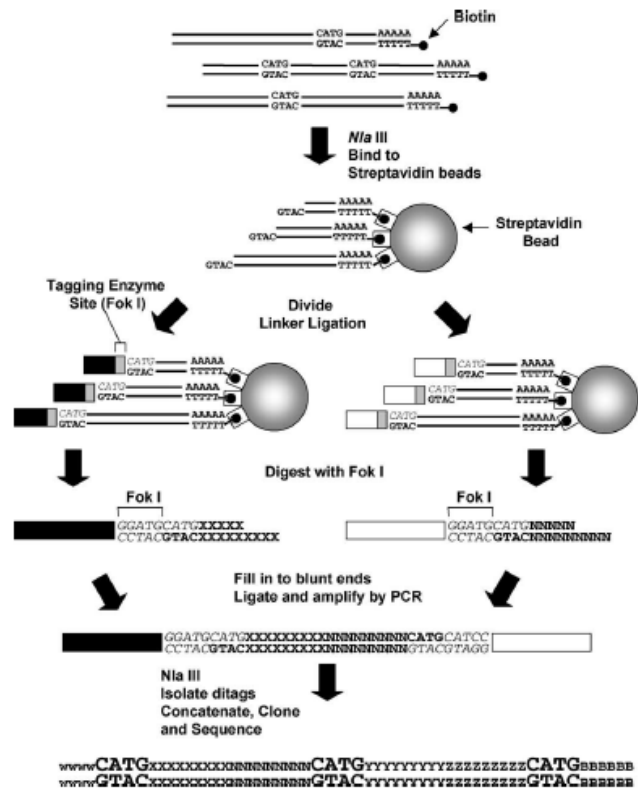


Figure3: Serial analysis of gene expression (SAGE). In: David J. Leader, (2004)

4.1.3. MPSS

Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS), développée par Lynx Therapeutics Inc. Californie, est une technique puissante pour l'étude du profil de transcription sur une grande échelle du génome (Meyers *et al.*, 2004). Elle implique le clonage de molécules de cDNA individuelles dans des microbilles et de les séquencer, en parallèle, de courtes étiquètes à partir de ces ADNc (**Figure 4**).

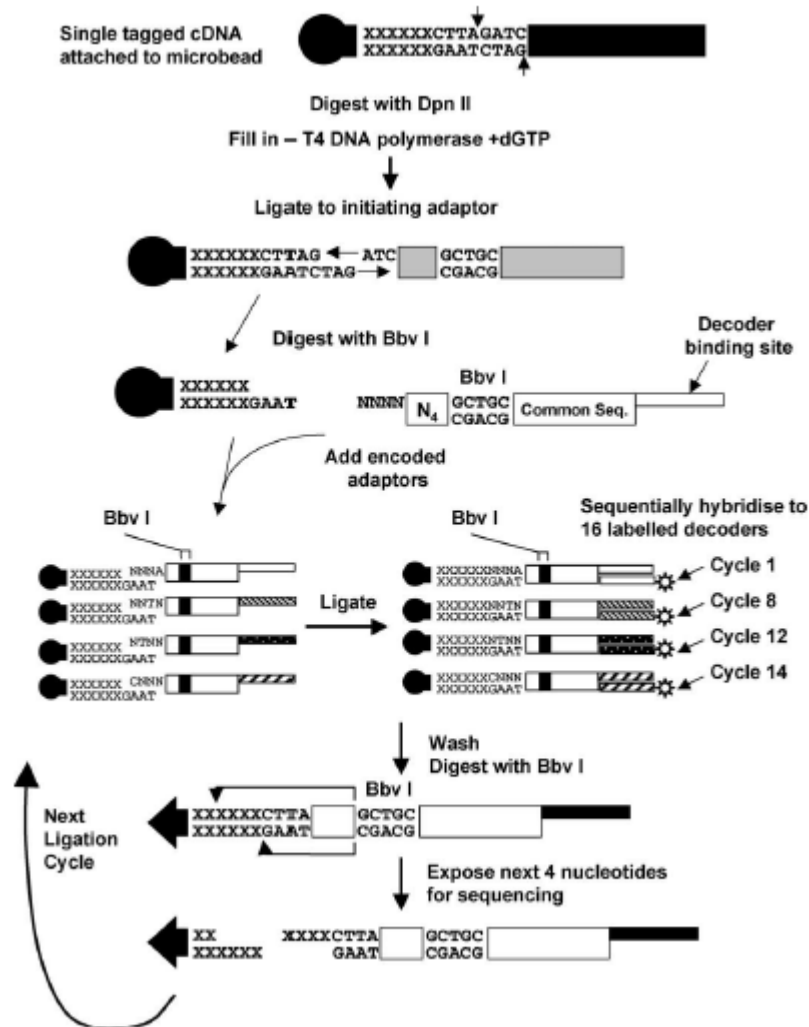


Figure 4 : Massively Parallel Signature Sequencing (MPSS) (Brenner *et al.* , 2000)

4.1.4. Differential Display

La méthode Differential display (Velculescu et *al.*, 2000) discrimine la population d'ARNm par une séparation différentielle des fragments de cDNA représentatifs. Elle comprend quatre étapes : (1) la transcription inverse des mRNA avec des amorces oligo-dT ancrées, (2) l'amplification des ADNc avec des amorces arbitraires, (3) séparation des ADNc amplifiés dans un gel de polyacrylamide et (4) l'isolation des fragments exprimés différemment à partir du gel suivi par un séquençage (**Figure 5**).

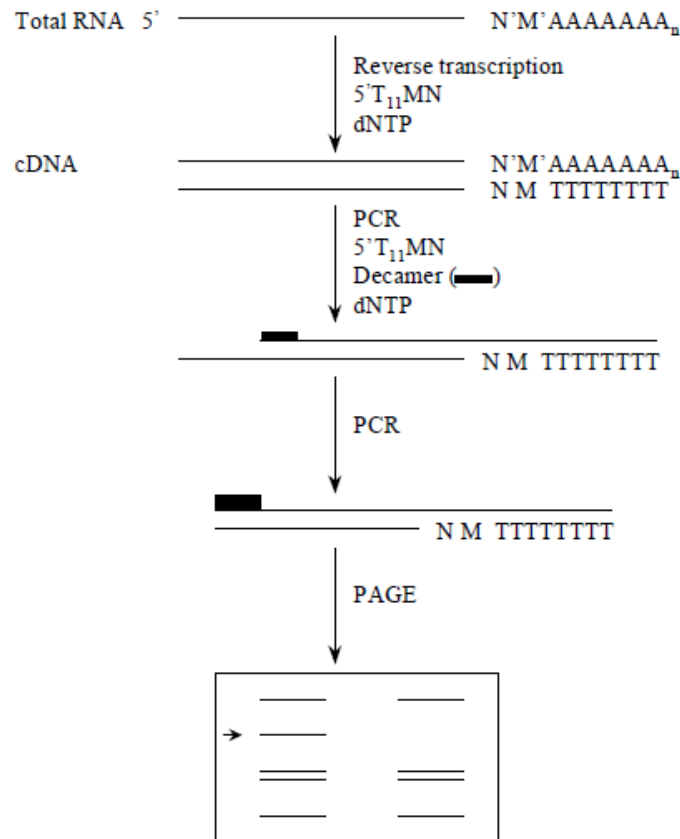


Figure 5 : la technique Differential Display. In: David J. Leader, (2004)

Bien que cette méthode est une alternative rentable pour la découverte des gènes et qui a été largement utilisé par les scientifiques dans les plantes, elle a une utilité limitée comme un outil d'étude du profil des transcrits. (Lee et al . , 2004).

4.1.5. cDNA-AFLP

cDNA-AFLP (amplified fragment length polymorphism) est une amélioration par rapport à la technique, due à la ligation des adaptateurs aux fragments de restriction et l'utilisation d'amorces spécifiques, sous amplification PCR en conditions strictes (Brenner et *al.* , 2000). Une variante de cette technologie qui utilise une seule enzyme de restriction a été développé (Liang et *al.*, 1992). cDNA AFLP est très populaire

due à sa reproductibilité améliorée, sa sensibilité, et sa bonne corrélation avec les analyses northern. De plus, l'augmentation du débit et l'automatisation ont été possible par l'utilisation de marquage fluorescent, et l'électrophorèse capillaire (Bachem et *al.*, 1996). Il a été modifié pour suivre un fragment de restriction pour chaque ADNc (Habu et *al.*, 1997). Elle permet un suivi systématique du transcriptome en utilisant des fragments d'amplifications sélectifs (**Figure 6**).

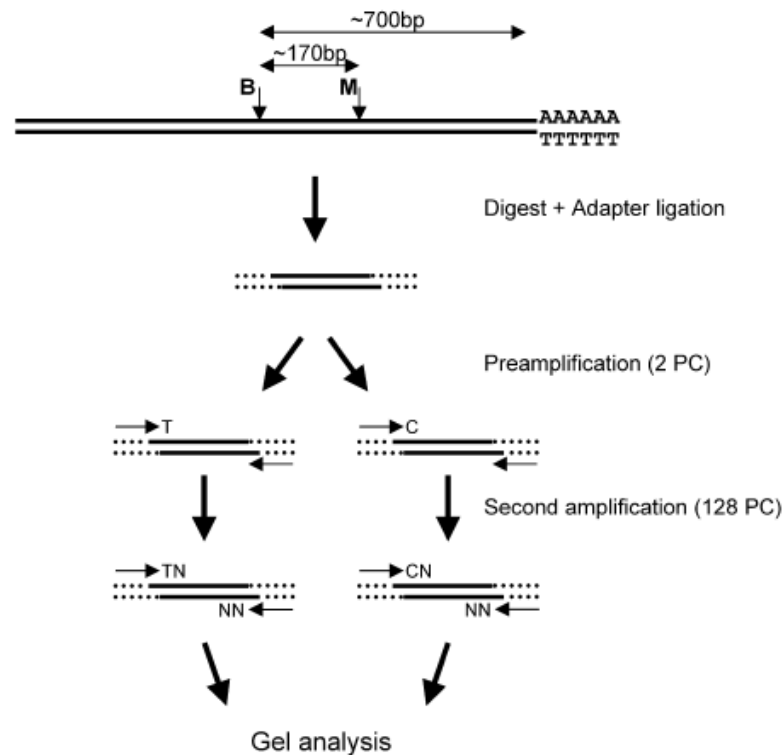


Figure 6 : l'approche cDNA- AFLP. In: David J. Leader, (2004)

4.1.6. Les puces à ADN

La puce à ADNc fonctionne en utilisant la capacité d'une molécule d'ARNm donné à se lier spécifiquement, à son séquence d'ADN codante originale sous la forme de matrice d'ADNc repérée sur une puce. Ces expériences impliquent l'hybridation de deux échantillon d'ARNm, dont chacun a été convertis en ADNc et étiqueté avec son propre colorant fluorescent (à savoir, un colorant fluorescent rouge, Cyanine 5 (Cy5), et un colorant fluorescent vert, Cyanine 3 (Cy 3)), sur une lame de verre unique qui a été repéré avec plusieurs milliers de sondes d'ADNc. En raison de la compétitivité de la liaison entre les deux échantillons, le rapport des intensités entre la fluorescence rouge et verte pour chaque spot est une indication de l'abondance relative des sondes d'ADN correspondantes dans les deux échantillons (Finkelstein et *al.*, 2002) .

4.2. Application de la transcriptomique pour caractériser la réponse aux stress abiotiques

Plusieurs bases de données stockent les informations concernant les EST des plantes et les gènes caractérisés [National Center for Biotechnology information (NCBI) Unigenes, [http : //www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) ; L'institut des recherche génomiques (TIGR) Gene indices, [www. tigr.org](http://www.tigr.org) ; Sputnik, <http://www.sputnik.org>].

// mips.gsf.de/proj/ sputnik], qui ont été la base de la découverte des gènes et de l'étude de l'expression globale des gènes en relation aux stress abiotiques.

Le séquençage des EST a été appliqué pour analyser la réponse aux stress salin, hydrique, froid dans le riz. Beaucoup d'entre ces EST qui répondent aux stress se chevauchent avec les séquences induites par les stress abiotiques obtenu à partir des études du profil d'expression dans l'*Arabidopsis*, l'orge, le maïs et le riz (Hughes et al., 2000). Plusieurs efforts de séquençage des EST à grande échelle dans le blé et ces proches parents fournissent des informations utiles à propos du transcriptome sous conditions de stress abiotiques à des stades de développement différent (Vij et al., 2007 ; Ramalingam et al., 2006).

Les analyses structurales et fonctionnelles du génome du blé basées sur les EST aboutissent à l'identification de 278 EST en relation aux stress abiotiques (froid, chaleur, sécheresse, salinité, et aluminium) à partir de 7671 EST cartographié précédemment sur les chromosome du blé (Gorantla et al., 2007).

Le nombre élevé de loci en relation avec le stress abiotique a été trouvé dans le groupe 2 des chromosomes homologues (142 loci) et le faible nombre a été trouvé dans le groupe 6 (94 loci). Quand les EST spécifiques au génome sont considérés, le génome B montre le nombre le plus élevé des EST unique (7 loci), alors qu'aucun n'a été trouvée dans le génome D. Les analyses de l'expression digitale de l'ensemble des données des EST de blé à partir de sources différentes fournissent un aperçu des changements métaboliques et les voies spécifiques qui ont régulé sous conditions de stress dans le blé et autres céréales (Vij et al., 2007). Une comparaison entre les EST de deux génotypes d'amidonier sauvage l'un tolérant à la sécheresse et l'autre sensible avec une variété de blé moderne ont indiqué à la fois une ressemblance aussi bien que différents profils d'expression entre les génotypes (Houde et al., 2006).

Prasanta K. Subudhi, (2011) ont conclu que les génotypes de blé dur et tendre diffèrent dans leur réponse transcriptionnelle au stress hydrique, en utilisant les puces à ADN, peut être influencé par le nombre large de gènes localisés dans le génome D. Dans d'autres études, plusieurs nouveaux gènes candidats responsables de la tolérance aux stress hydrique et salin ont été identifiés chez le blé.

5. Gènes utilisés dans l'amélioration du blé

L'amélioration pour la tolérance au stress hydrique peut être obtenue par l'introduction de gènes et de QTLs en relation avec la sécheresse aux cultivars du blé moderne. Par conséquent, l'identification de molécules candidates ou de loci impliqués dans la tolérance à la sécheresse est nécessaire, ce qui est entrepris par les approches dites "omiques" et la cartographie des QTLs. Dans ce sens, les variétés des espèces sauvages apparentées, spécifiquement l'amidonier sauvage (*T. dicoccoides*), sont hautement tolérants à la sécheresse (**tableau 4**). Avant leurs introductions aux cultivars du blé moderne, les gènes en relation avec la sécheresse sont d'abord caractérisés sur le plan moléculaire, et leur fonction est confirmée via des études de transgénèse. Après intégration des loci qui gouvernent la tolérance, des essais sur des environnements ciblés

sont performés avec des analyses extensives des caractéristiques morphologiques et physiologiques des cultivars développés, afin d'évaluer leurs performances sous les conditions de stress (Hikmet et *al.*, 2013) .

Tableau 4: Gènes utilisés dans l'amélioration du blé. (Hikmet et *al.*, 2013)

Gène	Fonction	Stress	Référence
<i>TaPIMP1</i>	Facteur de transcription	Hydrique	Liu et <i>al.</i> , 2011
<i>TaSRG</i>	Facteur de transcription : <i>Triticum aestivum</i> Salt response gene	Hydrique	He et <i>al.</i> , 2011
<i>TaMYB3R1</i>	Facteur de transcription :	Hydrique	Cai et <i>al.</i> , 2011
<i>TaNAC</i>	Facteur de transcription	Hydrique	Tang et <i>al.</i> , 2012
<i>TaMYB33</i>	Facteur de transcription	Hydrique	Qin et <i>al.</i> ,2012
<i>TaWRKY2</i> , <i>TaWRKY19</i>	Facteur de transcription	Hydrique	Niu et <i>al.</i> , 2012
<i>TdicDRF1</i>	Facteur de transcription	Hydrique	Lucas et <i>al.</i> , 2011
<i>TaABC1</i>	Facteur de transcription	Hydrique	Wang et <i>al.</i> , 2011
<i>TaSnRK2.4</i>	Kinase	Hydrique	Mao et <i>al.</i> , 2010
<i>TaSnRK2.7</i>	Kinase	Hydrique	Zhang et <i>al.</i> , 2011
<i>TdTMKP1</i>	Kinase	Hydrique	Zaidi et <i>al.</i> , 2010
<i>TaCHP</i>	Phosphatase	Hydrique	Li et <i>al.</i> , 2010
<i>TaCP</i>	CHP rich zinc zinc finger protein avec fonction inconnue	Voie dépendante et indépendante de l'ABA	Zang et <i>al.</i> , 2010
<i>TaEXPR23</i>	Degradation des protéines : cystéine protease	Hydrique	Han et <i>al.</i> , 2012
<i>TaL5</i>	L'expansion des cellules de la paroi: Expansine	La capacité de rétention de l'eau et le potentiel osmotique	Kang et <i>al.</i> , 2012
<i>TdPIP1 ;1</i> , <i>TdPIP1 ;2</i>	Transport nucléocytoplasmique de	Hydrique	Ayadi et <i>al.</i> , 2011

	l'ARN ribosomique 5S: gène L5 ribosomal		
<i>TdicATG8</i>	Proteine protective : Aquaporine	Hydrique	Kuzuoglu- Ozturk et <i>al.</i> , 2012
<i>TdicTMPIT1</i>	L'autophagie: autophagie gène 8	Hydrique	Lucas et <i>al.</i> , 2011
<i>Eral, Sal1</i>	L'autophagie: intégrante protéine transmembranaire inductible par TNF α		Manmathan et <i>al.</i> , 2013

6. Changement du proteome de blé en conditions de stress hydrique et salin

6.1 Changement du protéome du blé en condition de stress salin

La salinité, est considérée comme étant le plus répandu et unique problème de toxicité du sol limitant la production agricole globale, la concentration excessive d'ion Na⁺ confère deux contraintes osmotiques et ioniques aux cellules de la plante. En plus, le stress salin réduit d'une façon significative les taux de photosynthèse et de transpiration, la conductance des stomates, le contenu relatif de l'eau, et les niveaux de Chl a et b, aussi les niveaux de la proline ont augmenté. (Chaves et al., 2009).

Le stress salin induit une baisse des niveaux de la *RuBisCO*, un déplacement des cations critiques à partir des structures endomembranaires, l'enflure et la désorganisation du grana conduit à une photosynthèse réduite (Peng et al., 2009). En plus, les concentrations élevées des ions Na⁺ peuvent directement affecter la conductance des stomates en réduisant la turgescence des cellules de garde et la pression intercellulaire partielle du CO₂ (Kamal et al., 2012a).

Un nombre de techniques de la proteomique a été utilisé pour identifier les changements induits par la salinité et ainsi avoir un aperçu sur la réponse du blé en conditions de stress salin (Wang et al., 2008; Peng et al., 2009; Gao et al., 2011). L'impact du stress salin sur les modes d'expressions des protéines dans les chloroplastes de blé a été suivi par une électrophorèse bi-dimensionnelle, couplée avec la technique (LTQ-FTICR) hybridé avec MS (Kamal et al., 2012a).

La plupart des protéines différenciellement modifiés affichent une plus grande abondance après une baisse initiale lors de l'exposition au stress salin. En effet, la réaction du photosystème I des sous unités centrales II et IV, oxygen-evolving proteins (OEEs), et le complexe cytochrome b6-f (cyt b6-f) diminuée suite à l'exposition au stress salin (**Figure7**).

Parmi les protéines des chloroplastes exprimées différemment dans les plantules de blé stressé par le sel, la nucleoprotein pourrait être concernée pour le traitement des mRNAs des chloroplastes (Baginsky and Gruissem, 2002). Le stress salin a des impacts paradoxales sur le complexe du thylakoid CF1-CF0 (ATP synthase).a l’instant, l’ATP synthase (α , β , γ , et ϵ) est modulé par le stress salin dans les chloroplastes du blé (Zörb et al., 2009), mais changé de façon inégale. Les sous unités α et γ sont généralement augmenté au stade initial, alors que la sous unité ϵ diminue avec le temps. En revanche, la sous unité β a changé dynamiquement suites au stress salin dans les chloroplastes du blé (Kamal et al., 2012a).

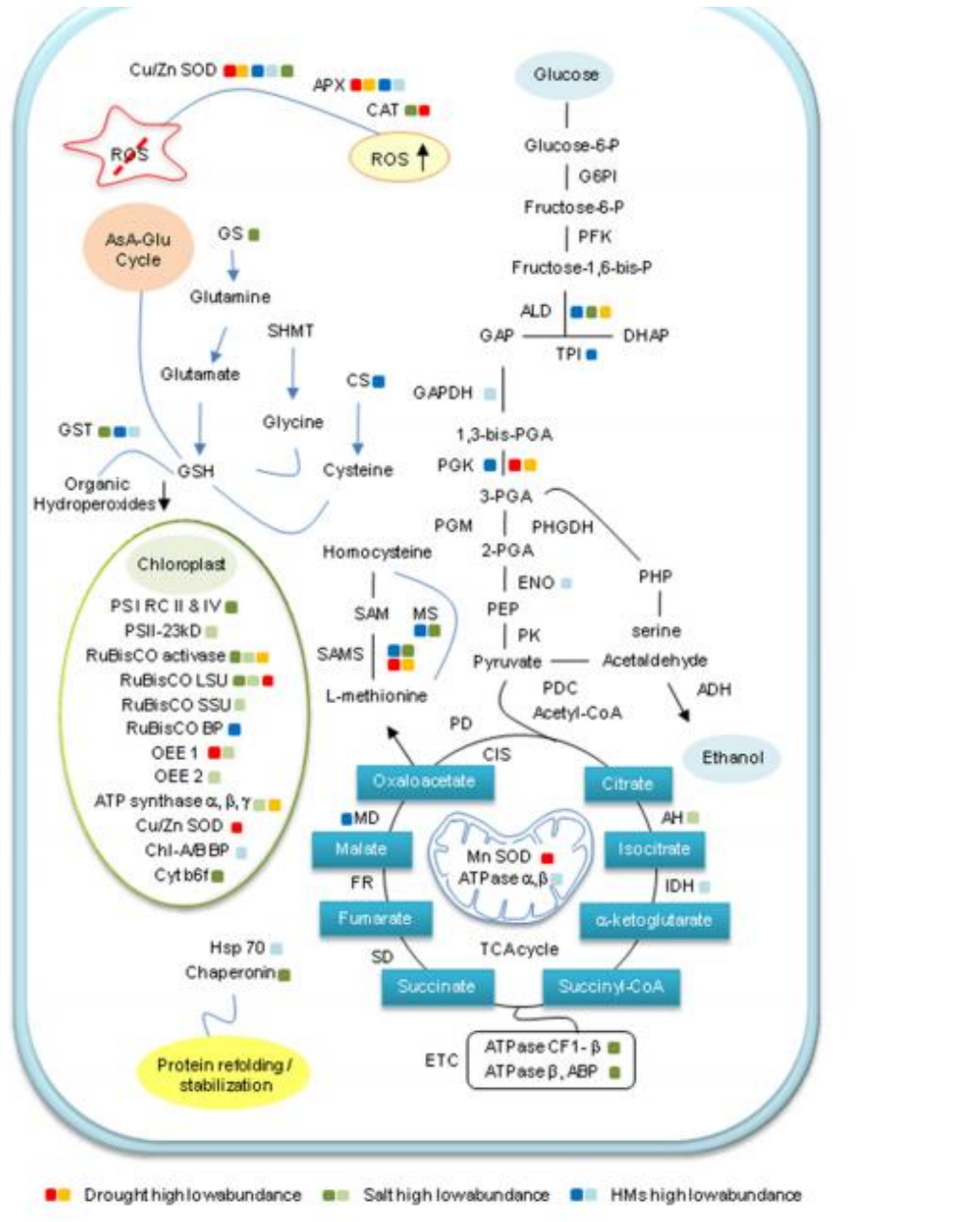


Figure 7 : Changements induits par les stress abiotiques dans la majorité des voies métaboliques du blé.

6.2 Changement du proteome du blé sous stress hydrique

La sécheresse résultante d'un déficit en eau induit le stress osmotique, qui est le facteur limitant pour la croissance des plantes, le développement et la qualité de la production (Mohammadi et *al.*, 2012). Le stress osmotique cause une réduction dans la fixation du CO₂, ainsi qu'une régénération décroissante du NADP⁺ dans le cycle de Calvin. En conséquence, la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques devient réduite, conduisant à la formation d'un excès de ROS, principalement les radicaux du superoxide et de l'oxygène singulet, qui nuisent à la fonction des protéines des chloroplastes impliquées dans la photosynthèse (Ashraf et Harris, 2013).

Les mécanismes impliqués dans la réponse au déficit hydrique ont été largement étudiés au niveau protéique en utilisant la protéomique au cours des dernières décennies. Toutefois, seulement quelques chercheurs ont étudié le proteome des chloroplastes du blé sous stress hydrique (Kamal et *al.*, 2013a). La régulation Red-ox, la réponse au stress oxydatif, la transduction du signal, repliement des protéines, le métabolisme secondaire, et les protéines en relation avec la photosynthèse sont apparues dans les chloroplastes du blé sous stress hydrique.

Les niveaux de protéines liées au métabolisme ont augmenté sous traitement par le polyéthylène glycol et sous stress salin dans les feuilles de plantules de blé, tandis que les niveaux de protéines liées à la production d'énergie et la synthèse de protéines ont diminué. Notamment, la racine est l'organe principalement initié dans la réponse à la sécheresse, comme elle affiche de plus grands changements dans l'abondance des protéines en réponse au stress hydrique (Mohammadi et *al.*, 2012).

Les protéines impliquées dans le métabolisme du carbone présentent généralement des changements marqués en réponse au déficit de l'eau (**Figure 7**). La biosynthèse de l'amidon et son accumulation dans les cellules de l'endosperme se produit principalement pendant le stade du remplissage du grain.

Le stress hydrique pendant la phase de développement du grain affecte nettement les niveaux et la composition des hydrates de carbone, la synthèse et l'accumulation des protéines de réserve, conduisant à une mauvaise qualité en grain (Jiang et *al.*, 2007).

Le stress thermique augmente souvent la conductance des stomates, la respiration, la transpiration foliaire, et le stress oxydatif (Rizhsky et *al.*, 2002), raccourcit la durée de remplissage du grain, et stimule l'accumulation du gluten et la synthèse de l'amidon (Hurkman et *al.*, 2009).

Les plantes répondent aux températures élevées par la voie de l'ABA, l'éthylène et de l'acide salicylique, la détoxification des ROS par la production des antioxydants et l'activation transcriptionnelle des protéines en relation avec le stress (Wahid et *al.*, 2007). Un certain nombre de protéines, tels que les protéines de choc thermique, du métabolisme des glucides, les protéines de réserve, ont changé dans le proteome du blé en réponse aux températures élevées.

7. Les étapes de la désignation d'un gène candidat

L'analyse explicative du génome s'est révélée beaucoup plus complexe que prévue. Après séquençage, l'objectif est d'identifier les gènes, de déterminer leur nombre, leurs limites exactes et ensuite leur fonction. Cette analyse constitue l'annotation. Malgré la grande qualité des séquences (moins d'une erreur pour 40000 nucléotides), les premiers logiciels utilisés, dérivés de l'analyse des génomes bactériens ou de levure, ne prédisent pas correctement les limites des gènes, en particulier les jonctions exon/ introns, ne font pas toujours la différence entre des exons appartenant à deux gènes adjacents ou des exons d'un même gène, ratent des phases de lecture. Enfin, au moment où la séquence complète est rendue publique, un certain nombre de propriétés du génome sont encore inconnues.

La découverte de ces nouvelles propriétés a permis d'améliorer les logiciels d'analyse. Mais la validation la plus sûre d'une prédiction reste l'expérimentation. Ainsi, chez *Arabidopsis*, le nombre de gènes est passé de 26000 à près de 30000 (Ilic *et al.*, 2007) répartis en environ 11600 familles. L'objectif a donc été de proposer une fonction pour chacun des 30000 gènes identifiés.

7.1 Les principaux outils d'annotation

La première stratégie est l'annotation automatique, à l'aide de logiciels prédictifs de la structure des gènes, intégrés sur des plateformes d'annotation qui permettent de naviguer dans les bases de données et d'utiliser tous les éléments disponibles. L'annotation est ainsi un processus dynamique, qui n'est pratiquement jamais terminé.

Deux approches complémentaires permettent d'améliorer l'annotation physique :

- La première consiste à isoler et caractériser des ADNc pleine longueur. L'observation d'une séquence transcrite prouve que la région correspondante de l'ADN est exprimée, au moins au niveau ARN. L'analyse des ADNc pleine longueur d'*Arabidopsis* ou de riz a permis de découvrir plusieurs centaines de gènes que les logiciels de prédiction n'avaient pas réussi à identifier (Seki *et al.*, 2002). Pour aller au-delà, il faut montrer qu'une protéine correspondante à un ARNm existe réellement : c'est tout l'apport de la protéomique à l'analyse des génomes. De même, les approches protéomiques ont révélé l'existence de centaines de gènes non détectés par les logiciels de prédiction ou l'analyse des ADNc (Baerenfaller *et al.*, 2008).

- Une deuxième approche est la génomique comparative, qui repose sur l'existence d'un répertoire de gènes en grande partie partagé entre tous les êtres vivants et dont la structure est assez largement conservée. Cette approche, très limitée au début, devient maintenant praticable à grande échelle en raison de l'accumulation exponentielle de séquences génomiques et d'EST. Elle a aussi nécessité la mise en place de définitions fonctionnelles des classes de gènes utilisées par l'ensemble de la communauté scientifique (Berardini *et al.*, 2004).

L'annotation fonctionnelle reste très empirique. Le premier outil est la recherche d'homologies à l'aide des logiciels d'alignement, mais une validation expérimentale reste indispensable.

Une autre approche repose sur l'existence ou la création de mutants que l'on peut compléter. On isole le gène correspondant par clonage positionnel ou étiquetage par un T-DNA ou un transposon.

Lorsque ces deux types d'approches ont échoué, il reste la possibilité de comparer le profil d'expression du gène inconnu à celui de l'ensemble des autres gènes et à déterminer s'il rentre dans l'une des catégories de profil d'expression.

On peut ainsi souvent associer un gène à un processus connu et mieux cerner sa fonction. Cette approche est devenue possible grâce à la mise en place de bases de données normalisées dans lesquelles sont archivées les expériences de puces à ADN (Zimmermann et al., 2004). On peut aussi rechercher quels sont les partenaires d'une protéine inconnue. On réussit ainsi parfois à associer un gène et sa protéine à un réseau d'interaction qui renseigne sur sa fonction. Malgré tous ces efforts, la difficulté majeure de la caractérisation fonctionnelle reste la redondance d'un grand nombre de gènes et la pauvreté de notre capacité à analyser les phénotypes.

1. Matériel végétal

Notre étude a été réalisée sur des lignées F6 (sélectionnée par la méthode bulk) issues d'une série d'autofécondation des descendants du croisement interspécifique *blé dur* (variété Oued Zenati 368) × *Aegilops geniculata* et leurs parents (Kellou. 2003), Par comparaison avec la variété *Chinese Spring* de blé tendre, qui est utilisé par la communauté scientifique comme génotype modelé pour l'établissement de la carte génétique de référence pour le séquençage du génome du blé.

Tableau 5 : Principales caractéristiques de lignées étudiées.

Nom de géotypes		Degré de ploïdie	Génome	Pays d'origine
Les parents	Oued Zenati 368	Tétraploïdes	AABB	Algeria
	<i>Ae. geniculata</i>	Tétraploïdes	UUMM	Constantine (Algeria)
Témoin <i>Triticum aestivum</i> L.	<i>Chinese Spring 08</i>	hexaploïde	AA BB DD	China
	<i>Chinese Spring 11</i>	hexaploïde	AA BB DD	China
Les hybrides	Lignée 10	Octoploïdes	AABBUUMM	Génération F6, obtenu au laboratoire GBBV (Kellou, 2003)
	Lignée 1013			
	Lignée 18			
	Lignée 1814			
	Lignée 1816			
	Lignée 1817			
	Lignée 1818			
	Lignée 1822			

2. Démarche expérimentale

Notre travail vise à étudier la surexpression du gène *TaSTRG* chez les lignées du croisement blé dur X *Aegilops geniculata* sous l'effet d'un stress hydrique à l'aide du Polyéthylène glycol PEG et d'un stress salin

à l'aide du NaCl et à les comparer à leurs parents cultivé : blé dur « variété Oued Znati » , sauvage : *Aegilops geniculata* et avec la variété *Chinese Spring* du blé tendre.

Les essais ont été réalisés au niveau du laboratoire de recherche de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales (GBBV), équipe de Biotechnologies et Amélioration des Plantes cis à Chaabet El Rasses, Université des frères Mentouri Constantine.

2.1. Mise en germination

Les graines sont stérilement pré-germées sur des boîtes de Pétri tapissées du papier humecté d'eau en raison de 10 graines par boîte. L'arrosage de ces derniers a été effectué périodiquement selon la demande de la plante.

2.2. Application des stress hydrique et salin avec du PEG et NaCl

Le Polyéthylène glycol « PEG » est un polymère non ionique hydrosoluble non permanent pour les cellules. Il est utilisé pour induire un déficit hydrique car il réduit la disponibilité en eau sans causer de dommage physique aux plantes.

Concernant l'application du stress pour étudier la tolérance aux stress abiotique, on a effectué deux lots de stress, hydrique en utilisant du PEG-6000 avec une concentration finale de 15% et salin par NaCl 200 mM.

Après l'enracinement et la germination du blé, au stade de trois feuilles les plantules de chaque hybride ont été transférées dans des boîtes de Pétries humectées d'eau avec du papier filtre pour germer les plantules à raison de deux à quatre graines dans chaque boîte et pour chaque type de stress.

Pour mettre en évidence les potentialités d'adaptation à la salinité des hybrides (blé dur X *Aegilops geniculata*) et leurs parents (témoins) en phase de croissance, un stress salin est induit par l'application d'une dose de 170 mM de chlorure de sodium (NaCl) pendant 48 heures avec un photopériodisme de 16/ 8h et une température de 25°C (Nicholas et Money 1989).

Le stress hydrique est obtenu par l'application de chocs osmotiques au niveau racinaire en remplaçant la solution nutritive par des solutions de polyéthylène glycol (PEG 6000) à une concentration de 15% pendant 48 heures et dans les mêmes conditions précédentes.

Les racines et les feuilles de chaque variété traitée par du PEG, du NaCl ainsi que le témoin sont recueillies séparément dans des tubes Ependorf de 2 ml.

Les tubes sont ensuite congelés rapidement dans l'azote liquide et stockées à -80°C pour l'extraction des ARN totaux.

2.3. Extraction d'ARN total au TRIzol et purification

L'extraction au TRIzol est une méthode générale relativement développée pour déprotéiniser l'ARN. Ce procédé est particulièrement avantageux dans des situations où les cellules ou les tissus sont enrichies en RNases endogènes ou lorsque la séparation de l'ARN cytoplasmique ou de l'ARN nucléaire est impraticable.

TRIzol (ou réactif TRI) est une solution monophasique de l'isothiocyanate de guanidinium et de phénol qui solubilise simultanément le matériel biologique et dénature la protéine. Après solubilisation, l'addition de chloroforme provoque une séparation de phase (tout comme l'extraction avec du phénol : chloroforme : alcool isoamylique), où la protéine est extraite de la phase organique, l'ADN à l'interface, et l'ARN reste dans la phase aqueuse.

L'extraction au TRIzol est aussi une méthode efficace pour isoler les petits ARN, tels que les microARN, ou endogènes et les petits ARN interférents.

Pour étudier l'expression du gène *TaSTRG*, l'extraction est faite à partir des feuilles et des racines de blé dur variété Oued Zenati, *Aegilops geniculata* et leurs huit hybrides par comparaison avec la variété *Chinese Spring* de blé tendre selon la méthode au TRIzol décrite par Chomczynski et Mackey, 1995.

Un échantillon de l'avant dernière feuille et racine de blé sont broyées dans le tube eppendorf à l'aide d'un piston en présence d'azote liquide, le broyat a été transvasé dans un nouveau tube de 2 ml et ensuite homogénéisée dans du tampon TRIzol (1 ml de TRIzol /g de matière fraîche). L'homogénat est incubé pendant 5 minutes à température ambiante pour remettre la dissociation complète des complexes nucléotidiques.

Après addition de 0.2 ml chloroforme par ml de TRIzol, traitement qui assure l'extraction des ARN, les tubes sont fermés hermétiquement et agités vigoureusement à l'aide d'un vortex pendant 15 secondes puis laissés à température ambiante pendant 5 minutes.

Les solutions sont transférées dans des tubes Ependorf, qui sont centrifugés à 13000 rpm pendant 15 min à 4°C. Après la centrifugation, le mélange se sépare en phase inférieure, contenant le phénol et le chloroforme, une interphase contenant des protéines et une phase supérieure aqueuse.

Les ARN sont présents exclusivement dans la phase aqueuse. Après transfert de la phase aqueuse dans un nouveau tube, l'ARN est précipité par ajout de 0.5 ml d'alcool isopropylique par ml de TRIzol utilisé au départ. Après incubation pendant 10 minutes à température ambiante, les tubes sont centrifugés 15 minutes à 13000 rpm à 4°C.

L'ARN précipité forme un culot translucide au fond du tube. Le surnageant est enlevé et le culot d'ARN est lavé avec 0.5 ml d'éthanol à 75%. Après une centrifugation à 12000 rpm pendant 7 minutes à 4°C, le surnageant est éliminé et le culot est séché pendant 15 à 20 minutes sous vide ou à l'air libre.

Une fois sec, le culot est solubilisé par l'ajout de 50 µl de H₂O-DEPC. L'ARN est dénaturé pendant 12 minutes à 60°C puis congelé à -80°C.

La concentration des ARN est déterminée par spectrophotométrie à 260 nm.

2.4. Contrôle de la pureté et détermination de la concentration de l'ARN en solution

Le spectrophotomètre NanoDrop ND-2000 permet de réaliser des spectres d'absorbance en utilisant des petits volumes d'échantillons sans cuvettes ni capillaires.

Il permet des mesures sur une grande gamme de longueurs d'onde pour l'analyse des spectres dans le visible et l'U.V. Cet appareil est spécialement conçu pour évaluer la pureté et la quantité des acides nucléiques en solution. Le NanoDrop ND-2000 se caractérise par un système de rétention d'échantillon qui permet l'analyse

quantitative et qualitative à partir de seulement 1 à 2 µl d'ARN dans un temps de 10 secondes. La préparation de l'appareil pour la mesure des échantillons ne requiert que le nettoyage des surfaces de lecture.

La concentration et le ratio 260/280 nm sont déterminés par densité optique avec Nanodrop en déposant 1 µl de solution d'ARN au NanoDrop ND-2000. La concentration en acides nucléiques est déterminée en utilisant les correspondances suivantes : 1 unité de DO équivaut à 40 µg/ml d'ARN (Nolan *et al.*, 2006).

2.5. Contrôle de la qualité des ARN totaux par électrophorèse

Le terme « électrophorèse » décrit la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Elle a pour but de séparer des macromolécules en fonction de leur taille, de leur charge électrique et d'autres propriétés physiques en présence de BET.

Après avoir décontaminé le matériel et dénaturé les ARNase par immersion dans du NaOH 0.5N et le rincé avec de l'eau distillée, les échantillons (5 µl d'ARN, 5 µl d'H₂O, 2 µl du Bleu de dépôt) sont séparées sur gel d'agarose concentré à 1% (1g d'agarose, 50 ml de tampon de migration TBE 0.5x et 6 µl BET 1% 'Bromure d'ethidium', dans de l'eau prétraitée au DEPC), par application d'un champ électrique d'une tension variant entre 100 et 135 v pendant 30 à 45 minutes suivant la taille du gel.

Après migration, le gel est analysé par l'utilisation d'un trans-illuminateur (table UV 254 nm).

2.6 Synthèse de la cDNA par transcription inverse

La transcriptase inverse catalyse la conversion d'ARN en ADN, cette procédure enzymatique se fait en 2 étapes, la reverse transcription (rt) et la pcr.

L'enzyme transcriptase inverse des rétrovirus utilise les dNTP pour synthétiser l'ADN complémentaire à partir d'une matrice d'ARN.

La transcriptase inverse n'est capable d'ajouter des nucléotides qu'à l'extrémité 3' d'une amorce déjà appariée à la matrice. L'amorce utilisée est un oligo-dT qui s'hybride à la queue poly-A des ARNm.

Un kit est utilisé pour la RT-PCR, il est composé d'une Réverse transcriptase : MMLV (5U/ µl) reverse transcriptase, d'un inhibiteur de RNase (40 U/µl), des oligodT (2 µM), des dNTP et du tampon 5 X

La synthèse de l'ADNc se fait à partir de 9 µl d'ARN totaux. Pour avoir une forme linéaire les ARN sont dénaturés à 65°C pendant 15 minutes en présence de 0.4 µl d'oligo (dT) 18, le mélange est immédiatement après incubé dans la glace pour conserver la forme linière de l'ARN.

Ajouter ensuite 2 µl de mélange de dNTP (de concentration de 10 mM pour chacun), 4 µl de TP (5x), 1 µl de RNase inhibiteur et 0.5 µl de RTase MMLV et ajustée par l'addition de 3.1 µl de l'H₂O DEPC pour avoir un volume finale de 20 µl.

2.7 PCR (polymerase chain reaction ou réaction de polymérase en chaîne)

La réaction de polymérisation en chaîne PCR est une méthode *in vitro* de clonage permettant de former d'énormes quantités d'un fragment d'ADN spécifique à partir d'une quantité infime de départ (Saiki et al 1985). Cette méthode peut être utilisée pour cloner un gène donné ou pour déterminer si un gène donné est activement transcrit en ARN dans un organe ou un type cellulaire particulière.

L'ADN matriciel peut tout autant être de l'ADN génomique que de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messagers (ARN poly-A), ou encore de l'ADN mitochondrial.

L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température.

L'amplification de ce gène est effectuée avec un volume réactionnel de 20 μ l contenant 11 μ l de Mix (2x) préparé, 2 μ l d'ADNc comme matrice de PCR, 2.5 μ l pour chacune d'amorces F et R correspondant au gène *TaSTRG* et ajusté par 2 μ l d'H₂O ultra pure.

Les amorces correspondant à notre gène sont 5'TCGTGGTTCCTCGTGGAAAGGG3' et 5'CAGGGTCTTGAGGAAGTTGTTG3'.

Le cycle de PCR optimisé est comme suit : Dénaturation initiale : 94°C pendant 5 min,

Deuxième dénaturation : 94 °C à 15 s, une série de 30 cycles : 60°C pendant 30s, 72°C pendant 30s, 72°C pendant 30 s et 72°C pendant 7 minutes pour la synthèse finale.

L'expression du gène β -Actine du blé est analysée comme une référence en matière de normalisation et les séquences des amorces sont 5'TGCTATCCTTCGTTTGGACCTT 3' et 5'AGCGGTTGTTGTGAGGGAGT 3'.

Le système de réaction d'amplification de ce gène et les procédures à suivre sont les mêmes que celles décrites ci-dessus.

Le sujet de cette mémoire s'inscrivait dans un projet de thèse de doctorat en science portant sur les croisements interspécifiques *Triticum durum* Desf. × *Aegilops geniculata* Roth. pour l'amélioration du blé vis-à-vis le stress hydrique et que le gène étudié *TaSTRG* est annoté et publié depuis 2009 (Zhou et al., 2009).

La stratégie adoptée consistait, dans un premier temps, en l'extraction de l'ARN total des feuilles et des racines à partir de jeunes plantules (stade 3 feuilles) de ; blé dur (var. Oued Zenati 368), 2 lignées de blé tendre (var. *Chinese spring*), *Aegilops geniculata* et 8 lignées recombinantes issues du croisement *Triticum durum* Desf. (Var. Oued Zenati 368) × *Aegilops geniculata* Roth. Soumises à différents régimes de stress hydrique et salin, suivie de la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) utilisant la technique de RT-PCR à l'aide d'amorces spécifiques désignées à partir de séquence de gène *TaSTRG* disponible dans les banques de gènes. La séquence ADNc *TaSTRG* de blé a été obtenue sur la base de données GenBank (Annexe n°2). C'est une séquence complète de 879 pb.

1. Application de stress

Après dix jours de mise en germination, les plantules sont transférées dans des nouveaux récipients, désinfecté auparavant, afin d'avoir plus d'espace. Deux jours plus tard, des contaminations, par des moisissures, ont été observées sur les racines des plantules, bien qu'on a effectué la mise en germination dans des conditions stériles. Au stade trois feuilles, on appliqué deux types de stress, hydrique par le traitement des plantules avec le PEG 6000 à 15 % pendant 48 h et salin par le traitement d'un autre lot de plantules par 170 mM du NaCl pendant aussi 48 h.

2. Quantification des ARNs totaux

Avant de procéder à la transcription inverse, il est nécessaire de doser et de contrôler l'intégrité de la qualité des ARN totaux extraits par électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier que ceux-ci ne sont pas dégradés. Les ARN sont quantifiés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop (ND-2000) en déposant 1 µl d'échantillon. Les deux principaux avantages du dosage au Nanodrop sont :

- ❖ Faible volume d'échantillon nécessaire,
- ❖ Pas besoin de diluer l'échantillon.

Les protéines absorbent majoritairement à 280 nm, les composés humiques et phénoliques majoritairement à 230 nm, et l'ADN majoritairement à 260 nm.

D'après Nolan et al., (2006) la concentration de l'ARN peut être calculée par mesure d'absorbance à 260 nm, longueur d'onde à laquelle une unité de DO correspond à 50 ng /µl double brin où 40 ng /µl d'ADN simple brin.

D'après les résultats du contrôle au Nanodrop (Annexe n°6), le degré de pureté de l'ARN des échantillons est dans l'ensemble bon.

Après dosage des ARN totaux de nos géotypes par Nano Drope, les quantités d'ARN varient (145.6 ng/μl – 2297.9 ng/μl), avec une moyenne de 867.6 ng/μl.

Exceptionnellement une concentration de 69.3 ng/μl a été enregistrée pour l'extrait d'ARN des racines non stressées de la lignée 1816. (Annexe n°6)

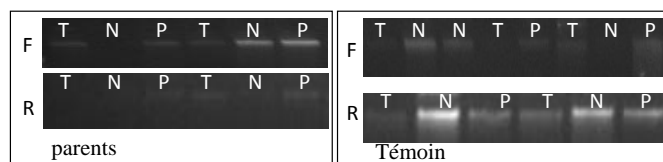
Pour considérer un échantillon pur en ARN, le rapport A260/A280 doit être supérieur à 2,0 (pour de l'ADN pur, le rapport doit être compris entre 1,8 et 2,0). Si ce rapport est inférieur à 1,8, la contamination en protéines est considérée comme importante. Le rapport A260/A230 doit être proche de 2,0 afin de pouvoir considérer l'échantillon exempt de contaminants.

La plus part des valeurs du rapport A 260/280 sont comprise entre 1.8 et 2, ce qui reflète la présence d'ADN contaminant nos échantillons d'ARN extrait. Quelques contaminations d'origine protéique sont enregistrées.

3. Qualité d'extraction des ARNs totaux

L'intégrité des ARN totaux extraits est visualisée après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. Le principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose repose sur la migration des molécules selon leur taille. Cependant, la visualisation n'est possible que pour les ARNs ribosomiaux des sous unités 18s et 28s puisqu'ils sont les plus réponsus et de taille importante (1,9 et 4,9 kpb respectivement) Bastard et al., (2002).

La vérification a été effectuée sur 10 μl d'ARN extrait pour chaque échantillon. En effet, une seule bande a été observée après migration pour l'ensemble des échantillons et ceci est dû probablement à une séparation incomplète des deux sous unités après 35 minutes de migration à 130 V (**figure 8**). Par comparaison avec le marqueur de taille, il est noté que 9 bandes seulement ont été séparées /observées au lieu de 11 (Annexe n°4).



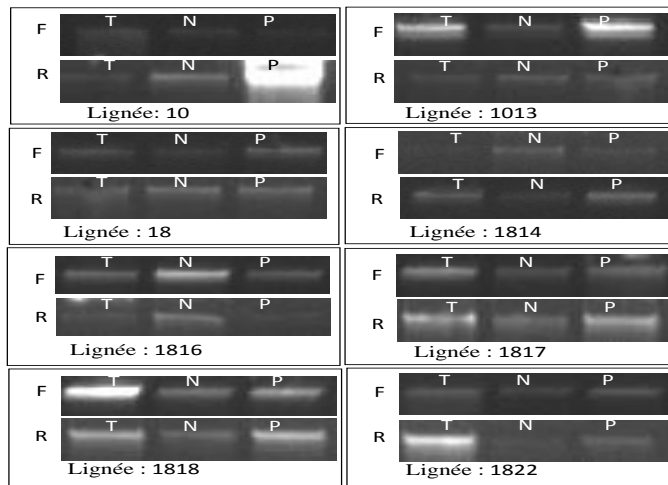


Figure 8 : Vérification de la qualité d'extraction d'ARN des racines et des feuilles d'*Aegilops geniculata*, blé dur variété (Oued Zenati 368) les deux lignées de blé tendre *Chinese spring* 'Cs08 et Cs11' et les descendants du croisement d'*Aegilops geniculata* × Oued Zenati sur un gel d'agarose de 1% à 130 v.

F : feuilles, R : racines, T : témoin, N : stress appliquée par NaCl, P : stress appliquée par PEG

Peu d'ARN a été enregistré pour l'*Aegilops* et ceci est dû à la petite taille des plantes ce qui reflète en général la faible quantité du matériel végétale, il est enregistré que la quantité d'ARN des feuilles est supérieure à celle des racines.

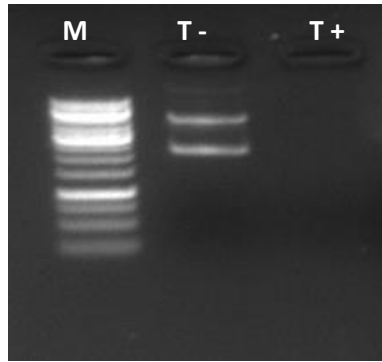
Cependant, les 2 lignées de la variété *Chinese spring* ont montré des concentrations d'ARN ribosomiaux élevée pour les racines par rapport aux feuilles

Pour les génotypes 10, 1013, 1818 et 1822 bandes sont intenses, tandis que les autres génotypes 18, 1814, 1816, 1817 montrent en générale des niveaux faibles

Les types de stress n'influent pas à l'intensité des bandes, ceci est attribué en générale à la quantité du matériel végétale disponible.

4. Digestion d'ADN génomique avec DNase

L'ADN témoin utilisé pour la vérification de l'activité de l'ADNase est un vecteur circulaire (pSK) présente deux bandes en absence d'enzyme (T-), puisque un ADN circulaire va migrer moins loin qu'un ADN linéarisé, qui lui-même va migrer moins loin qu'un ADN surenroulé, pour une molécule de même taille. En présence d'enzyme DNase aucune bande n'a été détectée. D'après les résultats obtenus, nous pouvons déterminer la quantité de la DNase qui a bien fonctionnée.



M : marqueur des tailles, T- : témoin négatif, T+ : témoin positif.

Figure 9 : Vérification de la digestion enzymatique par DNase sur un gel d'agarose de 1% à 100v.

5. Synthèse de l'ADNc

Après dosage par Nanodrop des ADNc synthétisés, les concentrations enregistrées varient entre 577.9 ng/μl et 1164.6 ng/μl, avec une moyenne de 886.4 ng/μl. (Annexe n°7). D'après les résultats du contrôle au Nanodrop, le degré de pureté de l'ADN des échantillons est satisfaisant.

6. L'expression des gènes

Le gène *TaSTRG* a conféré au riz transformé une surexpression sous l'effet d'un stress hydrique ou salin (Zhou et *al.*, 2009). Les résultats de l'analyse transcriptomiques montrent que pour les traitements de nos génotypes l'expression de ce gène *TaSTRG* est variable d'une lignée à l'autre pour les racines ainsi que pour les feuilles sous différents régimes de stress. Cependant, pour le gène β -*Actin* (gène de référence pour la mesure d'expression) une faible intensité des bandes a été enregistrée, pour l'ensemble des génotypes, après amplification. La séquence ADNc du gène de l'actine a été obtenue sur NCBI (Annexe n°1) et des amorces spécifiques de ce gène ont été définies.

Nous avons retenu un couple d'amorces spécifiques permettant d'amplifier la séquence ADNc partielle, pour le gène *TaSTRG* ; afin de réaliser les études d'expression par RT-PCR semi-quantitative, du gène d'intérêt, par rapport au gène de l'actine.

Les couples d'amorces utilisées pour amplifier des séquences *TaSTRG* et le gène constitutif β -*Actin* de 101 et 94 pb respectivement ont donné des amplifications avec la taille attendue.

Afin de vérifier que les amplicons obtenus aient la taille attendue, les produits PCR sont déposés sur un gel d'agarose à 1,8 %. On ajoute un témoin sans ADN pour contrôler s'il y a eu une contamination lors de la manipulation.

En effet, les bandes obtenues par migration sur gel des différents produits de PCR sont d'intensité différente quel que soit le traitement de stress effectué, cela pour les deux gènes *TaSTRG* et l'actine chez les racines et les feuilles (Figure n°10). Ainsi, nous n'avons pas vérifié que l'expression du gène de l'actine est constante ou pas dans des plantules non traitées et dans des plantules traitées par le stress. Per contre, les résultats du gel sont exploitables.

Dans l'objectif d'améliorer la visualisation des bandes on a augmenté le nombre des cycles jusqu'à 40. Zhou et *al.*, (2009) ainsi que Boutebba (2013) ont utilisé 30 et 35 cycles respectivement. Innis et Gelfand (1990) In : Somma et Querci (2006) ont rapporté que l'augmentation du nombre de cycles d'amplification peut provoquer la dégradation des réactifs (dNTP, enzyme), l'épuisement de réactifs (amorces – problème avec les produits courts, dNTP – problème avec les produits longs), l'inhibition du produit final (formation de pyrophosphate) et la compétition pour les réactifs par les produits non spécifiques, compétition pour la liaison avec les amorces par réhybridation du produit concentré (10 nM).

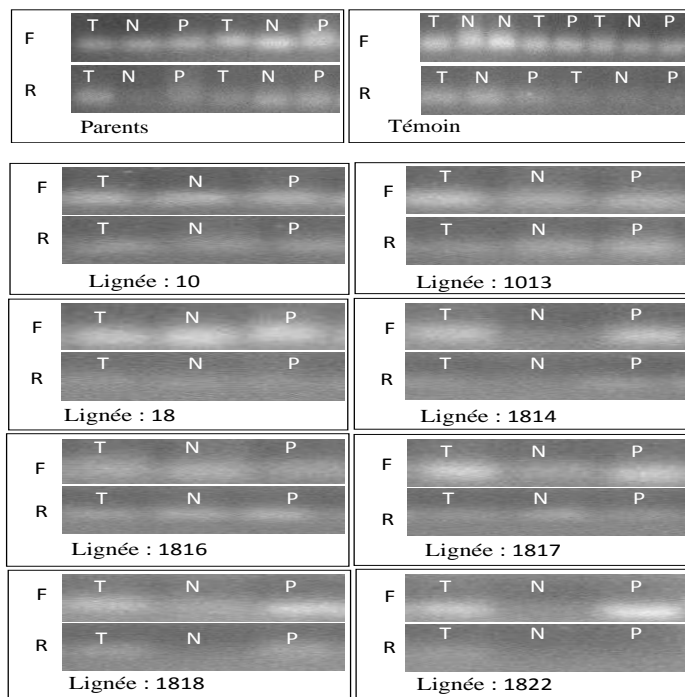


Figure 10 : Vérification de l'expression du gène *TaSTRG* dans les racines et des feuilles d'*Aegilops geniculata*, blé dur variété (Oued Zenati 368) les deux lignées de blé tendre *Chinese spring* "Cs08 et Cs11" et les descendants du croisement d'*Aegilops geniculata* × *Oued Zenati* sur un gel d'agarose de 1.7 % à 130 v.

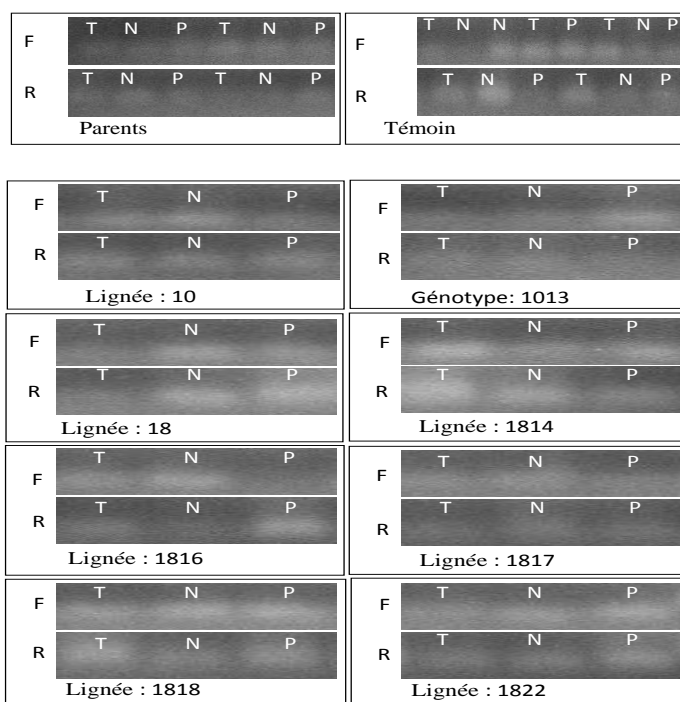


Figure 11 : vérification de l'expression du gène β -Actin dans les racines et des feuilles d'*Aegilops geniculata*, blé dur variété (Oued Zenati 368) les deux lignées de blé tendre *Chinese spring* "Cs08 et Cs11" et les descendants du croisement d'*Aegilops geniculata* \times *Oued Zenati* sur un gel d'agarose de 1.7 % à 130 v.

Après un traitement avec NaCl et PEG sur les différents génotypes étudiées, l'expression du gène *TaSTRG* a été évaluée par une RT-PCR semi quantitative, par comparaison avec l'expression du gène de ménage β -Actin.

Les résultats obtenus, par RT-PCR, indiquent que le gène *TaSTRG* est surexprimé sous la forme d'un transcrit de 100 pb chez tous les génotypes et sous les différents traitements de stress, ce qui est cohérent avec la taille de la séquence partielle du gène 101pb (Annexe n°2) malgré leurs intensités faibles. Nous pouvons expliquer ces résultats par le fait que les racines de nos plantules sont infectées par les moisissures et lorsqu'elles sont en présence d'une contamination, elles déclenchent leurs mécanismes de défense vis-à-vis le stress biotique. Donc, le gène *TaSTRG* ne montre pas une surexpression dépendante du degré du stress abiotique seulement mais aussi au stress biotique.

Aucune variation de l'expression de l'actine, alors qu'il s'est surexprimé chez tous les génotypes, dans les tissus des racines et des feuilles, et avec ou sans stress, généralement, le niveau d'expression du gène β -Actin n'est pas influencé par le stress.

La variabilité obtenue dans le niveau d'expression de ce gène peut être aussi due aux contaminations des racines de nos plantules par des moisissures lors de la mise en culture, ces dernières ont probablement influencé sur le transcriptome des plantes avant l'application des différents stress.

- ❖ Pour les feuilles, les génotypes 1814 et 1822 ne présentent aucune bande pour le traitement NaCl, Des dégradations des ADN amplifiés ont été observées pour des génotypes : 1013 sous traitement par PEG, 1816 pour le témoin et le traitement par NaCl, aussi pour le génotype 1818 traité par NaCl.
- ❖ Pour les racines, l'absence est rencontrée dans les génotypes : *Aegilops*, 1818 (traitement avec NaCl), le génotype 1822 n'a pas produit de bandes pour traitement NaCl et PEG.

Des dégradations ont été observé dans les génotypes *Aegilops* et la lignée 10 (traités par PEG).

De très faibles intensités se rencontrent dans les génotypes : 1814 (témoin, traitement par NaCl et par PEG), le 1822 (témoin).

Nous pouvons également proposé de caractériser le profil d'expression de ce gène de tolérance au stress biotique et abiotique, par la technique de RT-PCR quantitative.

7. Recherche *in silico* de gènes homologues

Dans le cadre de la recherche de similarité entre ce gène avec d'autres séquences déjà disponible, un alignement a été effectué en consultant la base de donnée NCBI parmi les 12 séquences trouvées, 4 séquences montrent des identités de 92%, 92%, 92% et 85% respectivement, avec une *E* value nulle. Les résultats de cette analyse divergent concernant les séquences des gènes qui sont tous annotées *in silico* (figure 12).

Les trois premières séquences proviennent tous de l'orge *Hordeum vulgare*, la quatrième séquence provient du *Brachypodium distachion*.

- La première séquence porte le numéro d'accession AK368209.1
- La deuxième séquence porte le numéro d'accession [AK250960.1](#)
- La troisième séquence porte le numéro d'accession [AK371007.1](#)
- La quatrième séquence porte le numéro d'accession [XM 003561782.2](#)

Malgré le degré élevé d'identité de ces séquences, leurs fonctions ne sont pas caractérisées.

Nos résultats n'ont pas été ceux que nous aurions espérés et donc nous en sommes venus à la conclusion que ce n'est pas la méthode d'amplification employée qui cause le problème majeur rencontré mais bien le nombre de cycles augmenté aux 40 cycles.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Triticum aestivum salt tolerant-related protein (STRP) mRNA, complete cds	1624	1624	100%	0.0	100%	EF599631.1
<input type="checkbox"/> Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, complete cds, clone: NIAshv2070D17	1242	1242	100%	0.0	92%	AK368209.1
<input type="checkbox"/> Hordeum vulgare subsp. vulgare cDNA clone: FLbaf103o07, mRNA sequence	1242	1242	100%	0.0	92%	AK250960.1
<input type="checkbox"/> Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein, partial cds, clone: NIAshv2122B07	1240	1240	100%	0.0	92%	AK371007.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Brachypodium distachyon uncharacterized LOC100823028 (LOC100823028), mRNA	793	793	93%	0.0	85%	XM_003561782.2
<input type="checkbox"/> Orzya minuta clone OM_Ba0060G10, complete sequence	636	636	67%	3e-179	86%	AC231820.1
<input type="checkbox"/> Orzya sativa Japonica Group Os03g0245500 (Os03g0245500) mRNA, complete cds	630	630	67%	1e-177	86%	NM_001056074.1
<input type="checkbox"/> Genomic sequence for Orzya sativa, Nipponbare strain, clone OSJNBb0096L14, from chromosome 3, complete sequence	630	630	67%	1e-177	86%	AC129008.1
<input type="checkbox"/> Sorghum bicolor hypothetical protein, mRNA	621	621	64%	8e-175	87%	XM_002465519.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Setaria italica uncharacterized LOC101771221 (LOC101771221), mRNA	617	617	69%	1e-173	85%	XM_004984964.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Zea mays uncharacterized LOC103639369 (LOC103639369), mRNA	604	604	68%	8e-170	85%	XM_008662124.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Orzya brachyantha uncharacterized LOC102718349 (LOC102718349), mRNA	568	568	62%	1e-158	85%	XM_006651150.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Phoenix dactylifera uncharacterized LOC103706202 (LOC103706202), mRNA	147	147	52%	6e-32	73%	XM_008790241.1

Figure 12: Résultat d'alignement du gène *TaSTRG* sur la base de donnée NCBI

Conclusion :

Les études de bioinformatique ont conduit à la découverte de plusieurs gènes qui participent dans la tolérance aux contraintes environnementales. Un gène nommé *TaSTRG* (*Triticum aestivum* stress tolerant related gene) isolé à partir de la variété de référence *Chinese spring* du blé tendre et transféré dans le riz, a montré un niveau d'expression élevé. L'alignement de ce gène annoté qui porte le numéro d'accension EF599631 dans la base de données NCBI a montré un niveau élevé d'homologie parmi les séquences identifiées.

La techniques RT-PCR semi quantitative a mis en évidence l'expression du gène *TaSTRG*, mais elle ne permet pas une bonne compréhension au niveau fonctionnelle. Une meilleure connaissance par des approches de génomique fonctionnelle de ce gène devrait aider au développement de nouvelles variétés mieux adaptées aux contraintes environnementales.

L'expression du gène *TaSTRG* dans tous les géotypes que ce soit les parent ou les hybrides, nous montre clairement que ce gène provient de l'un de ces génomes A, B, U et M mais on est sûr qu'il ne provient pas ldu génome D du blé tendre.

D'autre part, le gène *TaSTRG* s'est manifesté dans les témoins, on suppose que ce gène peut être impliqué dans la réponse au stress biotiques.

Dans le cadre d'un travail futur, il est envisageable de :

- Faire des essais préliminaires sur l'influence du nombre des cycles sur l'intensité des bandes de PCR.
- Mesurer la variation de l'expression de ce gène par une RT-PCR quantitative durant tous les stades de développement pour avoir une idée sur les paramètres qui gouverne ce gène.
- Comprendre le mode d'action de la protéine correspondante à ce gène par des études de proteomique, ainsi qu'inclure ce gène dans les voies de signalisation.
- faire des expériences d'hybridation génomique pour identifier l'origine de ce gène parmi les différents génomes.
- faire des études de phylogénie pour ce gène dans les formes apparentées du blé pour avoir une idée sur sa spéciation, et de choisir parmi ces espèce qui correspond le mieux afin d'introduire ce gène dans le blé par des croisements.
- induire des mutations ciblées pour ce gène et cribler les mutants résultants pour comprendre sa fonction.

Références bibliographiques :

- Tsunewaki, K. (2009)**. Plasmon analysis in the Triticum-Aegilops complex. *Breed. Sci.* 59: 455–470.
- **Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R. et al. (2002)** Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 8133–8138.
- **Sarkar, P. and Stebbins, G.L. (1956)** Morphological evidence concerning the origin of the B genome in wheat. *Am. J. Bot.* 43: 297–304.
- **Shands, H. and Kimber, G. (1973)** Reallocation of the genomes of Triticum timopheevii Zhuk. In *Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium, Missouri Agricultural Experimental Station*. Edited by Sears, E.R. and Sears, L.M.S. pp.101–108. University of Missouri, Columbia.
- **Chapman, V., Miller, T.E. and Riley, R. (1976)** Equivalence of the A genome of bread wheat and that of Triticum urartu. *Genet. Res.* 27:69–76.
- **Dvorak, J. (1976)** The relationship between the genome of Triticum urartu and the A and B genomes of Triticum aestivum. *Can. J. Genet. Cytol.* 18: 371–377.
- **Dvorak, J., McGuire, P.E. and Cassidy, B. (1988)** Apparent sources of the A genomes of wheats inferred from polymorphism in abundance and restriction fragment length of repeated nucleotide sequences. *Genome* 30: 680–689.
- **Dvorak, J., Di Terlizzi, P., Zhang, H.B. and Resta, P. (1993)** The evolution of polyploid wheats: identification of the A genome donor species. *Genome* 36: 21–31.
- **Ogihara, Y. and Tsunewaki, K. (1988)** Diversity and evolution of chloroplast DNA in Triticum and Aegilops as revealed by restriction fragment analysis. *Theor. Appl. Genet.* 76: 321–332.
- **Noda, K. and Ge, K. (1989)** Structural differentiation of chromosomes between Triticum dicoccoides Körn. and T. araraticum Jakubz., showing high meiotic pairing homology. *Jpn. J. Genet.* 64:191–198.
- **Dvorak, J. and Zhang, H.B. (1990)** Variation in repeated nucleotide sequences sheds light on the phylogeny of the wheat B and G genomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87: 9640–9644.
- **Miyashita, N.T., Mori, N. and Tsunewaki, K. (1994)** Molecular variation in chloroplast DNA regions in ancestral species of wheat. *Genetics* 137: 883–889.
- **Huang, S., Sirikhachornkit, A., Su, X., Faris, J., Gill, B., Haselkorn, R. et al.(2002)** Genes encoding plastid acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase of the Triticum/Aegilops complex and the evolutionary history of polyploid wheat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 8133–8138.
- **Kilian, Özkan, H., Deusch, O., Effgen, S., Brandolini, A., Kohl, J. et al.(2007a)** Independent wheat B and G genome origins in outcrossing Aegilops progenitor haplotypes. *Mol. Biol. Evol.* 24: 217–227.
- Matsuoka. (2011)** Evolution of Polyploid Triticum Wheats under Cultivation: The Role of Domestication, Natural Hybridization and Allopolyploid Speciation in their Diversification. *Plant Cell Physiol.* 52(5): 751-753 .

- **Feldman, M. (2001)** Origin of cultivated wheat. In *The World Wheat Book*. Edited by Bonjean, A.P. and Angus, W.J. pp. 3–56. Lavoisier Publishing, France.
- **Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R. and Martin, W. (2002)** Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nat. Rev. Genet.* 3: 429–441.
- **Kihara, H. (1944)** Discovery of the DD-analyser, one of the ancestors of *Triticum vulgare* (abstr) (in Japanese). *Agric. Hortic.* 19: 889–890.
- **McFadden, E.S. and Sears, E.R. (1946)** The origin of *Triticum spelta* and its free-threshing hexaploid relatives. *J. Hered.* 37: 81–89.

- Lee S, Kim SH, Kim SJ, Lee K, Han SK (2004)**. Trapping and characterisation of cold- responsive genes from T-DNA tagging lines in rice. *Plant Sci*; 166: 69-79.

- **Koh S, Lee SC, Kim MK, Koh JH, Lee S, An G, Choe S, Kim SR (2007)**. T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGK1*, an orthologue of *Arabidopsis BIN2*, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* ; 65: 453-466.

- Donson J, Fang Y, Espiritu-Santo G, Xing W, Salazar A, Miyamoto S, Armendarez V, Volkmuth W (2002)**. Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol* ; 48: 75-97.

- **Meyers BC, Vu TH, Tej SS, Ghazal H, Matvienko M, Agrawal V, Ning JC, Haudenschild CD(2004)**. Analysis of the transcriptional complexity of *Arabidopsis thaliana* by massively parallel signature sequencing. *Nat Biotechnol* ; 22: 1006- 1011.

- **Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW(1995)**. Serial Analysis of gene expression. *Science*; 270: 448- 487.

- **Brenner S et al(2000)**. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead. *Nat Biotechnol*; 18: 630-634.

- **Liang P, Pardee AB(1992)**. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* ; 257: 967-971.

- Bachem CW, Hoeven RS van der, Bruijn SM de, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG(1996)**. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J* ; 9: 745-753.

- **Habu Y, Fukada- Tanaka S, Hisatomi Y, Iida S (1997)**. Amplified restriction fragment length polymorphism- based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. *Biochem Biophys Res Commun*; 234: 516-521.

- Hughes TR, Marton MJ, Jones AR, Roberts CJ, Stoughton R, Armour CD, Bennett HA, Coffey E, Dai HY, He YDD, Kidd MJ, King AM, Meyer MR, Slade D, Lum PY, Stepaniants SB, Shoemaker DD,**

Gachotte D, Chakraborty K, Simon J, Bard M, Friend SH (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell*; 102: 109-126.

- **Vij S, Tyagi AK. Emerging trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants (2007).** *Plant Biotech J* ; 5: 361- 380

- **Ramalingam J, Pathan MS, Miftahudin Feril O, Ross K, Ma XF, Mahmoud AA, Layton J, Rodriguez-Milia MA, Chikmawati T, Valliyodan B, Skinner R, Matthews DE, Gustafson JP, Nguyen HT. Structural and functional analyses of the wheat genomes based on expressed sequence tags (ESTs) related to abiotic stresses(2006).** *Genome* ; 49: 1324- 1340.

- **Gorantla M, Babu PR., Lachagari VBR, Reddy AMM, Wusirika R, Bennetzen, JL, Reddy AR(2007).** Identification of stress responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L) using ESTs generated from drought - stressed seedlings. *J Exp Bot*; 58: 253-265.

-**Houde M, Belcaid M, Ouellet F, Danyluk J, Monroy AF, Dryanova A, Gulick P, Bergeron A, Laroche A, Links MG, MacCarthy L, Crosby WL, Sarhan F(2006).** Wheat EST resources for functional genomics of abiotic stress. *BMC Genomics* ; 7: 149.

-**Chaves,M.M.,Flexas,J.,andPinheiro,C.(2009).**Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Ann.Bot.* 103, 551–560. doi: 10. 1093/aob /mcn 125.

- **Peng,Z., Wang, M., Li, F., Lv,H., Li,C., and Xia,G.(2009).**A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an Introgression strain of bread wheat. *Mol.Cell.Proteomics* 8, 2676–2686.doi:10.1074/mcp.M900052-MCP200.

- **Kamal,A. H.,Cho, K., Kim,D .E., Uozumi,N., Chung,K.Y.,Lee,S.Y.,et al. (2012a).** Changes in physiology and protein abundance in salt-stressed wheat chloroplasts. *Mol.Biol.Rep.* 39, 9059–9074.doi:10.1007/s11033-012-1777-7.

- **Wang,M.C.,Peng,Z.Y.,Li,C.L.,Li,F.,Liu,C.,andXia,G.M. (2008).** Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. *Proteomics* 8, 1470–1489.doi: 10.1002/pmic.200700569.

- **Gao,L., Yan,X., Li,X. ,Guo,G., Hu,Y., Ma,W., et al.(2011).**Proteome analysis of wheat leaf under salt stress by two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE). *Phytochemistry* 72, 1180–1191.doi: 10.1016/j.phytochem.2010.12.008.

- **Zörb,C., Herbst,R., Forreiter,C., and Schubert,S. (2009).**Short-term effects of salt exposure on the maize chloroplast protein pattern. *Proteomics* 9, 4209–4220. doi: 10.1002/pmic. 200800791.

- **Mohammadi, P.P., Moieni, A., Hiraga, S., and Komatsu, S. (2012).** Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. *J. Proteomics* 75, 1906-1923. doi:10.1016/j.jprot.2011.12.041.

- **Ashraf, M., and Harris, P.J.C. (2013).** Photosynthesis under stress ful environments: an overview. *Photosynthetica* 51, 163–190.doi:10.1007/s11099-013- 0021-6.

- **Kamal, A.H., Cho, K., Choi, J.S., Jin, Y., Park, C.S., Lee, J.S., et al. (2013a).** Patterns of protein expression in water-stressed wheat chloroplasts. *Biol. Plant.* 57, 305–312. doi: 10.1007/s10535-012-0290-0.
- **Jiang, S. S., Liang, X. N., Li, X., Wang, S. L., Lv, D. W., Ma, C. Y., et al. (2012).** Wheat drought-responsive grain proteome analysis by linear and nonlinear 2- DE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 16065–16083. doi: 10.3390/ijms131216065.
- **Rizhsky, L., Liang, H., and Mittler, R. (2002).** The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiol.* 130, 1143–1151. doi: 10.1104/pp.006858.
- **Hurkman, W. J., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Whitehand, L., and Altenbach, S. B. (2009).** Effect of high temperature on albumin and globulin accumulation in the endosperm proteome of the developing wheat grain. *J. Cereal Sci.* 49, 12–23. doi: 10.1016/j.jcs.2008.06.014.
- **Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M. R. (2007).** Heat tolerance in plants: an overview. *Environ. Exp. Bot.* 61, 199–223. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.05.011.
- **Ilic L, Kellogg EA, Jaiswal P, et al (2007).** The plant structure ontology, a unified vocabulary of anatomy and morphology of a flowering plant. *Plant Physiol* ; 143 : 587-99.
- Seki M, Naruska M, Kamiya A, et al (2002).** Functional annotation of full length Arabidopsis cDNA collection. *Science*; 296: 141-7.

- **Lee JY, Levesque M, Benfey PN. (2005).** High- throughput RNA isolation technologies. New tools for high resolution gene expression profiling in plant systems. *Plant Physiol*; 138 : 585-90.
- **Quezel, P. & Santa S., 1962.** Nouvelle Flore de l'Algérie des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome II. Pp: 1027-1028.
- **Van Slageren M.W. 1994.** Wild Wheat: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. Et Spach.) Eig. (Poaceae) . Wageningen Agricultural Universitu, International centre for Agricultural Research in the Dry Areas: Veenman Drukkers, Wageningen, Pp.512.
- **Hammer, K. 1980.** Vorarbeiten zur monographischen Darstellung von Wildpflanzen-sortimenten: *Aegilops* L. (In German.). *Kulturpflanze* 28:33-180.
- **Kihara, H. 1937.** Genomanalyse bei *Triticum* and *Aegilops*. VII. Kurze Übersicht über die Ergebnisse der jahre 1934-36. (In German.) *Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ.* 41:1-61.
- **Kihara, H. 1946.** Genomanalyse bei *Triticum* and *Aegilops*. IX Systematischer Aufbau der Gattung *Aegilops* auf genomanalytischer Grundlage. *Cytologia*, 14: 135-144.
- **Kihara, H. 1954.** Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analyser-method. *Cytologia (Tokyo)* 19:336-357.
- **Kimber, G. & Abu-Bakar, M. 1981.** The genomic relationships of *Triticum dichasians* and *T. umbellulatum*. *Z. Pflanzenzuchtg.* 87: 265-273.
- **Kimber, G. & Sears, E.R. 1987.** Evolution in the genus *Triticum* and the origin of cultivated wheat In: E.G.Heyne (eds), *wheat and wheat improvement*. 2nd ed. Pp.154-164.

- **Kihara, H. 1937.** Genomanalyse bei Triticum and Aegilops.VII. Kurze Übersicht über die Ergebnisse der Jahre 1934-36. (In German.) Mem. Coll. Agric. Kyoto Imp. Univ. 41:1-61.
- **Sears, E.R. 1941.** Amphiploids in the seven-chromosome Triticineae. Missouri Agric.Exp.Stn.Res.Bull.336.Uni.Of.Missouri, Columbia, Mo.
- **Kimber, G. 1988.** Evolutionary patterns in the wheat group. In T.E. Miller and R.M.D. Koebner (eds). Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp., Cambridge, England. 13-18 July 1988. Inst. of plant Sci. Res., Cambridge, UK. Pp.47-51.
- **Zohary, D. & Feldman. M. 1962.** Hybridization between amphiploids and evolution of polyploids in the Wheat (Aegilops -Triticum) group. Evolution 16:44-61.
- **Kimber, G. & Yen, Y. 1988.** Analysis of pivotal-differential evolutionary patterns. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:9106-9108.
- **Zaharieva, M. & Monneveux P. 2006.** Spontaneous Hybridisation between Bread Wheat (Triticum aestivum L) and its Wild Relatives in Europe. Crop Sci.46:512- 527.
- **Zadri. F. (2009) :** Obtention d'hybrides F1 issus du croisement Aegilops X Blé dur (Triticum durum Desf) : Amélioration à la tolérance à la sécheresse. Thèse de magistère. Université Constantine. p 23-24.
- **[Brenner S](#), [Johnson M](#), [Bridgham J](#), [Golda G](#), [Lloyd DH](#), [Johnson D](#), [Luo S](#), [McCurdy S](#), [Foy M](#), [Ewan M](#), [Roth R](#), [George D](#), [Eletr S](#), [Albrecht G](#), [Vermaas E](#), [Williams SR](#), [Moon K](#), [Burcham T](#), [Pallas M](#), [DuBridge RB](#), [Kirchner J](#), [Fearon K](#), [Mao J](#), [Corcoran K](#)(2000).** Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. [Nat Biotechnol](#). Jun ;18(6):630-4.
- **Slama A., Ben Salem M., Ben Naceur M. & Zid E.D(2005).** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Institut national de la recherche agronomique de Tunisie (Inrat). Univ. Elmanar. Tunisie. (http://www.john-libbey-eurotext.fr/fr/revues/agro_biotech/sec/e-docs/00/04/11/2E/telecharger.md).
- **Hsissou D. 1994.** Sélection In vitro et caractérisation de mutants de blé dur tolérants à la sécheresse. Thèse de doctorat. Univ. Catholique de Louvain.
- **De Leonardis A.M., D. Marone, E. Mazzucotelli, F. Neffar, F. Rizza, N. Di Fonzo, L. Cattivelli, A.M. Mastrangelo (2007).** Durum wheat genes up-regulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. Plant Science, 172: 1005-1016.
- **Hikmet Budak, Melda Kantar, and Kuaybe Yucebilgili Kurtoglu (2013):** Drought Tolerance in Modern and Wild Wheat. The Scientific World Journal. Article ID 548246.
- **Finkelstein, D.; Ewing, R.; Gollub, J.; Sterky, F.; Cherry, M. and Somerville, S. (2002)** Plant Mol. Biol., 48, 119-131.
- **Faostat, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2014.** Statistical Databases, last updated 15 Aug 2014 www.fao.org.
- **Manickavelu, A., et al., 2012.** Comprehensive functional analyses of expressed sequence tags in common wheat (Triticum aestivum). DNA Res. 19, 165–177. <http://dx.doi>.

org/10.1093/dnares/dss001.

- **Dvorak, J., Akhunov, E.D., 2005.** Tempos of gene locus deletions and duplications and their relationship to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the Aegilops–Triticum alliance. *Genetics* 171, 323–332. <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.105.041632>.
- **Baginsky, S., and Gruissem, W. (2002).** Endonucleolytic activation directs dark-induced chloroplast tmRNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 30, 4527–4533. doi: 10.1093/nar/gkf561.
- **Baerenfaller K, Gossmann J, Grobei MA, et al. (2008).** Genome-scale proteomics reveals *Arabidopsis* gene models and proteome dynamics. *Science* ; 320 :938-41.
- **Berardini TZ, Mundodi S, Reiser L, et al. (2004).** Functional annotation of the *Arabidopsis* genome using controlled vocabularies. *Plant Physiol* ; 135 : 745-55.
- **Zimmermann P, Hirsch-Hoffman M, Henning L, Gruissem W. (2004).** Genevestigator : *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* ; 136 : 2621-32.
- **Zhou W, Li Y, Zhao BC, Ge RC, Shen YZ, Wang G, Huang ZJ. (2009).** Overexpression of TaSTRG gene improves salt and drought tolerance in rice. *Plant Physiol* ; 15 : 1660-71.
- **Setsuko Komatsu, Abu H. M. Kamal, Zahed Hossain. (2014).** Wheat proteomics : proteome modulation and abiotic stress acclimatation. doi: 10.3389/fpls.
- **Prasanta K . Subudhi . Omics Approaches for Abiotic Stress tolerance in Plants. In Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance. India : Narendra Tuteja, Sarvajeet Singh Gill, Renu Tuteja, 2011, 176.**
- **Nolan T., Hands R.E., Bustin S.E. 2006.** Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Natur prot.* 3: 1559-1582.
- **Kellou k. 2003.** Sauvetage d'embryons issu du croisement *Triticum durum* Desf x *Aegilops geniculata* Roth et *Triticum durum* Desf x *Agropyron repens*. *Mémoire de magistère.* Université Mentouri 1 constantine.

Annexes N°1

Triticum aestivum mRNA for actin, partial cds

GenBank: AB181991.1

LOCUS AB181991 1163 bp mRNA linear PLN 08-MAR-2011
DEFINITION *Triticum aestivum* mRNA for actin, partial cds.
ACCESSION AB181991
VERSION AB181991.1 GI:48927617
KEYWORDS .
SOURCE *Triticum aestivum* (bread wheat)
ORGANISM [Triticum aestivum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP
clade; Pooideae; Triticeae; *Triticum*.
REFERENCE 1
AUTHORS Himi,E. and Noda,K.
TITLE Isolation of wheat actin gene
JOURNAL Published Only in Database (2004)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1163)
AUTHORS Himi,E. and Noda,K.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (16-JUN-2004) Contact:Eiko Himi Institute of Plant
Science and Resources, Okayama University; 2-20-1 Chuo, Kurashiki,
Okayama 710-0046, Japan
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1163
/organism="Triticum aestivum"
/mol_type="mRNA"
/cultivar="Chinese Spring"
/db_xref="taxon:4565"
/dev_stage="immature grain"
CDS <1..902
/codon_start=3
/product="actin"
/protein_id="BAD23897.1"
/db_xref="GI:48927618"
/translation="NNWDDMGKIWHHTFYNELRVAPEDHPVLLTEAPLNPKANREKMT
QIMFETFSCPAMYVAIQAVLSLYASGRRTTGIVLDSGDGVSHSTVPIYEGYTLPHAILRL
DLAGRDLTDNLMKILTERGYSLTTTAEREIVRDIKEKLAYVALDYEQELETARSSSSV
EKSYEMPDGQVITIGSERFRCPVLFQPSHVGMEVPGIHEATYNSIMKCDVDIRKDLV
GNVVLSSGSTMFPGIADRRMSKEITALAPSSMKVKVIAPPERKYSVWIGGSILASLSTF
QQMWISKAEYDESGPGIVHMKCF"
ORIGIN
1 tcaacaactg ggatgacatg gggaaaatat ggcacacac gttctacaac gagctccgtg
61 tcgcaccaga ggatcatcct gtggttgctga ctgaggcccc tctcaacccc aaggccaaca
121 gagagaaaat gaccagatc atgttcgaaa ccttcagttg cccagcaatg tatgtcgcaa
181 tccaggccgt tctgtccttg tatgccagcg gtcgaacaac tggattgtg ctcgactctg
241 gtgatggtgt gagccacact gttccaatct atgagggata cacgcttct catgctatcc
301 ttcgtttgga ccttgctggc cgggacctca cggataatct aatgaagatc ctgacagaaa
361 gagggtactc cctcaacaaca accgctgagc gggaaattgt cagagacata aaggagaagc
421 tcgcttacgt ggcccttgat tatgagcagg agctggaaac ggctaggagc agctcctctg
481 tggagaagag ctatgagatg cctgatggtc aggttataac aattggttca gaaaggttca
541 ggtgccctga ggtgctgttc cagccatctc atgttggtat ggaagttcct ggtatacagc
601 aagcgacata caattccatc atgaagtgtg atgttgatat cagaaaggat ctgtatggta
661 atgttgttct cagtggaggt tctaccatgt ttcttggaaat tgctgatcgc atgagcaaag

721 agatcacggc ccttgctcct agcagtatga aggttaaagt tattgcacca cctgaaagga
781 aatacagtgt ctggatcggg ggctctatct tggcctctct tagcactttc cagcagatgt
841 ggatctccaa ggcggagtac gatgagtctg gtcccggcat tgtccacatg aagtgctttt
901 gaagagtccg tgaaggggac ttacaaaggg gacttgctgc caagaatata tagtacatgg
961 agtacatggg tagtgttctg tagaagatgt gtaccctcag aggaataagg ggtacaggaa
1021 aatcagtctc ggttcagctt ttcttttgg cacaattgca tggccttgca tggtgcttgc
1081 ctgctgtatg aaataatgaa atgggacata tgtgtatgcc taagcgacat tgtgtggtac
1141 gccaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

//

***β-Actin* : 94 pb.**

5-TGCTATCCTTCGTTGGACCTT-3 / 5-AGCGGTTGTTGTGAGGGAGT-3 5-ACTCCCTCACAACAACCGCT-3

Annexes N°2

Triticum aestivum salt tolerant-related protein (STRP) mRNA, complete cds

GenBank: EF599631.1

LOCUS EF599631 879 bp mRNA linear PLN 28-SEP-2009
DEFINITION *Triticum aestivum* salt tolerant-related protein (STRP) mRNA,
complete cds.
ACCESSION EF599631
VERSION EF599631.1 GI:156618573
KEYWORDS .
SOURCE *Triticum aestivum* (bread wheat)
ORGANISM [Triticum aestivum](#)

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticeae; Triticum.

REFERENCE 1 (bases 1 to 879)
AUTHORS Zhou,W., Li,Y., Zhao,B.C., Ge,R.C., Shen,Y.Z., Wang,G. and Huang,Z.J.
TITLE Overexpression of TaSTRG gene improves salt and drought tolerance in rice
JOURNAL J. Plant Physiol. 166 (15), 1660-1671 (2009)
PUBMED [19481835](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 879)
AUTHORS Huang,Z., Zhou,W. and He,X.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-MAY-2007) Molecular Biology, College of Life Science of Hebei Normal University, No.113 Yuhua East Road, Shijiazhuang, Hebei 050016, China

FEATURES Location/Qualifiers
source 1..879
/organism="Triticum aestivum"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:[4565](#)"
[gene](#) 1..879
/gene="STRP"
/note="TA-STRP"
[CDS](#) 1..879
/gene="STRP"
/codon_start=1
/product="salt tolerant-related protein"
/protein_id="[ABU88101.1](#)"
/db_xref="GI:156618574"
/translation="MELLSYAAMCLSLAFLLLHSYAAATAPIGMLERETKQQIIASIPP
HGQENPVLFLTSPSGKYAAHFMRSDTAPGAAGLGADFCYVEIILETTEPGAEGRSVWES
ECLAVSTINTCALVFSWKGLEVFDGSNSVWHTHDTESDNNFLKTLQLVDEGDMRILD
KGGELAWKASDESRAAQHCMPGSPGLVVSAMPFFAEPAGHGSSNLPFGQPEGNGNAG
VAQPVLPLPEAAGSGGVAGQGQAVEDVGQTIGFGSQPLVDNSPYDSGAQKHGWSLLGI
GVALGVSSATVMALGI"

ORIGIN

```
1 atggaactcc tctcctaagc tgccatgtgc ctctcgctgg cgtttcttct ccattcctac
61 gccgcggcga cggcgccaat cggcatgctt gagcgggaga ccaagcagca aatcatagcg
121 agcatcccgc cgcacgggca ggagaacccc gtgctattcc taacgtcgcc gtccggcaag
181 tacgcggcgc acttcatgcg cagcgatacc gcgccgggcg cggccggcct cggagccgac
241 ttctgctacg tggagatcct cgagaccacc gagccgggcg cggaggggcg gagcgtgtgg
301 gagtcggagt gcttggcggg gagcaccatc aacacgtgcg cgctcggtt ctcgtggaaa
361 gggctggagg tgttcgacgg gagcaactct gtgtggcaca cgcacgacac ggagtccgac
421 gacaacaact tcctcaagac cctgcagctg gttgacgagg gtgacatgcg catcctcgac
481 aagggcggcg agctcgcgtg gaaggccagc gacgagtcac gcgcggcgca acactgcggg
541 atgcccggct cgcccggcct ggtctcggca atgccgcct tcgcggagcc ggctgggac
601 ggaagcagca acctgccatt tggacaggaa ccagaaggta atggcaatgc cggtagtagca
661 cagcccgtgc tgccgctgcc ggaagcggca gggccgggtg gtgtcgctgg gcagggggcag
721 gccgtggagg acgtggggca gacgattggg tttggcagcc agccattggt ggacaacagc
781 ccatacgaca gtggtgcaca gaagcatgga tggagcttgc taggaatcgg agttgcaactg
841 ggtgtcagct ctgccactgt catggccctc ggtatctga
```

//

TaSTRG : 101 pb.

5-TCGTGTTCTCGTGGAAGGG-3 / 5-CAGGGTCTGAGGAAGTTGTTG-3 5-CAACAACCTCCTCAAGACCCTG-3

Annexes N°3

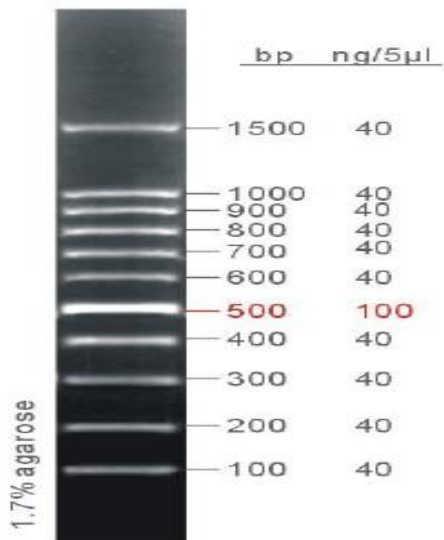
Salt tolerant-related protein [*Triticum aestivum*]

GenBank: ABU88101.1

LOCUS ABU88101 292 aa linear PLN 28-SEP-2009
DEFINITION salt tolerant-related protein [*Triticum aestivum*].
ACCESSION ABU88101
VERSION ABU88101.1 GI:156618574
DBSOURCE accession [EF599631.1](#)
KEYWORDS .
SOURCE *Triticum aestivum* (bread wheat)
ORGANISM [Triticum aestivum](#)
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP
clade; Pooideae; Triticeae; *Triticum*.
REFERENCE 1 (residues 1 to 292)
AUTHORS Zhou,W., Li,Y., Zhao,B.C., Ge,R.C., Shen,Y.Z., Wang,G. and
Huang,Z.J.
TITLE Overexpression of TaSTRG gene improves salt and drought tolerance
in rice
JOURNAL J. Plant Physiol. 166 (15), 1660-1671 (2009)
PUBMED [19481835](#)
REFERENCE 2 (residues 1 to 292)
AUTHORS Huang,Z., Zhou,W. and He,X.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-MAY-2007) Molecular Biology, College of Life Science
of Hebei Normal University, No.113 Yuhua East Road, Shijiazhuang,
Hebei 050016, China
COMMENT Method: conceptual translation.
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..292
/organism="Triticum aestivum"
/db_xref="taxon:[4565](#)"
[Protein](#) 1..292
/product="salt tolerant-related protein"
[CDS](#) 1..292
/gene="STRP"
/coded_by="EF599631.1:1..879"
ORIGIN
1 mellnyaamc lslafllhsy aatapiqml eretkqia sipphgqen vlfltspsgk
61 yaahfmrstd apgaaglgad fcyveilett epgaegrsvw eseclavsti ncalvfswk
121 glevfdgsns vwhthdtesd dnnflktlql vdegdmrild kggelawkas desraaqhcg
181 mpgspglvsa mppfaepagh gssnlpgqpe pegngnagva qpvlppeaa gsggvagqgq
241 avedvgqtig fgsqplvdns pydsgaqkhg wlllgigval gvssatvmal gi
//

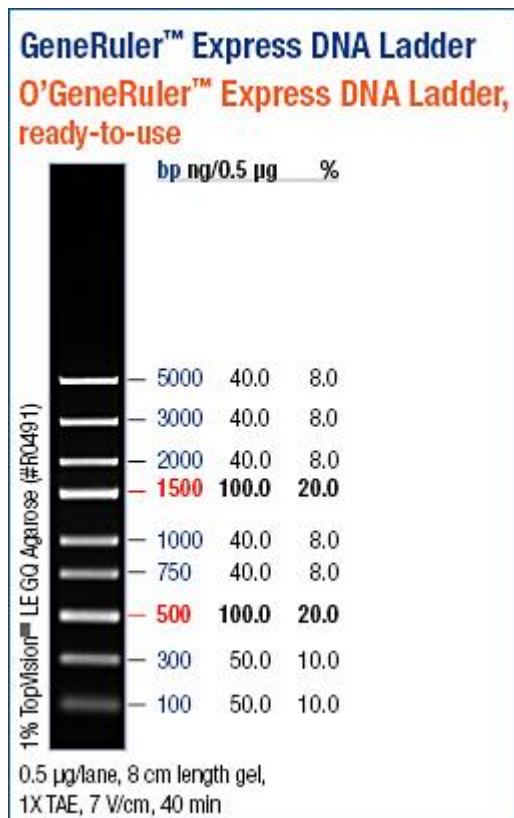
Annexes N°4 Marqueur de taille 100 pb (Biomatik)

100bp ladder



5 µl/lane, 8 cm gel
0.5×TBE, 5 V/cm, 1 h

Annexes N°5 Marqueur de taille 1 Kb (o'gene ruler express DNA ladder)



Annexes N° 6 Tableau de quantification des extraits d'ARN et les différentes dilutions appliquées.

Echantillon	Concentration d'ARN (ng/μl)	260/280	Quality d'extraction		Volume total pour 200 ng/μl	Volume H2O μl
			dilution 0,1μg/μl	qsp H2O 10μl		
Ae TF	282,9	1,68	3,5	6,5	64,3	18,8
Ae NF	277	1,89	3,6	6,4	62,9	17,5
Ae NF	1136,7	1,87	0,9	9,1	273,5	225,4
Oz TF	1854,9	2,08	0,5	9,5	449,5	401,0
Oz NF	663,5	1,8	3,6	6,4	150,6	105,2
Oz PF	1081,3	1,83	3,6	6,4	245,5	200,1
Cs 08 TF	1646,6	2,06	0,6	9,4	398,4	350,0
Cs 08 NF	831,6	1,73	1,2	8,8	198,7	150,9
Cs 08 PF	994,6	1,78	1,0	9,0	238,7	190,7
Cs 11 TF	1058,4	1,83	0,9	9,1	254,3	206,3
Cs 11 NF	945,4	1,84	1,1	8,9	226,6	178,7
Cs 11 NF	559,7	1,73	1,8	8,2	132,1	84,9
Cs 11 TF	1283,7	1,88	0,8	9,2	309,5	261,3
Cs 11 PF	276,4	1,83	3,6	6,4	62,7	17,3
10 TF	1317,1	1,73	0,8	9,2	317,7	269,4
10 NF	625	1,6	1,6	8,4	148,1	100,7
10 PF	871,3	1,75	1,1	8,9	208,5	160,6
1013 TF	2961,1	1,76	0,3	9,7	720,5	671,8
1013 NF	1177,1	1,72	0,8	9,2	283,4	235,2
1013 PF	871	1,7	1,1	8,9	208,4	160,5
18 TF	1430,7	1,79	0,7	9,3	345,5	297,2
18 NF	584,4	1,4	1,7	8,3	138,2	90,9
18 PF	783,4	1,76	1,3	8,7	186,9	139,2

1814 TF	580	1,56	1,7	8,3	137,1	89,8
1814 NF	1155,6	1,8	0,9	9,1	278,1	230,0
1814 PF	709,1	1,79	1,4	8,6	168,7	121,1
1816 TF	848,8	1,8	1,2	8,8	203,0	155,1
1816 NF	462,8	1,71	2,2	7,8	108,4	61,5
1816 PF	973,3	1,77	1,0	9,0	233,5	185,5
1817 TF	961,7	1,84	1,0	9,0	230,6	182,7
1817 NF	956,2	1,71	1,0	9,0	229,3	181,3
1817 PF	514,9	1,63	1,9	8,1	121,2	74,1
1818 TF	214,9	1,8	4,7	5,3	47,7	3,3
1818 NF	1229,5	1,76	0,8	9,2	296,2	248,0
1818 PF	722,3	1,76	1,4	8,6	172,0	124,3
1822 TF	540,1	1,62	1,9	8,1	127,3	80,2
1822 NF	973,4	1,71	1,0	9,0	233,5	185,5
1822 PF	683,6	1,67	1,5	8,5	162,5	114,9
Ae TR	839,3	1,77	1,2	8,8	200,6	152,8
Ae NR	642,6	1,71	1,6	8,4	152,4	105,0
Ae PR	773,8	1,76	1,3	8,7	184,6	136,9
Oz TR	665,8	1,72	1,5	8,5	158,1	110,6
Oz NR	1630,9	2,09	0,6	9,4	394,6	346,2
Oz PR	1062,7	1,85	0,9	9,1	255,4	207,3
Cs 08 TR	791,2	1,76	1,3	8,7	188,8	141,1
Cs 08 NR	342,8	1,9	2,9	7,1	79,0	32,9
Cs 08 PR	796,6	1,75	1,3	8,7	190,2	142,4
Cs 11 TR	866,9	1,73	1,2	8,8	207,4	159,5
Cs 11 NR	548,7	1,73	1,8	8,2	129,4	82,3
Cs 11 PR	2064,2	2,15	0,5	9,5	500,7	452,2
10 TR	1129,7	1,89	0,9	9,1	271,8	223,7
10 NR	522,8	1,66	1,9	8,1	123,1	76,0

10 PR	291,2	1,82	3,4	6,6	66,3	20,8
1013 TR	412,7	2,02	2,4	7,6	96,1	49,5
1013 NR	535	1,68	1,9	8,1	126,1	78,9
1013 PR	1329,4	1,94	0,8	9,2	320,7	272,5
18 TR	862,5	1,8	1,2	8,8	206,3	158,5
18 PR	1273,7	1,95	0,8	9,2	307,1	258,8
18 PR	1296,9	1,92	0,8	9,2	312,7	264,5
1814 TR	2190,4	2,28	0,5	9,5	531,6	483,1
1814 NR	329,9	1,92	3,0	7,0	75,8	29,9
1814 PR	878,4	1,81	1,1	8,9	210,2	162,3
1816 TR	69,3	1,66	14,4	-4,4	12,0	-22,6
1816 NR	589,3	1,7	1,7	8,3	139,4	92,1
1816 PR	873,7	1,79	1,1	8,9	209,1	161,2
1817 TR	148,4	1,79	6,7	3,3	31,4	-10,9
1817 NR	860,1	1,74	1,2	8,8	205,7	157,9
1817 PR	145,6	1,72	6,9	3,1	30,7	-11,5
1818 TR	589,9	1,71	1,7	8,3	139,5	92,2
1818 NR	733,6	1,74	1,4	8,6	174,7	127,1
1818 PR	857,8	1,76	1,2	8,8	205,2	157,3
1822 TR	314	1,88	3,2	6,8	71,9	26,1
1822 NR	2297,9	1,98	0,4	9,6	558,0	509,4
1822 PR	2880	2,11	0,3	9,7	700,6	651,9

Annexes N° 7 Tableau de quantification des ADNc.

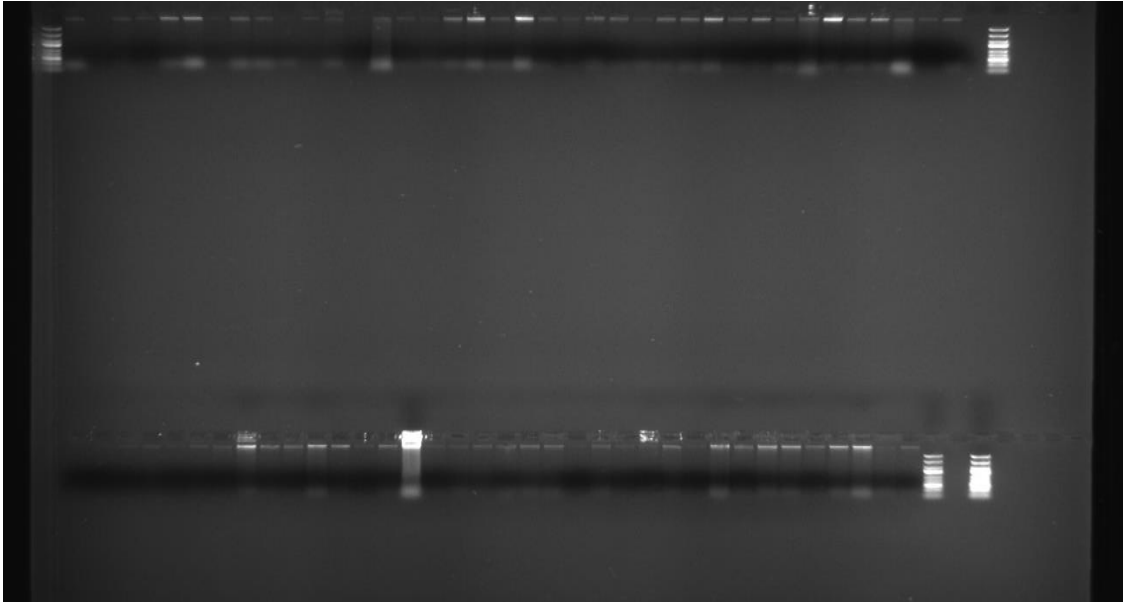
Echantillon	Concentration d'ADNc (ng/μl)	260/280
Ae TF	922,6	1,55
Ae NF	769,7	1,56
Ae NF	866,1	1,58
Oz TF	870,2	1,58
Oz NF	844,9	1,58
Oz PF	887	1,58
Cs 08 TF	957,7	1,57
Cs 08 NF	919,4	1,56
Cs 08 PF	767,3	1,57
Cs 11 TF	847,6	1,58
Cs 11 NF	824,3	1,57
Cs 11 NF	841	1,58
Cs 11 PF	919,9	1,57
10 TF	859,8	1,58
10 NF	910,4	1,57
10 PF	896,7	1,57
1013 TF	782	1,6
1013 NF	884	1,58
1013 PF	926,5	1,56
18 TF	883,5	1,57
18 NF	931,2	1,59
18 PF	836,8	1,54
1814 TF	883,1	1,58
1814 NF	765,5	1,59

1814 PF	889,5	1,57
1816 TF	872,8	1,58
1816 NF	872,5	1,57
1816 PF	883,9	1,56
1817 TF	890,2	1,59
1817 NF	904,9	1,56
1817 PF	914	1,6
1818 TF	916,5	1,57
1818 NF	988,8	1,58
1818 PF	881,5	1,57
1822 TF	875,3	1,56
1822 NF	923,5	1,55
1822 PF	782,9	1,55
Ae TR	786,4	1,56
Ae NR	844,5	1,55
Ae PR	836,9	1,55
Oz TR	852,1	1,55
Oz NR	586,6	1,5
Oz PR	577,9	1,45
Cs 08 TR	852,9	1,56
Cs 08 NR	838,4	1,54
Cs 08 PR	832,2	1,57
Cs 11 TR	785,5	1,57
Cs 11 NR	694,5	1,53
Cs 11 PR	825,6	1,54
10 TR	934,3	1,55
10 NR	921,9	1,55
10 PR	843,8	1,56
1013 TR	761,7	1,54

1013 NR	861,2	1,55
1013 PR	829,3	1,55
18 TF	849,9	1,56
18 PF	876,1	1,55
18 PF	900,4	1,57
1814 TF	844,5	1,56
1814 NF	874,7	1,56
1814 PF	867	1,57
1816 TF	810,1	1,55
1816 NF	846,4	1,56
1816 PF	845,9	1,57
1817 TF	844,5	1,57
1817 NF	789,8	1,55
1817 PF	817,7	1,56
1818 TF	858,9	1,57
1818 NF	806,8	1,58
1818 PF	858,5	1,57
1822 TF	668,4	1,55
1822 NF	750,1	1,52
1822PF	708,7	1,52
ADN + 1	50,9	1,8
ADN +2	48,4	2,03
ADN – 1	37,3	1,91
ADN -2	26,3	1,95

Annexes N° 8

Vérification de la qualité d'extraction d'ARN des racines et des feuilles d'*Aegilops geniculata*, blé dur variété *Ouad Zenati*, les variété de blé tendre *chinese spring* Cs 08, Cs11 et les lignée du croisement d'*Aegilops geniculata* X *Ouad Zenati* sur un gèle d'agarose de 1% à 130 v.



Annexes N° 9

vérification de l'expression du gène TaSTRG chez d'*Aegilops geniculata*, blé dur variété *Ouad Zenati*, les variété de blé tendre *chinese spring* Cs 08, Cs11 et les lignée du croisement d'*Aegilops geniculata* X *Ouad Zenati* sur un gèle d'agarose de 1.7 % à 130 v.

