

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
*Université Saad DAHLAB - Blida 1*



*Faculté des sciences de la nature et de la vie*  
*Département des Biotechnologies*  
*Spécialité : biotechnologie végétale et amélioration des plantes*

*Projet de fin d'études*  
*En vue de l'obtention d'un diplôme de Master académique*  
*Science de la Nature et de la Vie*

## **Thème**

***Caractérisation morphologique et moléculaire de  
quelques variétés de blé dur***

***Triticum durum***

**Présenté par :**

**Le : 10/07/2018**

*M<sup>elle</sup> MIDOUN Kaouther*

*M<sup>elle</sup> BOUALBANI Fatma*

*Devant le jury :*

<b>M BENMOUSSA M.</b>	<b>Professeur</b>	<b>USDB</b>	<b>Président</b>
<b>M<sup>me</sup> KEBOUR D.</b>	<b>M.C.A.</b>	<b>USDB</b>	<b>Promotrice</b>
<b>M<sup>me</sup> DJENADI C.</b>	<b>A.R.</b>	<b>INRA</b>	<b>Co-promotrice</b>
<b>M<sup>me</sup> AYADI R.</b>	<b>M.C.B</b>	<b>USDB</b>	<b>Examinatrice</b>

***Promotion : 2017/2018***



## **Remerciements**

*Nous tenons tout d'abord à remercier et en premier lieu **ALLAH, le Tout Puissant et Miséricordieux** qui nous a donné la force, la volonté et le courage pour mener à bonne fin ce modeste travail.*

*Nos sincères remerciements et nos profondes reconnaissances vont à nos Directrices du mémoire **M<sup>me</sup> KEBOUR Dj.** et **M<sup>me</sup> DJENADI C.** pour leurs dévouements, leurs conseils et leurs soutiens tout au long de l'élaboration de ce travail.*

*A **M<sup>me</sup> KEBOUR Dj,***

*Pour avoir accepté de tenir ce rôle, pour votre soutien, vos conseils qui nous ont été précieux, votre qualité d'enseignement et pour votre orientation ficelée durant toute la période du travail.*

*A **M<sup>me</sup> DJENADI C,***

*Pour votre gentillesse, votre soutien et pour la disponibilité dont vous avez fait preuve malgré l'éloignement ainsi que vos précieux conseils.*

*Nos vifs remerciements à **Mr BENMOUSSA M.** d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous exprimons nos sincères remerciements à **M<sup>me</sup> AYADI R.** pour nous avoir accordé l'honneur d'examiner notre travail.*

*Nous aimerions également remercier vivement tous les membres de l'institut national de recherche Agronomique **INRA**, ainsi que les membres de laboratoire de physiologie et amélioration des plantes pour leurs grandes sympathies et leurs conseils.*

*Nos pensées vont à tous les enseignants qui ont participé à notre formation.*

*Finalement, un grand merci à tous ceux et toutes celles qui d'une manière ou d'une autre nous ont aidé et soutenu de près ou de loin.*

## **Dédicaces**

***Au terme de ce modeste travail, il m'est agréable d'adresser mes dédicaces :***

***En premier lieu, à mes Parents,***  
*Pour votre amour ainsi que les valeurs que vous m'avez transmises et qui m'ont permis d'avancer dans la vie.*  
*Pour les sacrifices, conséquents, que vous avez faits pour me permettre de suivre la voie que je voulais.*  
*Consciente que je n'en serai pas là aujourd'hui sans vous, voyez en ce travail toute ma gratitude et mon amour.*  
*Sans eux, je n'en serais pas là. « Que Dieu vous protèges »*

***A la mémoire de mes grands-parents,***  
*J'aurais tellement aimé vous avoir à mes côtés aujourd'hui, afin que vous puissiez voir ce que je suis devenue. Sachez que vous êtes présents dans mon cœur et que votre souvenir me rend forte au quotidien.*  
***« Que vos âmes reposent en paix »***

***A ma précieuse et unique sœur Imane et son mari,***  
*Pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*  
***A mes chers frères,***  
*Abd Errahim, Abd Ennour, Abd Essalem et le petit Younes.*

***A mes tantes, oncles, cousins, cousines, et tous les membres de la famille MIDOUN et la famille RAMDHANI,***  
*Merci pour votre amour et votre soutien.*

***A ma super et formidable binôme***  
***Fifi.***

***A mes anges,***  
*Je ne sais pas comment exprimer mes vives reconnaissances à mes âmes sœurs ; Yamina, Bouchra et Naima pour votre compréhension, votre soutien et vos encouragements ainsi que votre amour et.*

***A mes chères sœurette,***  
*Khadija, Soumia, Sarah, Ahlem, Amina,*  
***Hiba, Razika,***  
***A mes amies,***  
*De la promotion et surtout les Biotechnologie végétale pour les moments inoubliables que j'ai vécus avec vous.*

***A tous mes camarades,***  
*De la Faculté et d'ailleurs, merci pour votre présence et votre réconfort.*

***Kaouther,***



## ***Dédicaces***

*Avant et après tout, ALHAMDOULI ALLAH, enfin mon rêve se réalise !*

*Je dédis ce travail à:*

*mes chers parents qui m'ont éclairé le chemin de la vie par leur grand soutien et leurs encouragements, par leurs dévouements exemplaires et les énormes sacrifices qu'ils m'ont consentis durant mes études et qui ont toujours aimé me voir réussir*

*Merci à **mon père** pour sa présence et son exemple, et m'avoir aidé dans les différentes étapes de ma vie étudiante et future vie professionnelle. Merci à **ma mère** pour sa grande douceur et sa grâce inspirante.*

*A **mes frère** Abderrahmane et Mohamed et Abderezak.*

*A **ma grande mère**.*

*A **tous membre de ma famille**.*

*A **tous mes cousins et cousines**.*

*A **ma belle sœur** Asmaa.*

*A **mes chers amies** : Djamila, Khadija, Soumia , Bouchra , Naïma .*

*A **mon binôme** Kaouther*

*A **mes collègues de promotion de biotechnologie végétale 2017-2018**.*

*A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin et à tous ceux que j'aime je dédie ce modeste travail avec amour, reconnaissance et honneur.*

***Fatma,***





## Tableau des matériels

Introduction .....	1
<b>Chapitre 1 : synthèse bibliographique</b>	
<b>1. Généralité sur le blé dur .....</b>	<b>3</b>
1.1 l'importance de la culture de blé .....	3
1.1.1 Dans le monde .....	3
1.1.2 En l'Algérie .....	3
1.2 Origine génétique .....	4
1.3 Origine géographique .....	6
1.4 Description de la plante.....	7
1.4.1 Caractéristique de la plante .....	9
1.4.1.1 Caractéristiques morphologiques et physiologiques .....	9
1.4.1.1.1 Le système racinaire .....	9
1.4.1.1.2 Systèmes aériens .....	9
1.4.2 le Cycle du développement.....	10
1.5 Exigence du blé.....	12
1.5.1 Température .....	13
1.5.2 Eau.....	13
1.5.3 Eclairage.....	13
1.6. Facteur limitant la production de blé dur.....	13
1.6.1 Caractéristique de quelques maladies sur le blé.....	15
1.6.1.1 Rouilles .....	15
1.6.1.2 Septoriose.....	16
1.6.1.3 Oïdiums .....	17
<b>2. les biotechnologie et leurs impacts sur l'amélioration des plantes.....</b>	<b>18</b>
2.1 Apport de biotechnologie dans l'amélioration génétique.....	18
2.1.1 La mutagenèse .....	19
2.1.2 La culture des cellules et des tissus.....	19
2.1.3 Transgénèse.....	19
2.2 Marqueurs moléculaire.....	19
2.2.1. Historique .....	19
2.2.2. Marqueurs génétiques .....	20
2.3. Les caractéristiques d'un bon marqueur génétique .....	20
2.4. Marqueur génétique moléculaire .....	20
2.5. Les différents types de marqueurs moléculaires .....	21
2.5.1. Marqueurs dominants révélés en masse (marqueurs anonymes) .....	21
2.5.2 Marqueurs codominants révélés individuellement .....	21
2.5.3 Marqueurs révélés par la technique PCR .....	22
2.6. les principaux sources de marqueurs moléculaires .....	22
2.6.1. critère de classification .....	22
2.6.2. Les marqueurs RFLP .....	23
2.6.3. Les marqueurs RADP .....	23
2.6.4. les marqueurs ISSR .....	24

2.6.5. Les marqueurs AFLP .....	24
2.6.6 Les marqueurs SNP .....	25
2.6.7. Les marqueurs Microsatellites ou SSR .....	25
2.6.8 STS.....	26
2.7 La technique de la PCR .....	28
2.7.1Principe de la PCR.....	29
2.7.1.1Etapes de réalisation de la PCR .....	29
2.7.2 Etapes de réalisation de la PCR .....	29
2.8 Utilisation de la sélection assistée par les marqueurs (SAM) .....	33
2.8.1 sélection pour la résistance aux maladies cryptogamiques .....	33
2.8.2 Sélection pour la tolérance aux stress abiotiques .....	34
2.9 Résistance aux maladies et parasites .....	35
2.9.1 Importance de l'amélioration génétique .....	35
2.9.2 Contrôle génétique de la résistance .....	35
2.9.3 Amélioration de la résistance .....	36

## **Chapitre2 : Matériel et méthodes**

3.1 Site de l'expérimentation .....	37
3.2 Matériel.....	37
3.2.1 Matériel végétal .....	37
3.2.2 Equipements et produits de laboratoire .....	47
3.3 Méthodes .....	47
3.3.1 Germination .....	47
3.3.2Transplantation.....	48
3.3.3 Echantillonnage .....	48
3.4 Génotypage de blé dur .....	49
3.4.1. Prélèvement de feuille .....	49
3.4.2. Broyage de feuilles .....	50
3.4.3. Extraction d'ADN .....	50
3.4.3.1.Quantification d'ADN .....	53
3.4.3.1.1.Dosage de l'ADN .....	53
3.4.3.1.2 Quantification de l'ADN par l'électrophorèse.....	53
3.4.3.1.3 Quantification d'ADN par spectrophotométrie .....	54
3.4.3.2 La réaction de polymérisation en chaîne PCR .....	55
3.4.3.3 Electrophorèse des produits de la réaction PCR .....	57
3.5Phénotypage .....	58
3.5.1 La longueur de la tige .....	58
3.5.2 Longueur de l'épi .....	58
3.5.3 Nombre des nœuds .....	59
3.5.4 Nombre de grains par épi .....	59
3.5.5 Poids de mille grains .....	60
3.5.6 Nombre d'épillets total par épi.....	60
3.5.7 Nombre d'épillets stériles et fertiles par épi .....	61
3.5.8 Nombre de talles par plante.....	61
3.6. analyses statistique .....	62

## **Chapitre 3 : Résultats et discussion**

<b>4.1.Génotypage</b> .....	<b>63</b>
4.1.1 Virification de la qualité et la quantité d'ADN extrait .....	<b>63</b>
4.1.1.1 quantification de l'ADN par spectrophotométrie.....	<b>63</b>
4.1.1.2 qualités d'extraction sur gel d'agarose.....	<b>64</b>
4.2 Analyses de polymorphisme des génotypes avec 3 marqueurs .....	<b>65</b>
4.2.1 Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 34.....	<b>66</b>
4.2.2 Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 46 avec les marqueursXwmc44et Xgwm140 .....	<b>68</b>
<b>4.3.phénotypage</b> .....	<b>71</b>
4.3.1 La longueur de tige.....	<b>71</b>
4.3.2 La longueur de l'épi.....	<b>72</b>
4.3.3Nombre des nœuds .....	<b>73</b>
4.3.4Nombre de grains par épi .....	<b>74</b>
4.3.5Poids de mille grains .....	<b>75</b>
4.3.6Nombre de l'épillet total .....	<b>76</b>
4.3.7Nombre d'épillets stériles et fertiles par épi .....	<b>77</b>
4.3.8 Nombre de talles par plante.....	<b>79</b>
<b>Conclusion</b>	
1. Conclusion.....	<b>80</b>
2.Perspective.....	<b>81</b>
<b>Référence bibliographique</b>	
<b>Annexes</b>	

## Abstract

The objective of our study is characterization of 41 durum wheat genotypes (TriticumdurumDesf). Using molecular markers of the repeated sequence type (SSR microsatellites) and STS (SequenceTagged Site).

During the study, all SSR and STS reactions were performed from the leaves extracted from the 41 genotypes. The polymorphism is revealed using 3 markers: Lr34, Xwmc44, Xgwm140, related to traits of interest for durum wheat (resistance to rust). Thus the morphometric characterizations measured and calculated using Gene stat software.

The results of the durum wheat genotype analysis showed amplifications for the majority of genotypes concerning the Lr46, Lr34 genes. This molecular study is materialized externally by the phenotypic characters represented by the morphologies (height of the stem, length of the ear, number of talle per ear, number of nodes, number of seeds per ear, weight of thousand grains, number of total spikelets per ear). According to the results obtained, the genotypes have been separated into groups which gather together by common morphological characters.

**Key words:** TriticumdurumDesf, Durum wheat, SSR, STS, Gene, Phenotyping, Genotyping, Amplification.

## Résumé

L'objectif de notre étude est caractérisations 41 génotypes de blé dur (*Triticum durum Desf*). En utilisant des marqueurs moléculaires du type séquences répétées (microsatellites SSR) et STS (Sequence Tagged Site).

Au cours de l'étude, toutes les réactions de SSR et STS ont été effectuées à partir des feuilles extraites des 41 génotypes. Le polymorphisme est révélé à l'aide de 3 marqueurs : Lr34, Xwmc44, Xgwm140, liés à des caractères d'intérêt pour le blé dur (résistance à la rouille). Ainsi les caractérisations morphométriques mesurées et calculées à l'aide de logiciel Gene stat .

Les résultats de l'analyse de génotype de blé dur ont montré des amplifications pour la majorité des génotypes concernant les gènes Lr46, Lr34. Cette étude moléculaire est matérialisée extérieurement par les caractères phénotypiques représentés par les morphologies (hauteur de la tige, longueur de l'épi, nombre de talle par épi, nombre de nœuds, nombre de graines par épi, poids de mille grains, nombre d'épillets totales par épi). Selon les résultats obtenus, les génotypes ont été séparés en groupes qui se rassemblent entre eux par les caractères morphologiques communs.

**Mots clés :** *Triticum durum Desf* , Blé dur , SSR ,STS, Gène , Phénotypage, Génotypage , Amplification.

### الملخص:

الهدف من دراستنا هو توصيف 41 من التراكيب الوراثية للقمح الصلب (Triticum durum Desf). عن طريق استخدام الوسامات الجزئية من نوع التسلسل المكرر (SSR) و تسلسل معلم الموقع (STS).

خلال الدراسة تم إجراء كل تفاعلات SSR و STS من الأوراق المستخرجة من 41 تراكيب جينية. و تم الكشف عن تعدد الأشكال باستخدام 3 وسامات: Lr34، Xgwm140، Xwmc44، المتعلقة بالصفات المفيدة للقمح القاسي (مقاومة الصدأ). وهكذا تم قياس الخصائص المورفومترية باستخدام برمجيات Gene stat.

أظهرت نتائج التحليل الوراثي للقمح القاسي تضخما لغالبية التراكيب الوراثية المتعلقة بالجينات Lr46, Lr34. و تتحقق هذه الدراسة الجزئية خارجيا من قبل الصفات الظاهرية التي تمثلها العوامل المورفولوجيا ( ارتفاع الساق, طول السنبل, عدد البذور في السنبل, عدد العقد, عدد البذور لكل أذن, ووزن ألف حبة, ...). ووفقا للنتائج المتحصل عليها تم فصل السلالات الوراثية في مجموعات متقاربة في الصفات المورفولوجيا المشتركة.

**الكلمات المفتاح:** القمح الصلب، الوسامات الجزئية، الجينات، المورفولوجية، التوصيف الجيني، التعدد.

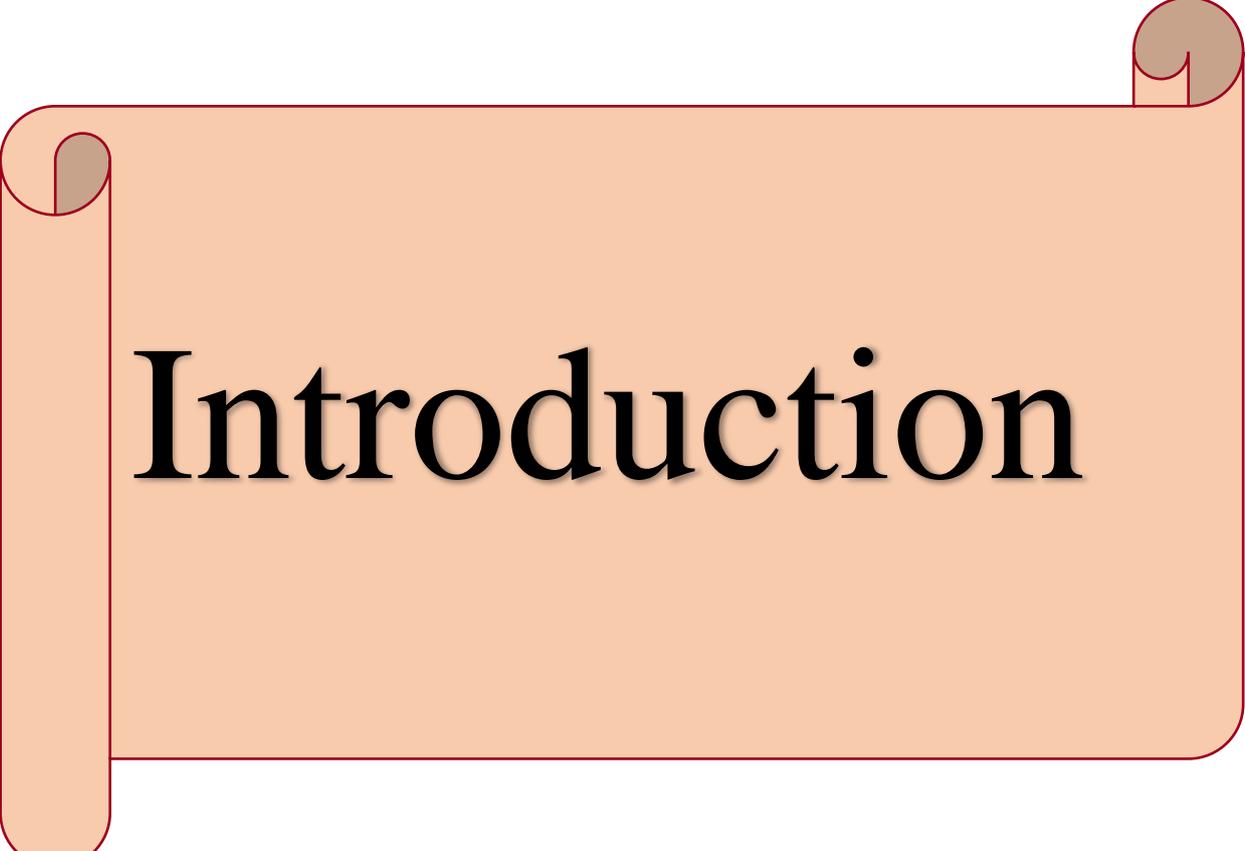
## Liste des abréviations

- ADN : Acide Désoxyribonucléique.
- An : Année.
- AFLP : Amplified fragment length polymorphism.
- ARN : Acide Ribonucléique.
- BET : Bromure d'éthidium.
- CV : Coefficient de variation.
- CTAB : Cetyltriméthylammonium bromide (Bromure de cetyltriméthylammonium).
- DDL : Degré de liberté.
- DO : Densité optique.
- EDTA : Ethylène-diamine-tétraacétique.
- EST : Expressed Sequence Tags.
- FAO : Food and Agriculture Organization.
- Fig : Figure.
- INRAA : Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.
- ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures.
- Kpb : Kilo paire de base.
- LR : Populations de lignées recombinantes.
- Lr : Leaf Rust : la rouille brune.
- LSD : Least significant difference method
- Nm : Nanomètre.
- PCR : Polymerase Chain Reaction.
- Ph : Potentiel hydrogène.
- PMG : Poids de milles grains.
- QTL : Quantitative Trait Locus.
- RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA.
- Rht : Gène de nanisme.
- RFLP : Restriction fragment length polymorphism.

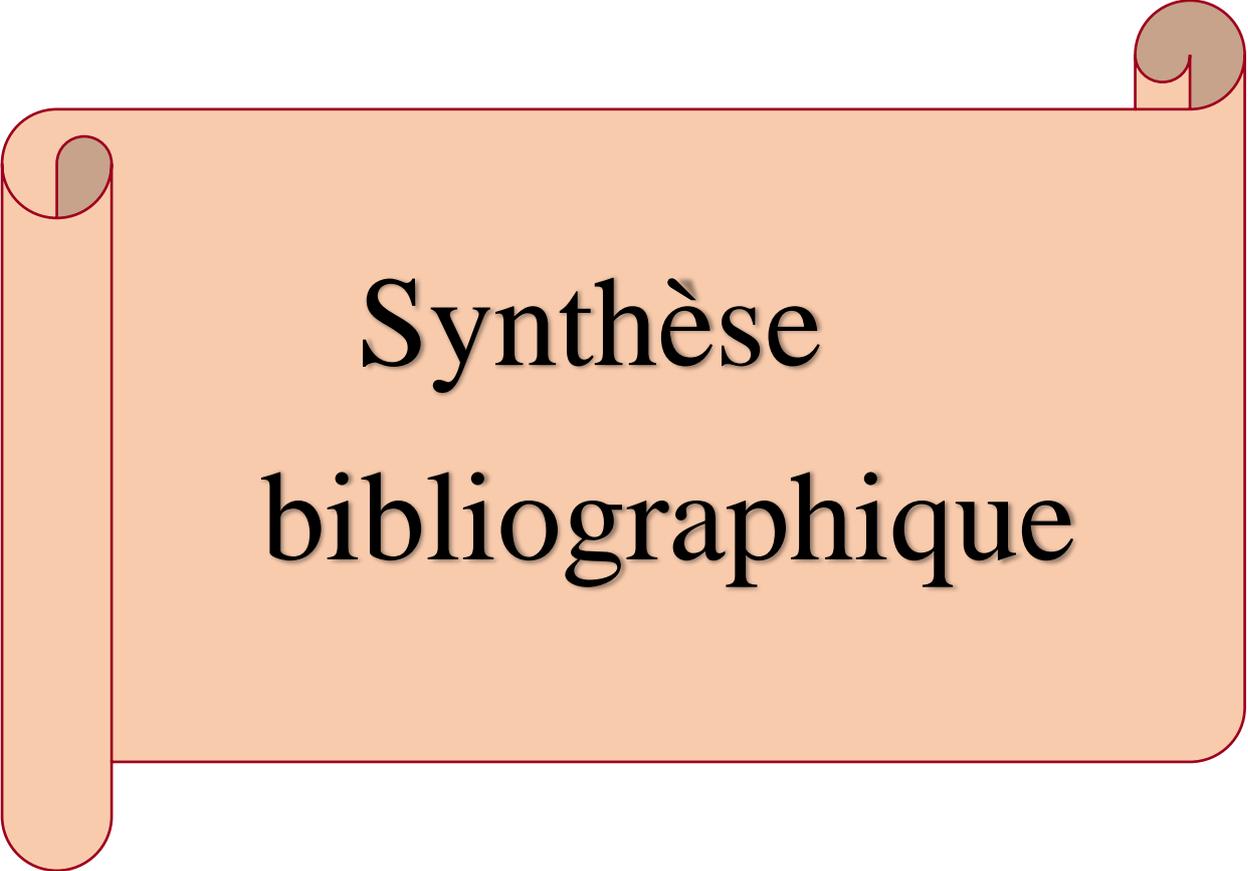
## Liste des abréviations

---

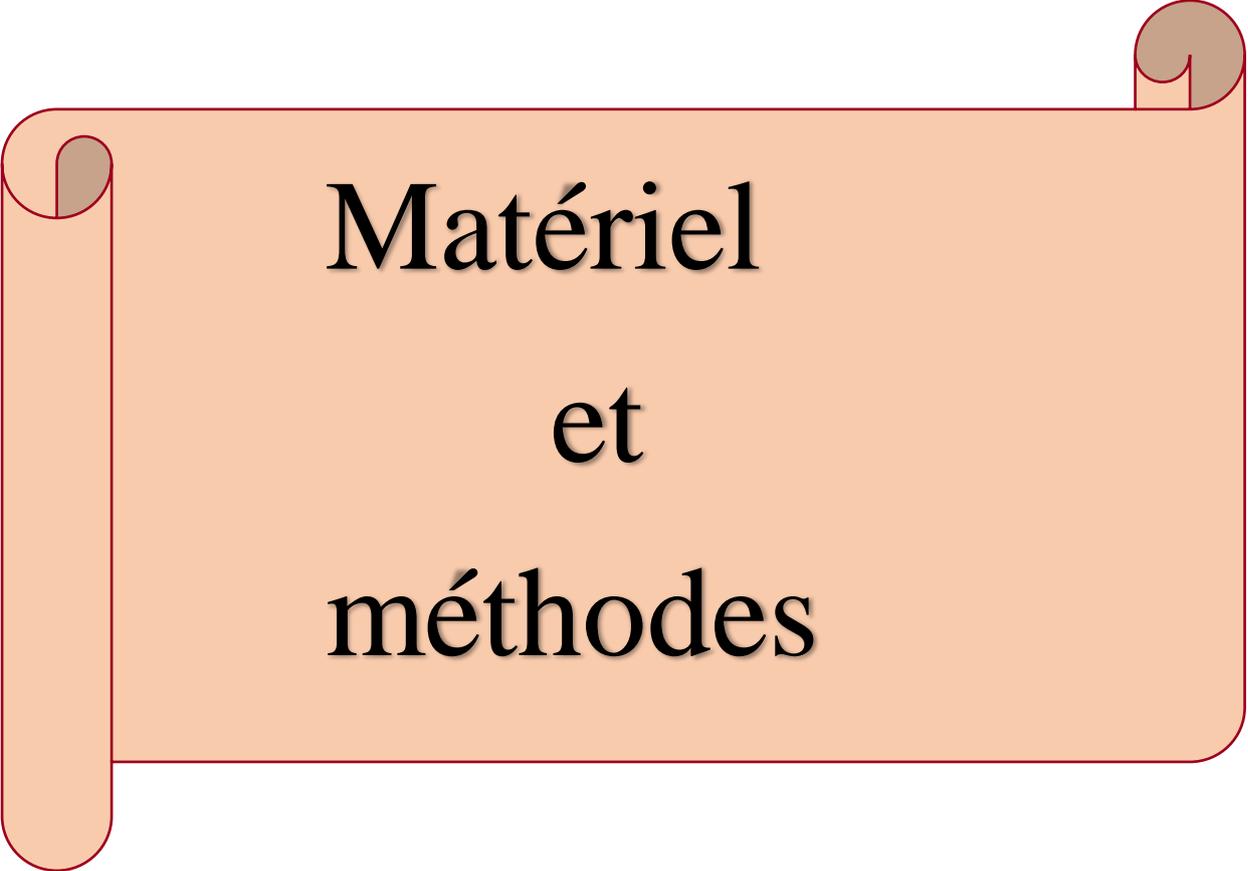
SCAR :	Sequence Characterized Amplified Regions.
SNP :	Single nucleotide polymorphism.
Sr :	Stum Rust : la rouille noire.
SSR :	Simple Sequence Repeat.
STS :	Sequence Tagged Site.
Tab :	Tableau.
TBE :	Tris-HCl, boric acid, EDTA.
v :	Volte.
UV :	Ultra-violet.



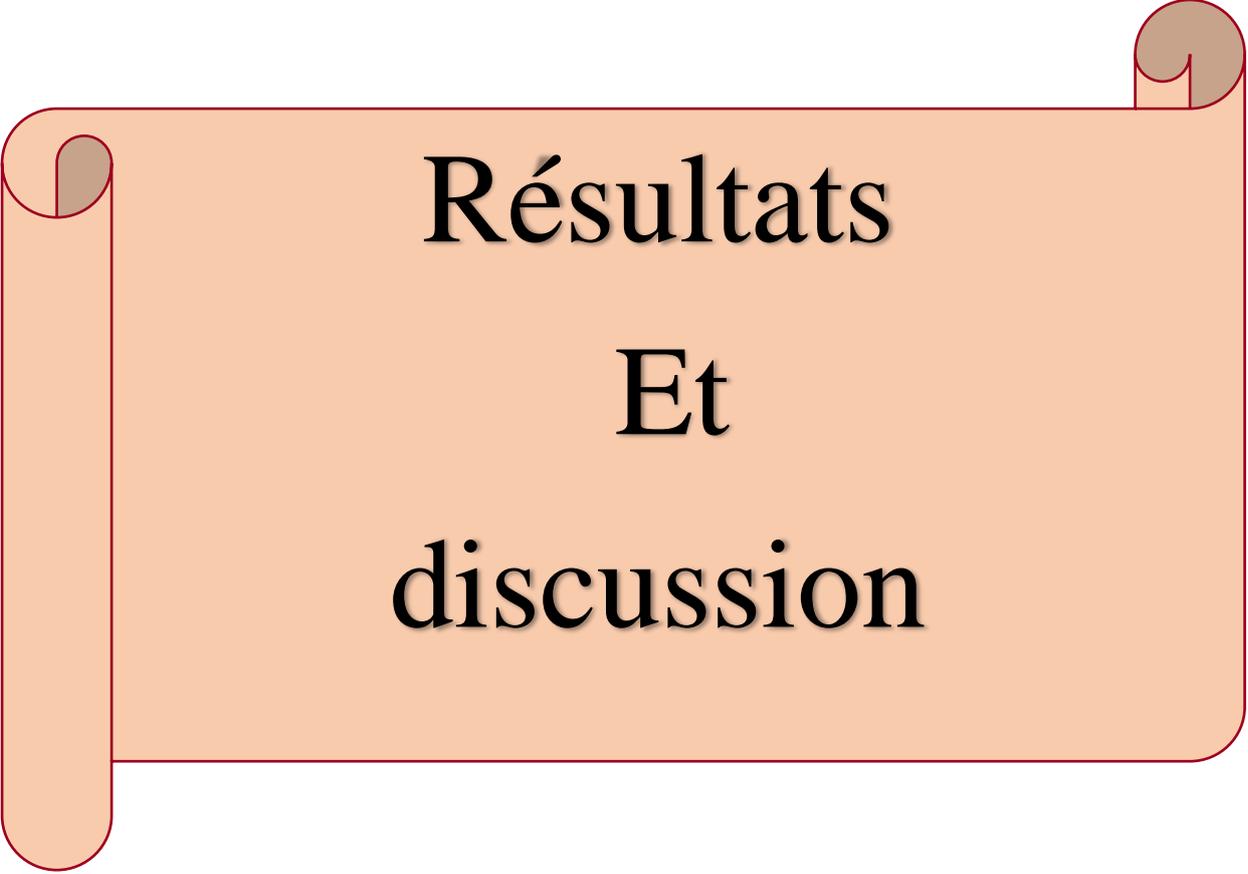
# Introduction



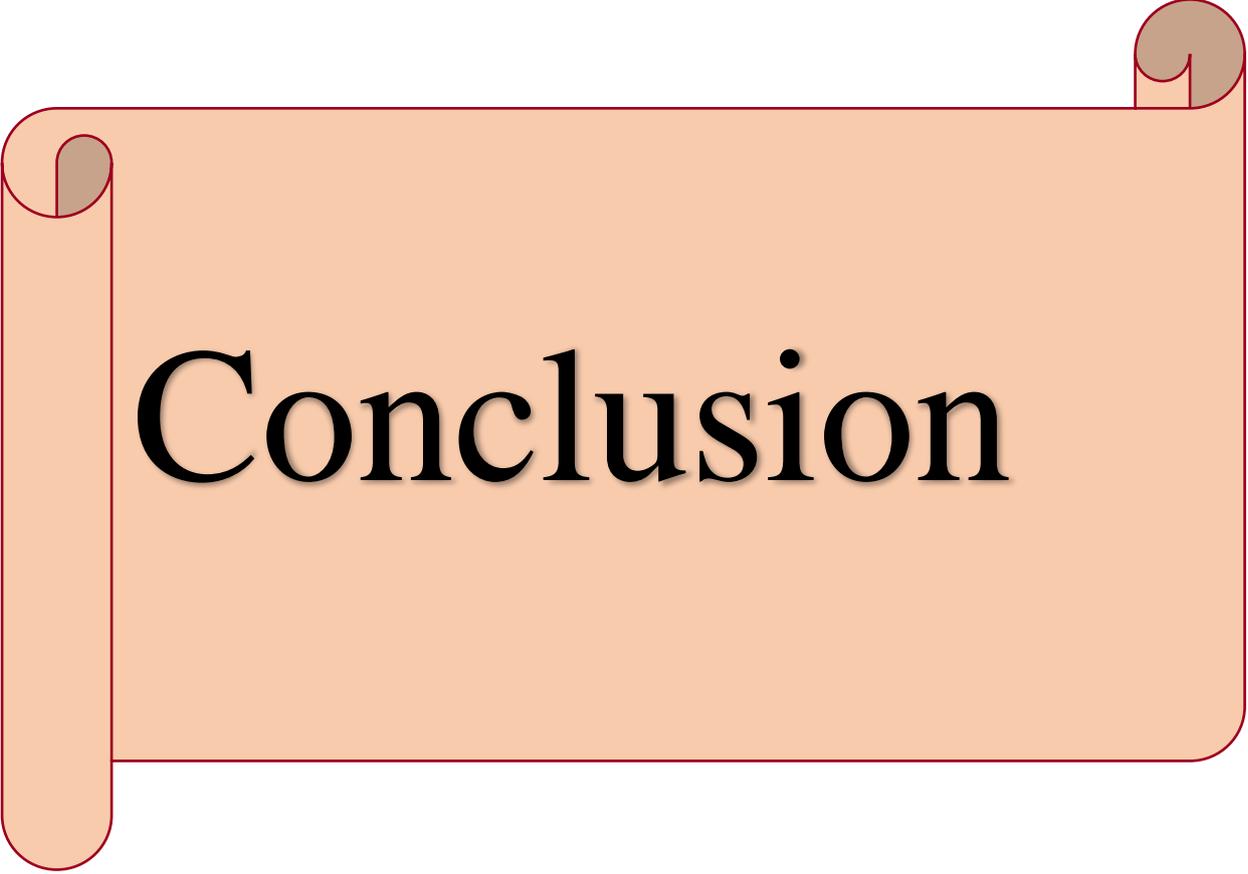
**Synthèse**  
**bibliographique**



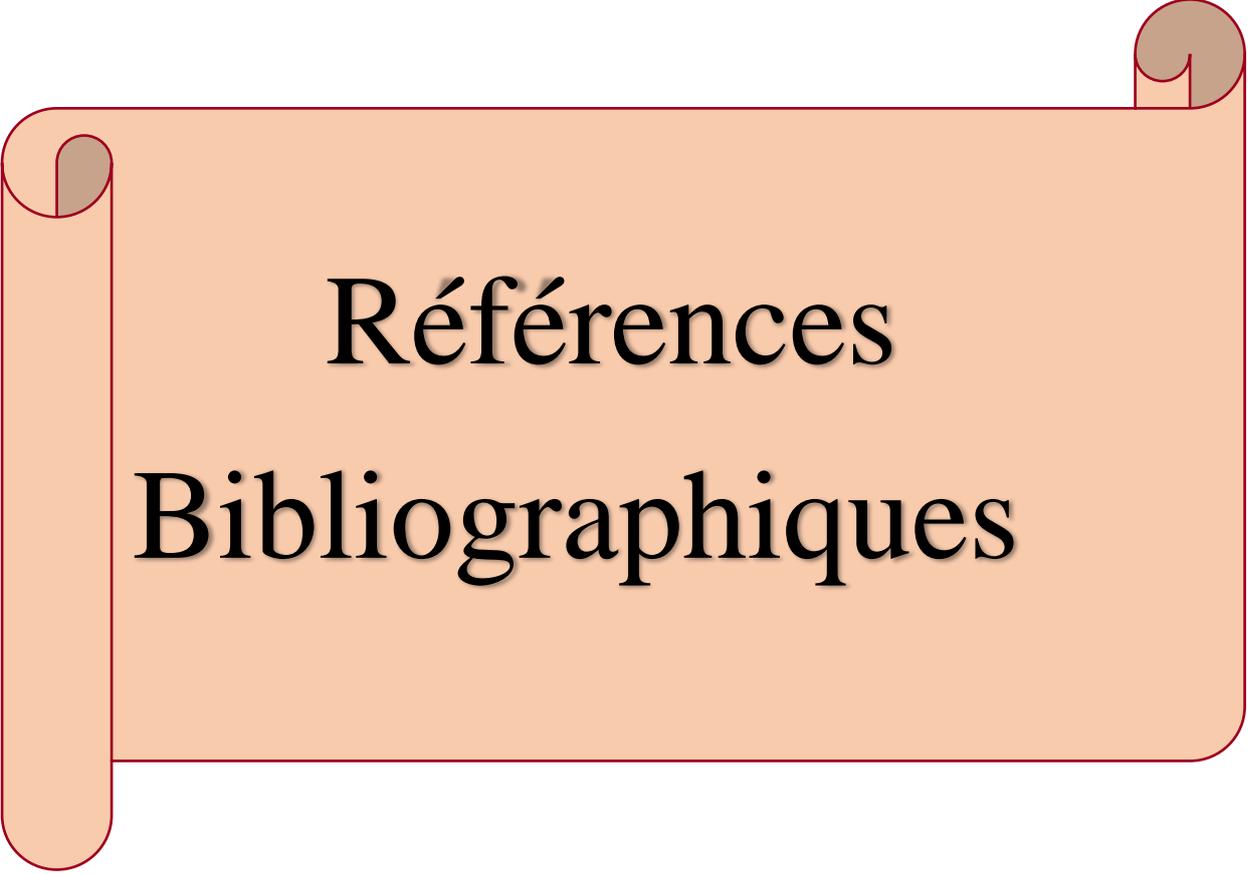
**Matériel  
et  
méthodes**



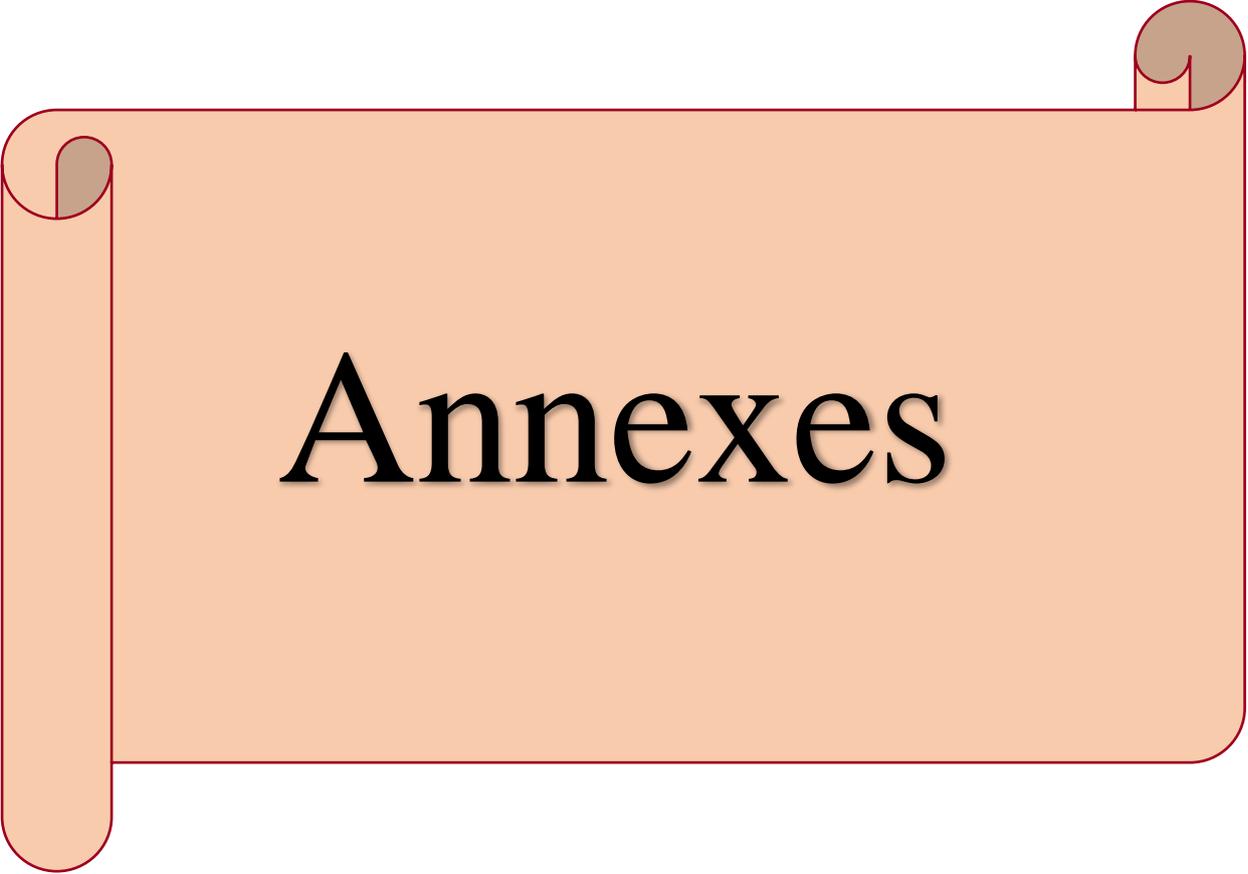
Résultats  
Et  
discussion



# Conclusion



# Références Bibliographiques



# Annexes

## Liste des figures

<b>Figure 1.1</b> :Variation de la production des céréales durant la période 2000-2007	4
<b>Figure 1.2</b> : diagramme schématique des relations entre les génomes du blé avec l'histoire et la généalogie de polyploidisation.....	5
<b>Figure 1.3</b> : Distribution des diploïdes sauvages.....	7
<b>Figure 1.4</b> : les différents stades de développement du blé dur.....	10
<b>Figure 1.5</b> : La septoriose .....	16
<b>Figure 1.6</b> :L'oïdium .....	17
<b>Figure 2.1</b> : Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR.....	30
<b>Figure 2.2</b> : Bandes d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose .....	33
<b>Figure 3.1</b> : La serre en verre où a été réalisée notre expérimentation .....	37
<b>Figure 3.2</b> :Germination de blé dur.....	47
<b>Figure 3.3</b> : Transplantation des variétés du blé dur.....	48
<b>Figure 3.4</b> : Prélèvement de feuille.....	49
<b>Figure 3.5</b> : Broyage de feuilles.....	50
<b>Figure 3.6</b> : principaux étapes d'extraction d'ADN .....	52
<b>Figure 3.7</b> : Quantification d'ADN par électrophorèse.....	54
<b>Figure 3.8</b> : Quantification d'ADN par spectrophotométrie.....	55
<b>Figure 3.9</b> : Les étapes d'électrophorèse sur gel d'Acrylamide et la révélation sur lampe des UV .....	57
<b>Figure 3.10</b> :Mesure de la longueur de tige du blé dur.....	58
<b>Figure 3.11</b> : Mesure la longueur de l'épi du blé dur.....	58
<b>Figure 3.12</b> : nombre des nœuds de blé dur.....	59
<b>Figure 3.13</b> : nombre des grains par épi de blé dur.....	59

<b>Figure 3.14:</b> Mesure le poids de milles grain de blé dur.....	60
<b>Figure 3.15 :</b> nombre d'épillets total de blé dur.....	60
<b>Figure 3.16 :</b> nombre de talle par plant de blé dur (source personnelle).....	61
<b>Figure 4.1:</b> analyse de la qualité et la quantité d'extraction d'ADN des échantillons de blé dur étudié par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.....	65
<b>Figure 4.2:</b> Polymorphisme des génotypes avec marqueur STS pour le gène Lr34 .....	67
<b>Figure 4.3:</b> Polymorphisme des génotypes avec marqueur SSR pour le gène Lr46 avec le marqueur X gwm 44.....	69
<b>Figure 4.4 ;</b> Polymorphisme des génotypes avec marqueur SSR pour le gène Lr46 avec le marqueur X gwm 140.....	70
<b>Figure 4.5 :</b> longueur de tige de génotypes étudiés.....	71
<b>Figure 4.6 :</b> longueur de lépi de génotypes étudiés .....	72
<b>Figure 4.7 :</b> nombre des nœuds de génotypes étudiés .....	73
<b>Figure 4.8 :</b> nombre des grains par épi de génotypes étudiées.....	74
<b>Figure 4.9 :</b> poids de mille grains de de génotypes étudiées .....	75
<b>Figure 4.10 :</b> nombre d'épillets total de génotypes étudiées.....	76
<b>Figure 4.11 :</b> nombre d'épillet fertile de génotypes étudiée.....	77
<b>Figure 4.12 :</b> nombre d'épillets stérile de génotypes étudiées .....	77
<b>Figure 4.13 :</b> nombre de talles par plante de génotypes étudiées.....	79

### Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1 :</b> Les principales maladies fongiques du blé.....	14
<b>Tableau 2.1:</b> Place des biotechnologies dans un programme d'amélioration des plantes.....	18
<b>Tableau 2.2:</b> classification des techniques de marquage moléculaire.....	22
<b>Tableau 2.3:</b> avantage et inconvénients des marqueurs SSR.....	26
<b>Tableau 2.4 :</b> Les caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.....	27
<b>Tableau 3.1 :</b> Liste des génotypes de blé dur étudiés .....	38
<b>Tableau 3.2 :</b> Caractéristique de quelques variétés de blé dur.....	39
<b>Tableau 3.3 :</b> Composition du mélange réactionnel de la PCR .....	55
<b>Tableau 3.4. :</b> Microsatellites testés pour l'analyse des génotypes de blé dur.....	56
<b>Tableau 4.1 :</b> quantification d'ADN extraites chez les différents génotypes étudiés.....	63

### Introduction

Dans le système agricole, les céréales (blés, orge et riz.....) occupent une place primordiale à l'échelle mondiale. Elles sont considérées comme une principale source de la nutrition humaine (Slama *et al.*, 2005). Les deux espèces de blé les plus cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum* L.) avec plus de 90% de production mondiale et le blé dur (*Triticum durum* Desf.) qui constitue 5% de celle-ci (Gooding, 2009). Selon la FAO (2016), la production mondiale de blé en 2016 s'établirait à 723 millions de tonnes.

En Algérie, cette production a atteint 3,30 millions de tonnes pendant la campagne agricole 2014/2015 (FAO, 2015). Par ailleurs, la filière des céréales constitue la ration alimentaire quotidienne occupant ainsi une superficie de 2.7 millions d'hectares (Benbelkacem, 2013). Étant donné la forte augmentation de la population mondiale dans les années à venir et pour fin de satisfaire la demande alimentaire de l'humanité, il est nécessaire d'augmenter au moins à 60% la quantité des produits agricoles d'ici jusqu'à 2050 (Gallais, 2015). Pour l'Algérie, les besoins d'une population en pleine croissance, la production est estimée à plus 111 million de quintaux vers 2020 (Hervieu *et al.*, 2006).

En effet, l'amélioration génétique du blé a eu pendant longtemps pour objectif l'augmentation de la productivité, et le succès de cette stratégie est lié à l'existence de conditions environnementales favorables, qui permettent l'expression des différents facteurs du rendement.

Pour se faire, la sélection massale qui est une ancienne méthode de sélection agricole, se base sur le choix des semences et répond le mieux aux critères des paysans (Zeven, 1998). Le but principal de tout programme de sélection est la production de variétés possédant un rendement élevé et stable, dont l'environnement dans lequel se fait la sélection joue un rôle important. Tous les milieux n'ont pas la même aptitude à révéler les différences génotypiques et l'existence d'une interaction (génotype x environnement), complique les efforts de la sélection (Sanchez-Garcia *et al.*, 2012). Les marqueurs morphologiques sont déjà connus comme des outils efficaces pour l'estimation de la diversité génétique du blé (Al Khanjari *et al.*, 2008) ainsi que la caractérisation des ressources génétiques est une étape clé pour la sélection (Amallah *et al.*, 2016). De ce fait, les ressources génétiques représentent un

patrimoine qu'il est nécessaire de préserver et de mieux exploiter. Ainsi, pour assurer une agriculture durable, l'étude de la diversité et la caractérisation de ces ressources génétiques sont indispensables pour créer de nouvelles variétés ayant une bonne qualité, un rendement élevé, adaptées aux variations climatiques et résistantes aux diverses maladies (Aguiriano *et al.*, 2006).

C'est dans ce contexte, que nous nous sommes assignées sur les objectifs principaux :

- Phénotypage de 41 géotypes de blé dur selon les caractères quantitatifs suivants : la hauteur de la tige, la hauteur de l'épi ; le nombre de talle par plante, le nombre de graines par épi , le poids de mille grains ,nombre d'épillets total par épi, nombre d'épillets stériles et fertiles par épi, nombre de talles par plante .
- Géotypage de 41 géotypes de blé dur par marqueurs moléculaires liés aux gènes de résistance aux maladies et au nanisme.

### 1. Généralités sur blé dur :

La culture de blé est très ancienne, on trouve ses traces dès le néolithique. Le blé a été cultivé 2700 ans avant notre ère en Chine. Les civilisations babyloniennes et égyptiennes se sont développées autour de blé (Moule, 1980).

#### 1.1 Importance de la culture de (*Triticum durum Desf.*)

##### 1.1.1 Dans le monde

Selon Kantety et al., (2005), le blé dur est cultivé sur 10% des superficies réservées aux céréales (blé dur, tendre, riz et maïs). La culture de cette espèce est surtout localisée dans les pays du pourtour méditerranéen (Algérie, Maroc, Espagne, France, Italie, Grèce, Syrie) et le Kazakhstan, l'Éthiopie, l'Argentine, le Chili, la Russie, le Mexique, le Canada (Ammar et al., 2006).

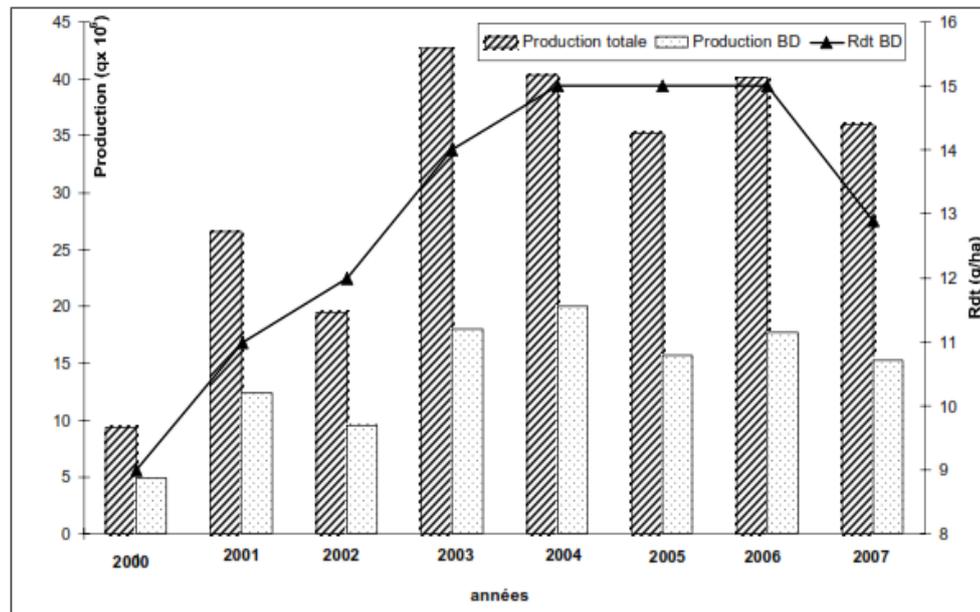
La production mondiale de blé dur est de 29.3 millions de tonnes moyennes annuelles pour la période 1988/1997 (Ade, 2000). Les plus grands producteurs de blé dur dans le monde sont l'Union Européenne avec une moyenne de production de 7.9 millions de tonnes (1987/1997). Cette production est composée de quatre pays membres : l'Italie, la Grèce, la France et l'Espagne, avec une production moyenne annuelle respectivement égale à : 4.1 ; 1.5 ; 1.4 et 0.9 millions de tonnes.

En dehors, de la communauté Européenne des autres pays producteurs sont la Turquie, le Canada, les États-Unis d'Amérique dont la production est respectivement 4.3 ; 4.0 et 2.5 millions de tonnes.

##### 1.1.2 En Algérie :

En Algérie, la superficie consacrée traditionnellement aux céréales varie de 3 à 3.5 millions d'hectares. Le blé dur occupait une place privilégiée suite à son utilisation dans l'alimentation quotidienne de la population sous diverses formes. La superficie moyenne de blé dur varie de 0.82 à  $1.49 \times 10^6$  ha pour la période 2007 à 2007. Les rendements restent faibles et très variables d'une année à l'autre, à l'image de la production qui varie de 4.9 à 20 millions de quintaux/an pour la même période (figure 1.1). La culture des céréales d'hiver demeure encore difficile à maîtriser tant que celle-ci reste confrontée et soumise à plusieurs contraintes (aléas climatiques, faible maîtrise de la biotechnologie, etc.). La faiblesse de la production céréalière en

Algérie découle en majeure partie des faibles potentiels des rendements. Ils est donc impératif de faire accroître des rendements à l'hectare, Parce qu'il est plus possible d'étendre des superficies consacrées aux céréales d'hiver (Benbelkacem et Kellou,2001).



**Figure I.1.** Variation de la production des céréales durant la période 2000-2007.

### 1.2 Origine génétique :

L'allopoléidie a joué un rôle fondamental dans l'évolution des plantes en permettant l'apparition de type nouveaux qui n'ont souvent que de lointains rapports avec les espèces qui leurs ont donné naissance (Prevost, 1976).

De part leur constitution chromosomique, Boyeldien (1980) ; Simon et *al.*, (1989) distinguent l'existence de trois sous groupes de céréales :

**Le groupe diploïde** ( $2n = 14$  chromosomes) ou engrain.

\**Triticum beoticum*.

\**Triticum monoccum*.

**Le groupe tétraploïdes** ( $2n = 28$  chromosomes) ou groupe de *Triticum dicoccum* (amidonnier) ; on distingue :

\**Triticum diccocoïdes* ou amidonnier sauvage.

\**Triticum turgidum* ou blé poulard.

\**Triticum polonicum* ou blé de Pologne.

\**Triticum durum* ou blé dur

**Le groupe hexaploïdes** ( $2n = 42$ ) ou groupe de *Triticum spelta* (épeautre) ; on distingue :

\**Triticum vulgare* ou blé tendre.

\**Triticum compactum* ou blé hérisson.

Selon Prevost (1976) , les blés à 28 chromosomes sont des allotétraploïdes possédant les génomes A et B .

Prevost (1976) et Griganc (1978), soulignent l'origine hybride des tétraploïdes dont le blé dur (*Triticum durum*), ceux-ci proviendraient du croisement suivi du doublement des chromosomes entre *Triticum monococcum*, apportant le génome A et *Aegilops speltaoides* apportant le génome B.

Une telle hybridation aurait donné naissance au *Triticum diccocoïdes* qui serait diversifié en *Triticum dicoccum* et *Triticum durum* (Moule, 1980).

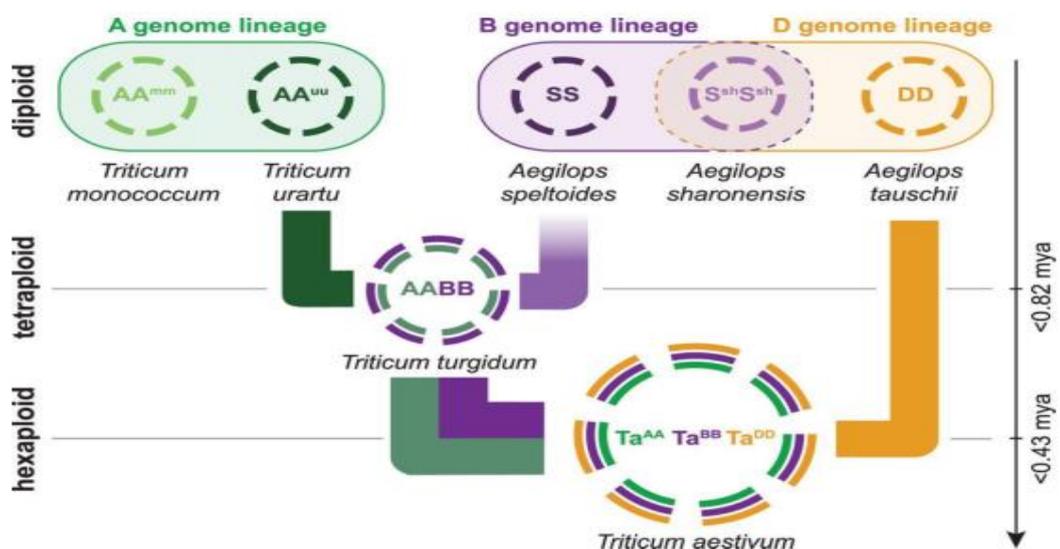


Figure 1.2 : diagramme schématisant des relations entre les génomes du blé avec l'histoire et la généalogie de polyploïdisation (Mayer et *al.*, 2014).

### *1.2 Origine géographique :*

Vavilon cité par Erroux et Luaumont (1961) situe l'origine du blé dur en Abyssinie, ce dernier considérait trois centres d'origine distincts pour les trois groupes d'espèces genre *Triticum* :

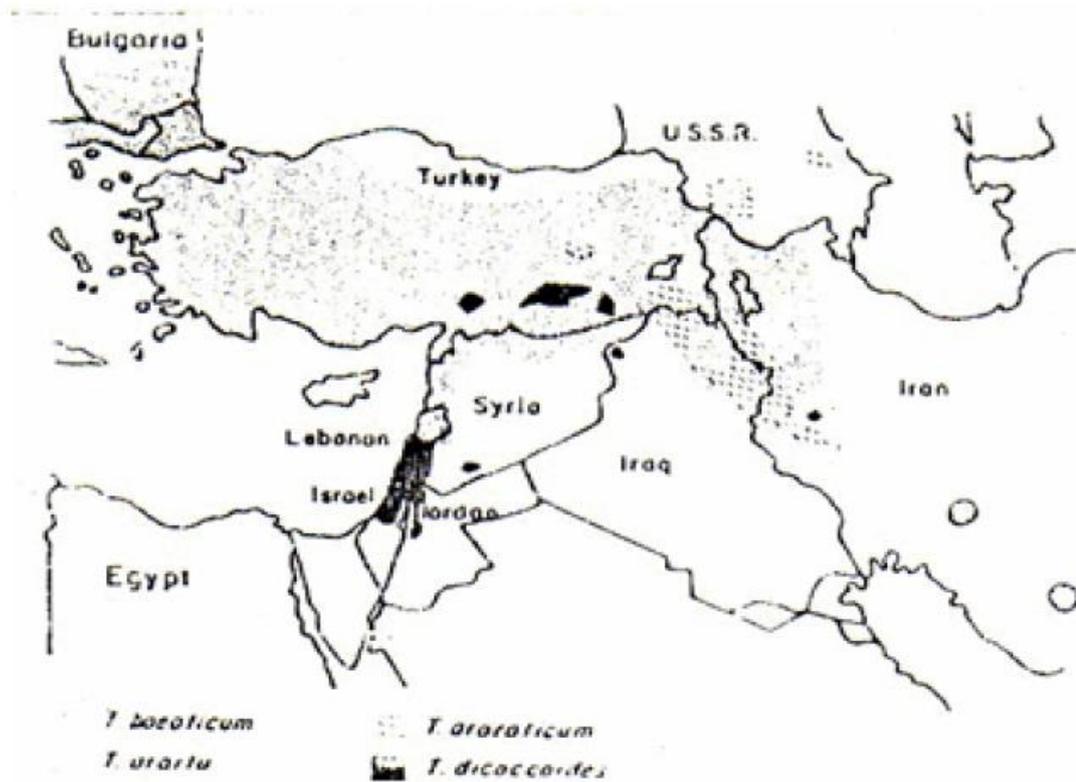
\*Le foyer Syrien et nord Palestinien pour le groupe diploïde.

\*Le foyer Abyssinien pour la diversification des blés tétraploïdes.

\*Le foyer Afghano-Indien pour la diversification des blés hexaploïdes.

L'Algérie se trouvant à proximité de ce centre primaire d'origine, la diversification et le polymorphisme considérable de l'espèce blé dur dans nos régions ont invité Vavilon à considérer l'Afrique du nord comme centre secondaire d'origine du *Triticum durum*.

Griganc (1978), désigne quant à lui le Moyen-Orient comme l'origine géographique où coexisteraient les espèces parentales. Selon le même auteur, c'est à partir de cette zone d'origine que l'espèce s'est différenciée vers trois différentes régions : le bassin occidental de la méditerranée, le Sud de l'ex URSS et le proche orient, chaque centre de différenciation donne des caractères morphologiques et physiologiques particuliers.



**Figure 1.3:** Distribution des diploïdes sauvages *Triticum monococum* Var. *Boeoticum*. *T. Dicoccoïdes* au proche orient (Waines , 1983 in Mekhlouf, 1998).

#### 1.4 Description de la plante :

Le blé dur (*Triticum durum*) est une plante de la classe de Monocotylédones de la famille des Graminées, c'est-à-dire à un groupe de végétaux dont le nom, étymologiquement, signifie « producteur de grains ».

A cette définition assez vague, les botanistes préfèrent le terme plus précis de Poacées, par référence à un genre très commun dans la nature (Mosiniak, *al.*, 2006), de la tribu des Triticées et de genre *Triticum* (Feillet, 2000). Cette famille comprend 600 genres et plus de 5000 espèces (Feillet, 2000 ; Mac Key, 2005).

D'après la classification de Cronquist (1981) et APG *III* (2009), le blé dur une monocotylédone classée de la manière suivante :

### *Classification de Cronquist (1981)*

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Sous-classe	Commelinidae
Ordre	Cyperales
Famille	Gramineae
Genre	Triticum
Espèce	Triticum turgidum
Sous-espèce	Triticum turgidum subsp. Durum(Desf.)
Synonymes	Triticum durum

### *Classification APG III (2009)*

Ordre	Poales
Famille	Poaceae

### *1.4.1 Caractéristiques de la plante :*

#### *1.4.1.1 Caractéristiques morphologiques et physiologiques :*

##### *1.4.1.1.1 Le système racinaire :*

Selon Belaid (1996), toute céréale dispose, au cours de son développement, de deux systèmes racinaires successifs :

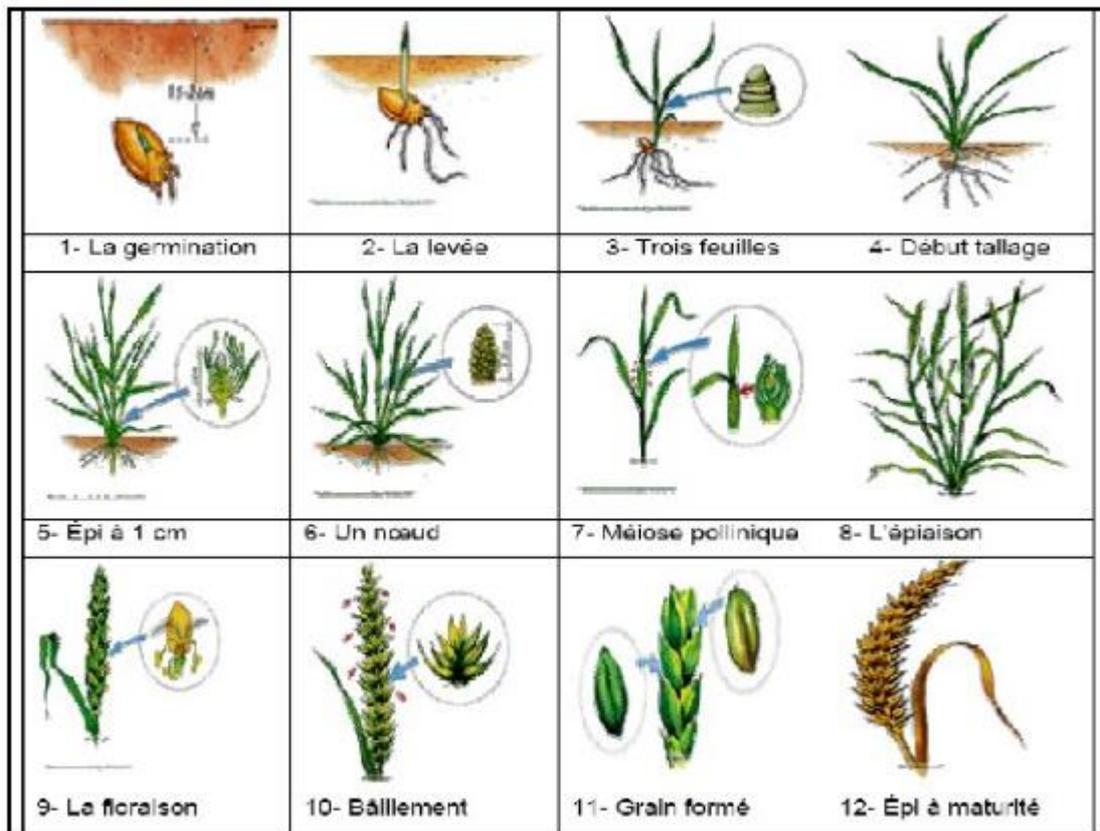
- Le système racinaire primaire, fonctionnel de la germination au début tallage , ce système est constitué d'une racine principale ne restant pas longtemps fonctionnelle et est remplacé par un système de racine adventices (prenant naissance sur la tige ) qui assureront la nutrition et le développement de la plante.
- Le système racinaire secondaire ou tallage ( ou système coronaire ) apparaît au moment où la plante émet des talles ; il est de type fasciculé et assez développé.

##### *1.4.1.1.2 Le système aérien* il est composé de plusieurs organes :

- **La tige et les feuilles** : la tige creuse ou chaume, dont les entre-nœuds ne se sont allongés qu'à la montaison, porte des feuilles engainantes à nervures parallèles (Belaid,1996 ; Soltner, 2005).
- **L'inflorescence** : le rachis, ou axe de l'épi, porte 15 à 25 épillets constitués chacun de 3 à 4 fleurs. La disposition de celle-ci fait ressortir une caractéristique d'une grande importance : le blé est une plante autogame ou à autofécondation, c'est-à-dire que la fécondation a lieu à l'intérieur des glumelles avant que les étamines n'apparaissent à l'extérieur. De ce fait, la conservation de la pureté variétale sera parfaite d'une génération à l'autre (Soltner, 2005).
- **-Le grain** : le grain est un caryopse ou fruit sec indéhiscent dont les parois sont soudées à celles de la graine (Belaid, 1996 ; Soltner, 2005).

**1.4.2 Le cycle de développement :**

Le cycle de développement du blé est constitué d'une série d'étapes séparées par des stades repérés, permettant de diviser en deux périodes de la vie des céréales. Une période végétative durant laquelle, la plante ne se différencie que des feuilles et des racines ; une période reproductrice dominée par l'apparition de l'épi et la formation du grain (Soltner, 2005).



**Figure 1.4 :** les différents stades de développement du blé dur ( zaboubi, 2007)

### ***1.4.2.1 La période végétative :***

Elle se caractérise par un développement strictement herbacé et s'étend du semis jusqu'à la fin de tallage.

#### ***1.4.2.1.1 La germination-levée***

La germination de la graine se caractérise par l'émergence du coléorhize donnant naissance à des racines séminales et la date de la levée est définie par l'apparition de la première feuille qui traverse le coléoptile, graine rigide et protectrice enveloppant la première feuille. La levée se fait réellement dès la sortie des feuilles à la surface du sol (Soltner, 2005).

Au sien d'un peuplement, la levée est atteinte lorsque la majorité des lignes de semis est visible (Gate, 1995). Les principaux facteurs édaphiques qui interviennent dans la réalisation de cette phase sont, la chaleur, l'aération et l'humidité (Eliard, 1947).

#### ***1.4.2.1.2 Le tallage***

Lorsque la plante possède 3 à 4 feuillées, une nouvelle tige, la talle primaire, apparaît à l'aisselle de la feuille la plus âgée. Après l'émission de la première talle, la plante va émettre des talles primaires, qui prennent naissance à l'aisselle du maître-brin (tige principale), puis, lorsque le maître-brin a 6 feuilles au moins, des talles secondaires dont bourgeons seront alors situés à l'aisselle des feuilles des talles primaires. Le tallage herbacé s'arrête dès l'évolution de l'apex de la formation d'ébauches florales (futurs épillets) qui sont suffisamment avancées (Gate et Giban, 2003).

### ***1.4.2.2 La période reproductrice :***

Elle comprend la formation et la croissance de l'épi.

### ***1.4.2.2.1 Phase montaison :***

Au cours de cette phase, un certain nombre de tiges herbacées vont évoluer vers des tiges couronnées d'épis, tandis que d'autres commencent à régresser. La croissance en taille et en matière sèche est alors active. Cette phase se termine au moment de la différenciation des stigmates. La durée de cette phase est de 29 à 30 jours (Clément-Grandcourt ; Prat, 1971).

### ***1.4.2.2.2 Phase d'épiaison et fécondation :***

Elle est marquée par la méiose pollinique, l'éclatement de la graine avec l'émergence de l'épi. C'est au cours de cette phase que s'achève la formation des organes floraux et s'effectue la fécondation (Soltner, 2005). La vitesse de croissance de la plante est maximale. Cette phase correspond à l'élaboration d'une grande quantité de la matière sèche, cette phase dépend étroitement de la nutrition minérale et de la transpiration qui influence le nombre final de grains par épi (Masle, 1980 ; Soltner, 2005).

### ***1.4.2.2.3 La maturation du grain :***

Au cours de cette phase, l'embryon se développe et l'albumen se charge de substances de réserve. On observe une augmentation du volume du poids des graines. La phase se termine par le stade laiteux. En suite, le poids frais des grains continue à augmenter alors que celui des tiges et des feuilles diminue. La phase se termine par le stade pâteux. Puis les grains deviennent durs et leur couleur devient jaunâtre (Boufnar-Zaghoune et Zaghouane, 2006).

## ***1.5 Exigences du blé :***

### ***1.5.1 Température :***

Une température supérieure à 0°C est exigée pour la germination des céréales.

Un abaissement de la température pendant l'hiver est nécessaire aux variétés non alternatives dites « hiver » et par la suite, la température conditionne la nitrification et l'activité végétative du blé au cours de tallage et de la montaison. Enfin, l'intensité de l'évapotranspiration peut amener l'échaudage (Soltner, 2005).

### **1.5.2 Eau :**

Jusqu'à la fin du tallage, les besoins en eau sont relativement faibles. De plus, l'humidité excessive du sol est néfaste à l'installation du système racinaire en profondeur.

Par contre, au cours de la plante de montaison et jusqu'à la floraison les besoins en eau de la culture sont considérables et peuvent s'évaluer à 180 mm ( Mars et Mai). Après la floraison, le blé devient très résistant à la sécheresse.

### **1.5.3 Eclaircissement :**

Une certaine durée du jour (Photopériodisme) est nécessaire pour la réalisation du stade B précédant la montaison (Soltner, 2005).

Cette même autre note que l'intensité lumineuse, et l'aération, agissent directement sur l'intensité de la photosynthèse, dont dépend à la fois la résistance des tiges à la verse et le rendement (Soltner, 2005).

## **1.6 Les facteurs limitant la production du blé dur :**

La culture de blé est fréquemment exposée aux contraintes de l'environnement et soumise à une multitude de stress abiotiques et biotiques. Parmi les stress abiotiques qui limitent le rendement de blé sont de nature climatique (gel, températures excessives et sécheresse) ou édaphique (acidité du sol entraînant une toxicité par l'aluminium ou le manganèse. De plus, les stress biotiques sont ceux causés par les organismes pathogènes. Les champignons sont les plus répandus et les plus dommageables pathogènes des cultures cultivées (Ezzahiri, 2001 ; Zahri et *al.*, 2014).

Les champignons peuvent occasionner des pertes importantes lorsque les variétés utilisées sont sensibles et les conditions de l'environnement sont favorables à l'expansion des maladies (Ezzahiri, 2001).

Les maladies qui s'attaquent au blé sont dues à plusieurs types de pathogènes à savoir les champignons, bactéries, virus, nématodes. Les principales maladies fongiques répandues dans le monde et en Algérie sont regroupées dans le tableau ci-dessous (Sayoud et *al.*, 1999).

Tableau 1.1 : Les principales maladies fongiques du blé (Sayoud et *al.*, 1999).

Nom de la maladie	L'agent causal
Rouille jaune	<i>Puccinia striiformis</i>
Rouille noire	<i>Puccinia graminis f.sp.tritici</i>
Rouille brune	<i>Puccinia triticina</i>
Oïdium	<i>Erysiphe graminis f.sp.tritici</i>
Tache helminthosporienne	<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>
Caries	<i>Tilletia caries</i> et <i>Tilletia foetida</i>
Charbon foliaire	<i>Urocystis agropyri</i>
Charbon nu	<i>Ustilago tritici</i>
Pourriture racinaire	<i>Cochliobolus sativus</i>
	<i>Fusarium culmorum</i>
	<i>Fusarium graminearum</i>
	<i>Fusarium avenaceum</i>
Septoriose	<i>Septoria nodorum</i> ou <i>Stagnospora nodorum</i>
	<i>Septoria tritici</i> ou <i>Mycosphaerella graminico</i>

Selon Aouali et Douici-Khalfi (2009), Les maladies des céréales peuvent être regroupées selon les symptômes qu'elles induisent et les parties qu'elles affectent. De ce fait, on distingue :

- Maladies causant des symptômes localisés sur feuillage.
- Maladies causant des pourritures racinaires.
- Maladies causant des symptômes sur les épis.

### **1.6.1 Caractéristiques de quelques maladies sur le blé :**

#### **1.6.1.1 Les rouilles :**

Les rouilles sont des parasites biotrophes obligatoires et endrophytes causées par des champignons Basidiomycètes de l'ordre des Urédinales.

Elles sont parmi les maladies les plus dévastatrices du blé. Le développement épidémique peut avoir lieu dans certaines régions occasionnant des pertes pouvant aller jusqu'à 25% (Daguenet, 1990 ; Sayoud et *al.*, 1990).

Rapilly et *al.*, 1971, considèrent la rouille comme un parasite très grave des céréales provoquant des maladies à caractères épidémiques et qui peut être à l'origine de pertes de rendements importants lesquels sont souvent difficiles à apprécier.

L'appellation rouille est justifiée par la teinte de certaines de leurs fructifications qui varient du jaune au noir rappelle la couleur rouille. Aussi, nous distinguons :

##### **1.6.1.1.1 La rouille noire :**

L'agent causal est *Puccinia Graminis*. Elle est peu fréquente et est généralement trop tardive pour être dangereuse ; elle apparaît généralement vers la fin du mois de juin- début de Juillet, sous forme de pustules noirâtres, sur les feuilles prises sur les chaumes d'où elles gagnent le col de l'épi. La maladie peut avoir de graves conséquences comme la diminution du poids spécifique, et la qualité du grain (Prescott et *al.*, 1987).

##### **1.6.1.1.2 La rouille jaune :**

La rouille jaune due à *Puccinia striiformis* apparaît d'abord au cours du printemps par foyers très distincts de 1 à 2 m<sup>2</sup> où la maladie est très intense. Elle peut ensuite, selon les conditions climatiques, s'étendre ou non à chaque parcelle. Sur les feuilles, la rouille jaune se présente généralement sous forme de stries qui suivent les nervures. Ces stries sont composées de pustules pulvérulentes jaunes, allongées et alignées entre les nervures. Les feuilles, les graines, les tiges et les épis peuvent être atteints..

### 1.6.1.1.3 La rouille brune :

Les symptômes causés par *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* se caractérisent par petites pustules circulaires ou ovales de couleur orange ou brune (urédospores), apparaissent sur la face supérieure des feuilles (Lamari et *al.*, 1991 ; Sayoud et *al.*, 1999 ; Ezzahiri, 2001) et parfois sur la face inférieure des feuilles. En fin de saison, ces pustules prennent une couleur noire (téleutospores) (Aouali et Douici-Khalfi, 2009 ; Ezzahiri, 2001).

### 1.6.1.2 La septoriose :

Les symptômes de *Septoria tritici* commencent par de petites taches de couleur brune rougeâtre irrégulières sur les feuilles inférieures et en particulier sur celles en contact du sol. Les taches sont d'abord délimitées par nervures pour ensuite s'étendre longitudinalement de 5 à 15 mm et prendre une couleur grise claire (Ezzahiri, 2001 ; Michel, 2002 ; Aouali et Douici-Khalfi, 2009). Après l'apparition des nécroses sur les feuillages, on observe des ponctuations noires alignées parallèlement qu'on appelle pycnide (Ezzahiri, 2001 ; Michel, 2002 ; Aouali et Douici-Khalfi, 2009).

Cette maladie est la deuxième maladie la plus répandue en Algérie après la tache auréolée. Elle est beaucoup plus importante dans les zones littorales. Elle a eu impact important en 2006, aussi bien sur les blés durs que sur les blés tendres dans les wilayas de Skikda, Annaba, Constantine et Guelma (Anonyme, 2007).



Figure 1.5 : La septoriose d'après (Ruel, 2006).

### 1.6.1.3 Oïdium :

Toutes les céréales peuvent être attaquées par oïdium. Plusieurs formes de la maladie sont cependant spécifiques à des cultures précises, et ne provoquent pas d'infections croisées (Anonyme a. 2014).

Les premiers symptômes d'*Erysiphe graminis f. sp. tritici* apparaissent sous forme d'un duvet blanchâtre ou gris pâle sur le limbe des feuilles basales, puis se développent sur les feuilles des étages supérieurs (Ezzahiri, 2001 ; Anonyme, 2008 ; Aouali et Douici-Khalfi, 2009). En cas d'attaque sévère des taches apparaissent aussi sur les graines des feuilles et les glumes des épis (Ezzahiri, 2001 ; Aouali et Douici-Khalfi, 2009).

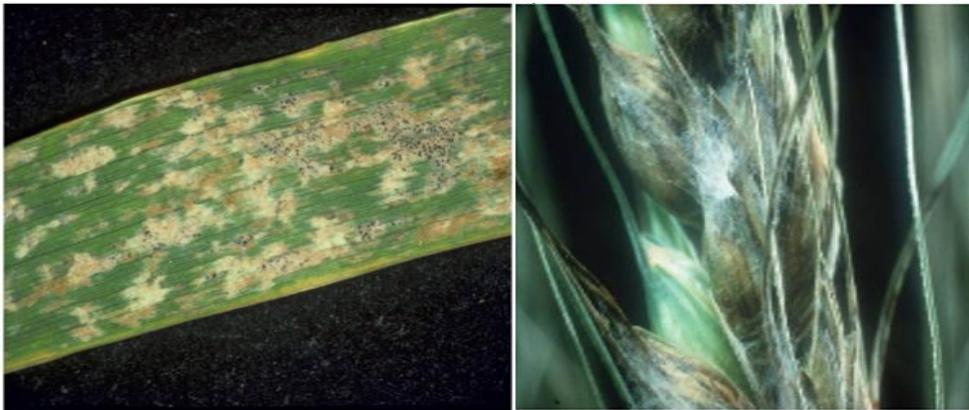


Figure 1.6 :L'oïdium d'après (**Pearse., 1999**).

### 2. Les biotechnologies et leurs impacts sur l'amélioration des plantes:

Au sens large, les biotechnologies peuvent être définies comme un ensemble de techniques et de connaissances permettant d'exploiter les propriétés du vivant à des fins d'applications (Gros, 1998). La biotechnologie a donc pour finalité de produire, isoler, modifier et utiliser des substances biologiques à partir de cellules microbiennes, animales ou végétales.

#### 2.1. Apport de biotechnologie dans l'amélioration génétique :

L'amélioration génétique regroupe aujourd'hui l'ensemble des procédés biologiques et biotechnologiques qui permettent au sélectionneur de bien choisir sa stratégie d'action en utilisant au mieux les ressources génétiques et les moyens matériels disponibles (tableau 4). La culture in vitro, le clonage, l'haplodiploidisation, la fusion cellulaire et le transfert de gènes qui constituent selon Demarly et Sibi (1989), Bonjean et Picard (1990) et Demarly (1990) des techniques nouvelles et complémentaires aux méthodes conventionnelles permettant dans leurs synergies, une plus grande efficacité pour introduire une nouvelle diversité génétique.

**Tableau 2.1: Place des biotechnologies dans un programme d'amélioration des plantes (Demarly, 1990) .**

Étape	Voies classiques	Apport des biotechnologies
<b>1- Ressources</b>	- Protection des populations naturelles - Collections	- Vitrothèque - Banque d'ADN cloné - Sondes
<b>2- Recombinaison et réorganisation</b>	- Hybridations sexuées - Mutagenèse	- Hybridations somatiques - Vitrovariation - Transfert de gènes
<b>3- Sélection et stabilisation</b>	- Choix progressifs dans les familles. - Consanguinité.	- RFLP pour assister les choix - Haplodiploidisation
<b>4- Multiplication fidèle</b>	- Reprise en lignées et entretien des stocks parentaux.	- Clonage ; vitroplants et semences artificielles.

### **2.1.1. La mutagenèse**

C'est l'une des sources de la variation génétique dans une population. Elle peut être génique ou chromosomique. Les mutations peuvent être spontanées ou artificiellement induites.

Elle est appliquée afin d'obtenir des modifications morphologiques et physiologiques des plantes, la production de nombreux allèles pour un gène donné, la recombinaison de gènes étroitement liés, le transfert de gènes et l'augmentation du degré de croisements naturels chez les plantes autogames (Bonjean et Picard, 1990).

### **2.1.2. La culture des cellules et des tissus**

La majeure partie des céréales peut être multipliée in vitro par la culture de tissus. Cette méthode permet une sélection pour la résistance à certains stress, aux maladies, et à la salinité des sols au moment de la culture (Zahour, 1992). Les cellules communément isolées à partir des tissus du mésophylle, perdent leur pouvoir de totipotence durant le processus de développement et de différenciation ainsi que leur capacité à initier un processus de division dans des conditions de culture artificielles (Vasil, 1994). L'utilisation des protoplastes d'origine méristématique comme alternative à ce problème, n'est pas plus facile.

### **2.1.3. Transgénèse :**

C'est la seule technique du génie génétique. Elle permet le transfert de gène d'un organisme « plante » à un autre. On obtient ainsi de nouvelles caractéristiques exprimées par le ou les gènes introduits appelés transgénèses.

Cette technique permet l'apport de caractères d'intérêt jusque-là inaccessible à certaines espèces avec grande précision (Housset, 2002 ; Le Poivre, 2003).

## **2.2. Marqueurs moléculaires :**

### **2.2.1. Historique :**

Durant les années 80, les marqueurs moléculaires (marqueurs génétiques) liés à l'ADN ont remplacé progressivement les marqueurs visuels ou enzymatiques. Ils offrent en effet plusieurs avantages : ils peuvent être utilisés tout le long de l'expérimentation et sont observables à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe (Vedele et Loudet, 2001).

### **2.2.2. Marqueurs génétiques :**

On appelle un marqueur génétique tout marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme. L'analyse biochimique des protéines ou moléculaire du gène donne accès à des polymorphismes sans traduction perceptible à l'échelle morphologique ou physiologique et permet de percevoir, à cette échelle, un polymorphisme génétique non perceptible à l'échelle d'un organisme (Serre, 2006). L'identification de formes de polymorphismes dans les espèces peut aider à comprendre leur distribution et leur évolution historique et aussi bien leurs mécanismes d'interaction et leur coévolution avec les autres espèces (De Moraes et al., 2007).

### **2.3. Les caractéristiques d'un bon marqueur génétique :**

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

### **2.4. marqueur génétique moléculaire :**

Les marqueurs moléculaires correspondent à des différences nucléotiques existant au niveau de molécule d'ADN (d'où le terme moléculaire), des techniques de biologie moléculaire permettent de révéler ce polymorphisme de séquence. Ces différences entre allèles peuvent correspondre à des mutations ponctuelles (substitution, insertion, délétion).

Des réarrangements chromosomiques, ou des mutations silencieuses (sans effet sur l'expression du locus), comme elles peuvent se trouver dans les régions codantes ou non codantes. Les possibles variations tissulaires, temporelles ou environnementales de l'expression des séquences sont sans effet sur leur détectabilité. Elles sont en majorité sans effet phénotypique (Samouelian et al., 2009). Les caractères moléculaires sont de bons marqueurs génétiques : ils révèlent directement la nature génétique de l'information. Ceci les différencie des caractères morphologiques, physiologiques et plus généralement de tous les caractères phénotypiques, dus à une addition d'effets génétiques et non génétiques. Cet aspect

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

### **2.5. Les différents types de marqueurs moléculaires :**

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

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

#### **2.5.1. Marqueurs dominants révélés en masse (marqueurs anonymes) :**

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

#### **2.5.2. Marqueurs codominants révélés individuellement :**

Les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) peuvent détecter un polymorphisme de séquence lié à l'emplacement de sites de restrictions et ils nécessitent des techniques d'hybridations de sondes (Bodstein et *al.*, 1980). Alors que les marqueurs SSR (Short Sequence Repeat) renferment les deux catégories de marqueurs, selon la technique utilisée pour leur révélation. Un autre type de marqueur appelé SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) vient d'être mis en point et permet de rechercher un polymorphisme d'un nucléotide.

### 2.5.3. Marqueurs révélés par la technique PCR :

Le développement de la technique « réaction chaîne polymérase » ou PCR offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, isoenzymes et RFLP).

Parmi les marqueurs moléculaires qui peuvent être révélés par la technique PCR, on note les SSR ou bien les microsatellites qui font l'objet de ce travail.

### 2.6. les principales sources de marqueurs moléculaires :

#### 2.6.1. critère de classification :

Sur le plan moléculaire, on peut classer le polymorphisme en trois catégories :

Le polymorphisme de séquence, d'insertion-délétion, et de nombre d'unités de répétitions dans les régions répétées (De Vienne, 1998) (tableau).

**Tableau 2.2:** classification des techniques de marquage moléculaire (de Vienne, 1998).

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

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

### **2.6.2. Les marqueurs RFLP :**

Les marqueurs RFLP ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction constituent des marqueurs moléculaires basés sur les techniques d'hybridation. Les RFLP sont les premiers marqueurs moléculaires développés et ont été utilisés en 1980 dans la construction de la carte génétique humaine (Bostein et *al.*, 1980). Quelques années plus tard, ces marqueurs sont adoptés pour la cartographie du génome végétal (Helentjaris et *al.*, 1986) et particulièrement celui du blé *Triticum aestivum* (Chao et *al.*, 1989 ; Nelson et *al.*, 1995).

Cette technique a pour base l'utilisation des enzymes de restriction (Endonucléase) sur des ADN en vue de détecter des séquences courtes spécifiques. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et ensuite transférés sur membrane selon la procédure de Southern blot. La taille des fragments est déterminée par hybridation de membranes avec des sondes (fragment d'ADN) marquées. Les sondes peuvent être des séquences d'ADN courtes et simples, de faibles copies d'ADN génomique ou encre de clones d'ADN complémentaire.

Les mutations dans le génome entraînant la modification de certains sites de restriction d'où la génération de différents profils de restriction entre différents échantillon. Chaque fragment de taille différent engendré est considéré comme allèle et peut être utilisé en analyse génétique

### **2.6.3. Les marqueurs RADP :**

L'amplification des ADN par des marqueurs RADP ou Random amplified polymorphisme DNA (Williams et *al.*, 1990 ; Welsh et Mac Clelland, 1991) constitue l'amplification de séquences sélectionnées au hasard dans le génome par l'utilisation d'amorces non spécifique. Sa principale variante consiste à utiliser comme amorce un seul oligonucléotide d'une dizaine de bases qui permet d'amplifier par PCR un ou

plusieurs segments d'ADN de l'échantillon. Chaque bande de l'amplifiât correspond à l'existence sur chacun des brins d'ADN d'un motif complémentaire à l'amorce.

Sur le plan génétique, cette technique permet de révéler un polymorphisme de présence/absence. Ainsi pour un locus donné, il a ou il n'y a pas d'amplification du fragment.

Dans le domaine végétale la technique RAPD se caractérise par rapport à d'autres techniques ( Mini satellites, SSR, RFLP, AFLP..... etc) par sa grande simplicité, rapidité de manipulation et la nécessité d'une faible quantité d'ADN , néanmoins les RADP présentent l'inconvénient d'être faiblement reproductibles .

### **2.6.4. les marqueurs ISSR :**

Les ISSR ou Inter Simple Sequence Repeat sont une variante de la PCR. Cette technique exploite l'abondance aléatoire des SSR dans le génome des plantes. Les SSR étant des séquences répétées en tandem des motifs mono- , di , tri- ou tetranucléotique générant un système de marqueurs multi locus très intéressant qui permet d'exploiter la distribution abondante et aléatoire des SSRs dans le génome des plantes.

L'intérêt de cette technique est qu'elle ne nécessite aucune connaissance préalable de la séquence utilisée. Cependant cette technique a connu plusieurs variations de sa méthodologie avec l'utilisation des gels d'acrylamides ou agarose et la révélation au nitrate d'argent ou au bromure d'éthidium . les marqueurs ISSR ont été largement utilisés pour les analyses du polymorphisme génétique au niveau intra-spécifiques chez plusieurs espèces, citonsle cas du maïs (Kantety et *al.*, 1995), la pomme de terre (Huang et Sun, 2001) du sorgho (Yang et *al.*, 1996) et du lupin (Talhinhas et *al.*, 2003). Ce marqueurs ont contribué à l'évaluation de la diversité génétique chez le genre *Lupinus* et ont permis une séparation claire de espèces du nouveau et de l'ancien monde.

### **2.6.5. Les marqueurs AFLP :**

La *Amplification Fragment Length Polymorphism* est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires, utilise a la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR. L'ADN génomique est clivé par deux enzymes de restriction. Des adaptateurs connus et spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont ajoutés aux extrémités des fragments de restriction générant ainsi une matrice pour l'amplification. (Gallais, 2011).

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

Toutefois, la dominance, le coût élevé (couverte par un brevet de la société néerlandaise-keygene-qui l'a mis au point) et les difficultés techniques liées au marquage par AFLP limitent son utilisation à grande échelle pour des applications comme la sélection assistée par marqueurs. (Prat *et al.*, 2006).

### **2.6.6 Les marqueurs SNP**

Les marqueurs SNP (Single Nucleotide Polymorphisme) sont une source importante de polymorphisme de l'ADN. Le changement d'un nucléotide par un autre est un processus bi allélique codominant. Ceci peut être un processus synonyme n'entraînant pas de changement de l'acide aminé, ou encore non synonyme entraînant la substitution d'un acide aminé par autre. Le changement au niveau d'un nucléotide peut aussi provoquer la création/abolition d'un site d'épissage ou encore un stop précoce (mutation non sens).

Chez les plantes, les SNP sont marqueurs génétiques utilisés dans plusieurs études de populations, dans le marquage de germplasm. Dans la cartographie de gène et dans les associations génotype/phénotype (Giancola *et al.*, 2006 ; Brunel *et al.*, 2009).

### **2.6.7. Les marqueurs Microsatellites ou SSR :**

Ils sont constitués de séquences de di, tri ou tétranucléotides répétées en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'élément du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant les microsatellites. (Gallais, 2013).

L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'Acrylamide ou d'agarose (Prat *et al.*, 2006). C'est la paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche du microsatellite qui constitue le marqueur.

Si les SSR constituent de bons marqueurs moléculaires (reproductibles, Co-dominants et aisés d'utilisation), leur caractérisation initiale est toutefois assez lourde. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage de ces éléments répétées (Prat *et al.*, 2006).

**Tableau 2.3** : avantage et inconvénients des marqueurs SSR(Chargué et *al.*, 1999)

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

### 2.6.8 STS (SEQUENCE-TAGGED SITE) :

Selon Rolf D. (2005) Ce sont des fragments d'ADN spécifiques déjà séquencés, uniques dans le génome et d'une taille allant de 100 à 500 Pd .lorsqu'une collection de tels STS a été identifiée, il est possible, à l'aide d'amorces issues de ces STS. De trouver rapidement s'ils sont dans le génome proche ou éloignés les uns des autres. Si deux STS sont proches l'un de l'autre, on trouve dans une collection de fragments de gènes chevauchants d'une banque de gènes (mapping reagent) plusieurs fragments d'ADN qui s'hybrident et qui portent les mêmes STS .Les marqueurs STS conviennent remarquablement bien aux analyse de couplage moléculaire de fragments de gènes.

**Tableau 2.4 : Les caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés**

Type de marqueur	Caractéristique de la méthode	Procédure de laboratoire	Fiabilité	Coût	Référence
RFLP	Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction, et détection par l'ADNc ou les sondes d'ADN (via Southern Blot)	Complexe et laborieuse	Elevée	Elevé	Botstein (1980); Beckmann et Soller (1986); Kochert (1994); Tanksley et <i>al.</i> , (1989)
RAPD	Amplification aléatoire via des amorces arbitraires de 10pb	Simple	Faible	Faible	Welsh et McClelland (1990); Williams et <i>al.</i> , (1990)
ISSR	Amorces conçues pour des séquences simples répétées avec des 'ancres'	Simple	Moyenne	Faible	Blair et <i>al.</i> , (1998)
SSR	Amorces conçues pour des séquences bordant les séquences simples répétées	Simple	Elevée	Faible	McCouch et <i>al.</i> , (1997); Powel et <i>al.</i> , (1996)
AFLP	Digestion d'ADN génomique suivie d'une ligation par des adaptateurs et PCR	Complexe et laborieuse	Elevée	Elevé	Vos et <i>al.</i> (1995)

## Synthèse bibliographique

SCAR/STS	Représentent la 'seconde génération' des marqueurs, dérivés à partir des marqueurs à séquences d'ADN spécifiques (RFLPs, RAPDs, ou AFLPs)	Simple	Elevée	Faible	Sanchez et al. (2000); Shan et al. (1999)
SNPs	Détecte des mutations d'un seul nucléotide. Haute polymorphisme et très spécifiques	automatisé	Elevée	Moyen	Somers et <i>al.</i> , (2003)

### 2.7 La technique de la PCR :

la réactions de polymérisation en chaine, développée par Kary Mullis , est du point de vue de l'application l'une des découvertes les plus importantes dans le domaine du génie génétique ; son inventeur a reçu le prix Nobel .Dans la réactions PCR , un fragment court et défini de la molécule d'ADN est copie de multiples fois par une ADN-Polymérase . Autrement dit, un fragment d'ADN cible peut être amplifié de manière sélective. Cette technique est d'un très grand intérêt à la fois pour l'identification de fragments d'ADN et pour la manipulation d'ADN (Lapeysonnie., 1963).

### 2.7.1. Principe de la PCR:

Le principe de la PCR repose sur l'extraction de l'acide nucléique, l'amplification de l'acide nucléique extrait et la détection de l'amplicon (Elyse P *et al.*,2002).

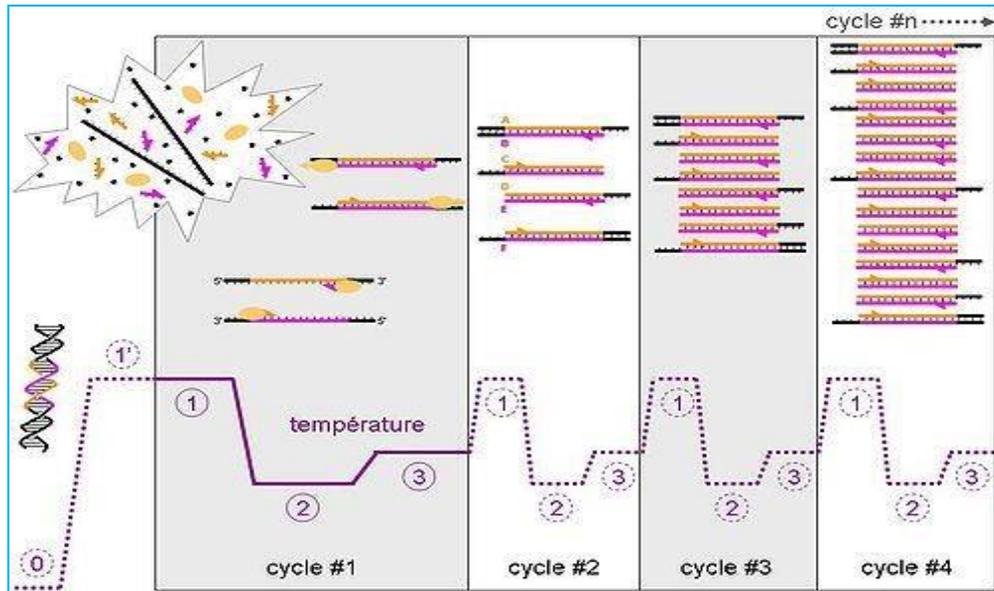
### 2.7.2. Etapes de réalisation de la PCR :

#### 2.7.2.1 Extraction

L'extraction peut être manuelle ou automatisée. Une lyse préalable des cellules est effectuée ; elle est couramment faite par des produits chimiques ou par variation thermique. Les produits les plus fréquemment utilisés en lyse chimique sont : le sulfate de guanidine et le chloroforme. Le reste du principe d'extraction consiste à capter les acides nucléiques et éliminer les éléments non nécessaires par purification. (Elyse P *et al.*,2002) .

#### 2.7.2.2 Amplification

Selon David *et all.*,(2002),. La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. A l'exception de certaines méthodologies utilisant des sondes d'hydrolyse, chaque cycle contient trois étapes comme détaillées dans la **figure 2.1**.



**Figure 2.1 :** Évolution de la température et des différents types de brin d'ADN au cours des quatre premiers cycles de la PCR

### 2.7.2.3 Les Composantes

**Matrice :** la matrice est constituée de l'ADN obtenu par extraction.

**Amorces :** Dans la mise au point de la réaction PCR, le choix des amorces est crucial. Elles jouent un rôle en s'hybridant à l'ADN matrice. Elles délimitent également la région de l'ADN à amplifier avec leur extrémité 3'OH libre servant d'amorce pour l'ADN polymérase. Les séquences nucléotidiques des amorces doivent être spécifiques des séquences complémentaires de l'ADN simple-brin auxquelles elles vont s'apparier ; la complémentarité parfaite n'étant par ailleurs pas obligatoire. De plus, la spécificité de la séquence est importante dans le sens où celle-ci ne doit pas pouvoir s'apparier à une autre séquence de l'ADN que l'on ne souhaite pas répliquer. (David et al.,2002)

Les séquences des amorces doivent être choisies de sorte à minimiser les possibilités d'appariement entre elles. De même, chaque amorce est choisie pour ne pas pouvoir former une structure secondaire.

Le procédé même de la PCR reposant, entre autres, sur des équilibres thermodynamiques, les amorces doivent avoir des températures de fusion le plus proche possible, autrement dit le rapport entre les bases A-T et G-C des deux amorces ne doit pas être trop différent.

- **dNTP** (desoxynucleotide triphosphate) : est un mélange de quatre nucléotides triphosphates (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). Il est utilisé au cours d'une PCR comme élément de synthèse des brins d'ADN.
- **Cofacteur** : Le cofacteur est une substance dont la présence est nécessaire en plus d'une enzyme pour qu'une réaction se déroule. Le magnésium (Mg) est le cofacteur le plus couramment utilisé.
- **Tampon** : Le tampon utilisé pour la réaction PCR sert à maintenir stable le pH du milieu réactionnel au niveau optimal pour la Taq polymérase. Il contient souvent des cations bivalents  $Mg^{2+}$  servant de cofacteur.
- **Conditions natives (étape 0, figure 2.2)**

Cette étape se fait généralement à température ambiante. L'ADN bicaténaire adopte sa conformation en double hélice. Dans cet exemple, nous considérerons qu'il n'y a qu'une molécule initiale d'ADN double brin dans la solution, la zone colorée (rose et orange) correspondant à notre amplicon. (David et al.,2002)

- **Dénaturation initiale (étape 1', figure 2.3)**

Avant de commencer les cycles de PCR proprement dit, une étape de chauffage (généralement 10 à 15 minutes à 95 °C) est réalisée. Cette étape permet de dénaturer les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start », de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase). (David et al.,2002).

- **Phase de dénaturation ( étape 1, figure 2.3)**

Cette étape (généralement 0 à 1 minute à 95 °C) permet de dénaturer l'ADN, de « décrocher » les polymérases qui seraient encore liées à une matrice et d'homogénéiser le milieu réactionnel. L'ADN initial adopte une conformation « linéaire » (sans structure secondaire) et simple brin. Les amorces, les dNTPs et les polymérases sont en large excès et répartis de façon homogène dans la solution (David et al.,2002).

- **Phase d'hybridation ou d'appariement des amorces (voir étape 2, figure 2.3)**

Cette étape (généralement 2 à 60 secondes à 56-64 °C) permet aux amorces sens et anti-sens de s'hybrider aux ADN matrice grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Certaines des amorces dites « sens » s'hybrident avec leur séquence complémentaire sur le brin anti-sens (en rose) ; d'autres amorces dites « anti-sens » se lient aux brins sens (en orange). Deux polymérases peuvent alors interagir avec les deux complexes amorces/ADN matrice (David et al.,2002).

Peu de brins d'ADN matrice peuvent s'hybrider avec leur brin complémentaire, ce qui empêcherait la fixation des amorces, car ces dernières sont bien plus courtes et en concentration bien plus importante.

- **Phase d'élongation (étape 3, figure 2.3)**

Cette étape (généralement 4 à 120 secondes à 72 °C) permet aux polymérases de synthétiser le brin complémentaire de leur ADN matrice à une température qui leur est optimale. Ce brin est fabriqué à partir des dNTPs libres présents dans le milieu réactionnel. La durée de cette étape dépend normalement de la longueur de l'amplicon. Les polymérases parcourent leur brin matrice de son extrémité 3' vers son extrémité 5' tout en synthétisant le brin complémentaire. Elles s'arrêteront au bout de leur ADN matrice, décrochées par la phase de dénaturation du cycle suivant. Les ADN néo-synthétisés sont donc précisément définis à leur extrémité 5' mais pas à leur extrémités 3' (parties noires) (David et al.,2002).

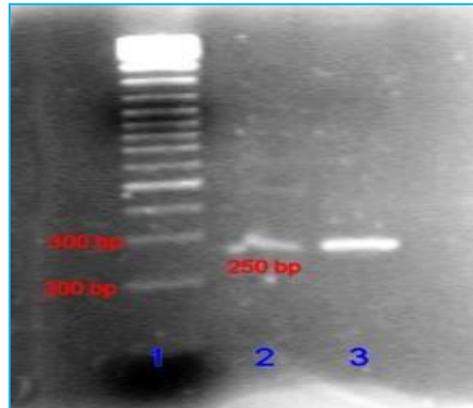
Les ADN sont alors bicaténares sur une longueur plus ou moins importante ; nous obtenons alors deux brins d'ADN matrice, deux brins (un sens et un anti-sens) d'ADN précisément définis à leur extrémité 5' uniquement.

### 2.7.2.4 Détection

La détection des produits de PCR varie selon le mode de PCR.

Dans la PCR classique, la détection est faite en end-point (à la fin des réactions de PCR) soit en couplant un test ELISA, soit en réalisant une

migration électrophorétique sur gel d'agarose. Dans la migration électrophorétique, un agent intercalant comme le bromure d'éthidium (BET) ou le Syber<sup>®</sup>Green est associé pour la visibilité des bandes. Un marqueur de poids moléculaire (**Bande 1, figure 2.4**) est utilisé comme échelle aidant dans l'identification de nos bas d'intérêt. Une bande contrôle de la taille de notre bande d'intérêt doit être utilisée. Dans certains cas, des témoins faibles sont utilisés (Bandes 2 et 3, figure 4) (David et al.,2002).



**Figure 2.2 :** Bandes d'une migration électrophorétique sur gel d'agarose

### **2.8 Utilisation de la sélection assistée par les marqueurs (SAM) :**

#### **2.8.1 Sélection pour la résistance aux maladies cryptogamiques :**

La SAM se base sur la possibilité de détecter la présence d'un gène ou d'une caractéristique agronomique intéressante par la recherche du marqueur qui lui est étroitement lié. La SAM est non destructif, elle nécessite peu de tissu végétal et elle n'est pas influencée par les facteurs environnementaux. Ce type de sélection est particulièrement avantageux lorsque le caractère étudié est difficile, coûteux à évaluer ou influencé par les conditions climatiques (résistance aux stress biotiques et abiotiques).

Lorsque le sélectionneur cherche à anticiper les problèmes, par exemple pour améliorer la résistance contre des maladies dans des régions où le pathogène n'existe pas encore, l'emploi de la SAM est incontournable (Feuillet *et al.*, 2003).

### 2.8.2 Sélection pour la tolérance aux stress abiotiques :

On cherche à localiser les zones du génome impliquées dans les variations des caractères quantitatifs d'intérêts (Lefort-Buson *et al.*, 1990). Les mesures du caractère sont faites sur une descendance en ségrégation dont le polymorphisme moléculaire a été établi et cartographié. Puis, on suit la co-ségrégation des marqueurs et du caractère physiologique ou agronomique intéressant. S'il existe des QTL intervenant dans la tolérance à la sécheresse, chacun d'eux sera entouré de marqueurs qui l'identifient (Monneveux et Depigny, 1995).

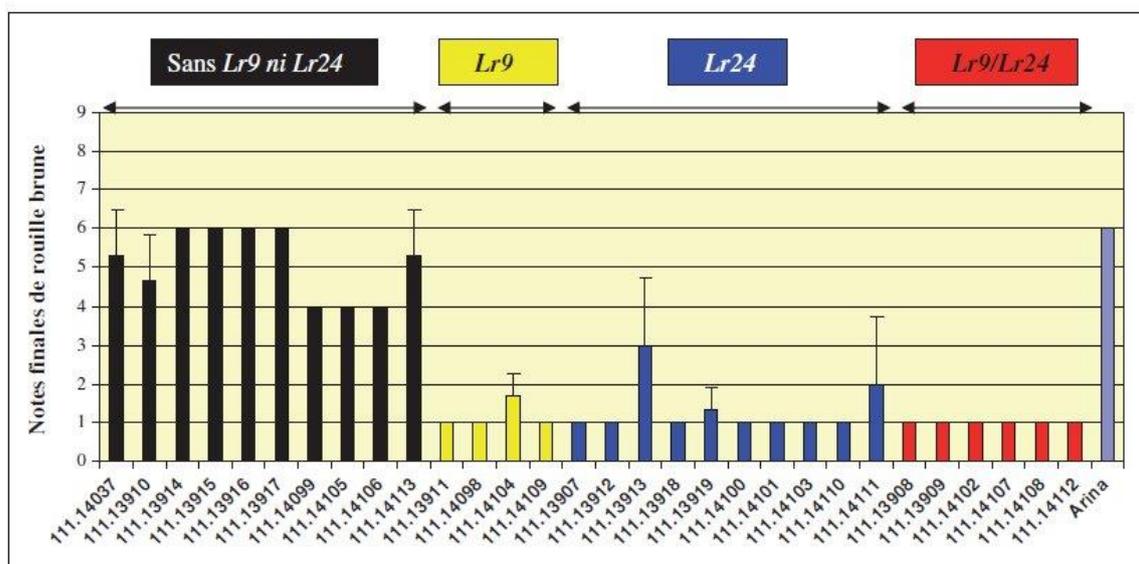


Fig. 8. Evaluation de la résistance à la rouille brune (notes de 1 à 9) de lignées de blé dérivées du projet de pyramidalisation des gènes de résistance Lr9 et Lr24 (note 1: aucun symptôme; note 9: feuilles couvertes de symptômes).

**Figure 2.3 :** Comportement des lignées de blé divergentes pour le nombre de gènes de résistance sous infection naturelle de la rouille brune (Schachermayer *et al.*, 1995).

L'autre alternative consiste à induire le stress sur la plante, puis de suivre les modifications induites par ce stress au niveau des protéines ou des ARN messagers. On peut ensuite remonter aux gènes correspondants en utilisant les protéines ou les ARNm spécifiques du stress comme sonde. Des résultats intéressants ont été également obtenus par des suivis de l'expression génique au cours du développement, et en particulier, au cours de la phase de déshydratation du grain, qui représente une situation de stress hydrique naturelle. Un ensemble de gènes régulés au cours du stress hydrique ont ainsi pu être mis en évidence (Delseny *et al.*, 1993).

### **2.9. Résistance aux maladies et parasites :**

#### **2.9.1 Importance de l'amélioration génétique :**

Maladies, parasites et prédateurs ont toujours provoqué des pertes considérables. En l'absence d'une protection efficace, les variétés modernes sont plus exposées que les populations anciennes à cause de disparition d'adaptations protectrices au cours de la domestication, de l'uniformité de variétés, qui facilite l'adaptation des agents pathogènes et de l'extension des cultures, favorable à celle des parasites (Demarly, 1977).

La protection des cultures par des pesticides devrait être réservée à la lutte contre des épidémies accidentelles et localisées. L'utilisation prolongée de ces produits n'est pas justifiée, à cause de leur coût, de leurs conséquences écologiques et de l'adaptation inévitable des parasites. L'amélioration de la résistance des variétés est donc primordiale, mais elle est difficile parce que des agents pathogènes s'adaptent aussi à la résistance des plantes, obligeant le sélectionneur à modifier sans cesse les variétés pour surmonter la virulence du parasite (Richards, 1986).

#### **2.9.2 Contrôle génétique de la résistance :**

Bien que certains cas paraissent intermédiaires, les mécanismes de résistance se répartissent en deux groupes : une résistance complète (immunité) et une tolérance qui se manifeste surtout par un ralentissement de la prolifération du parasite et par des symptômes moins graves. Le contrôle génétique est surtout étudié pour les rouilles et autres infections disséminées dans l'atmosphère, mais les mécanismes se sont souvent révélés comparables pour d'autres cryptogames, des virus, insectes, nématodes et même angiospermes parasites (Fehr, 1987).

### 2.9.3 Amélioration de la résistance :

La résistance spécifique étant contrôlée par des gènes majeurs dominants, l'amélioration est facile. L'introduction d'un gène de résistance à l'égard d'une souche de l'agent pathogène à partir d'une espèce ou d'une variété résistante se fait par back-cross (Gallais, 1990) . Il faut toutefois se souvenir que cette introgression n'a pas d'intérêt si le parasite est capable de s'adapter rapidement. Dans certains cas, on a pu protéger des variétés de façon durable en y accumulant préventivement deux ou trois gènes de résistance ; ces gènes représentent, pour le parasite, un obstacle qui ne peut être surmonté que par la mutation de deux ou trois de ses propres gènes (Plucknett et *al.*, 1990)

L'amélioration de la résistance non spécifique est souvent indispensable, mais elle est plus difficile, à cause de la difficulté d'identifier les gènes. On peut espérer trouver ces gènes dans des populations d'origines diverses, soumises à l'action du pathogène et non protégées par les gènes majeurs. Les populations hybrides seront cultivées en présence de cet agent pathogène. De façon à accumuler les gènes de résistance. La sélection récurrente est aussi possible (Plucknett et *al.*, 1990)

### 3.1. Site de l'expérimentation :

L'expérimentation a été réalisée au niveau d'INRA sous serre contrôlée pour le phénotypage (Figure 3.1) et au niveau du laboratoire de Physiologie Végétale pour le génotypage et d'Amélioration des plantes dans le cadre du projet national de recherche d'amélioration du blé (PNAB).

Durant la période allant de Décembre 2017 à Mai 2018 au niveau de la station expérimentale de l'Institut National de Recherche Agronomique Alger (INRA A) de Mehdi Boualem (Baraki, Alger).



**Figure 3.1 :** La serre en verre où a été réalisée notre expérimentation (photo personnelle).

### 3.2. Matériel

#### 3.2.1. Matériel végétal :

Nous avons utilisé 41 génotypes de blé dur. Notre choix a été motivé par les caractéristiques intéressantes qu'offrent ces génotypes (adaptation à certaines maladies et aux conditions du milieu et de bonne qualité technologique) ; nous avons présenté quelques caractéristiques des variétés connues.

**Tableau 3.1** : Liste des géotypes de blé dur étudiés

Géotypes	Variétés	Géotypes	Variétés
01	Sahel	22	Ofanto
02	Stetifs	23	Polinicum
03	Chen's	24	Carioca
04	Core	25	Bousselam
05	Waha	26	Ain lehma
06	Cammizza	27	Durbel
07	Saourah	28	Poggio
08	Massinissa	29	Tassili
09	Sebaou	30	Simeto
10	Hbb	31	Cirta
11	Bolenga	32	Ciccio
12	Vitron	33	Guengoum R'khem
13	Megress	34	Bidi 17
14	Hieder	35	Karim
15	Gtadur	36	Cham3
16	Mansourah	37	Wahbi
17	Colosseo	38	Belikh 02
18	Hdba03	39	Gloire de montgolfier

19	Kebir	40	Capeti
20	17 Rdente	41	Oum-Rabi
21	Orjaune		

**Tableau 3.2 :** Caractéristique de quelques variétés de blé dur

Variétés	Origine	Caractéristiques agronomiques et technologiques	Résistance aux maladies
<b>Sahel</b>	Algérie		
<b>Stetifs</b>	Algérie	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière : Bonne Mitadinage : résistantes Teneur en protéines :15.89%	*Résistantes : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, charbon, fusariose, septoriose  *Faiblement sensible : rouille brune
<b>Chen's</b>	Syrie	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière Mitadinage : Teneur en protéines :	
<b>Core</b>	Italie	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière : Bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :11.62%	*Résistantes : Oïdium sur épi, charbon, rouille brune, septoriose.  *Faiblement sensible : fusariose, Oïdium sur feuille.

## Matériel et méthodes

<b>Waha</b>	Syrie	<p>Rendement : Elevé</p> <p>Poids de mille graines : Elevé</p> <p>Qualité semoulière : très bonne</p> <p>Mitadinage : sensible</p> <p>Teneur en protéines :13.95%</p>	<p>*Résistantes : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi .</p> <p>Très sensible : rouille brune.</p> <p>Moyennement sensible : septoriose .</p>
<b>cannizzo</b>	Italie	<p>Rendement :Elevé</p> <p>Poids de mille graines :Elevé</p> <p>Qualité semoulière :Bonne</p> <p>Mitadinage : Résistante</p> <p>Teneur en protéines :14.33%</p>	<p>Résistantes : Oïdium sur épi .</p> <p>Sensible : rouille brune.</p> <p>Faiblement sensible : septoriose , Oïdium sur feuille</p>
<b>Saourah</b>	Syrie	<p>Rendement :Elevé</p> <p>Poids de mille graines :Elevé</p> <p>Qualité semoulière :bonne</p> <p>Mitadinage : résistante</p> <p>Teneur en protéines : 16.09%</p>	<p>*Résistantes : Oïdium sur feuille , Oïdium sur épi , charbon, fusariose.</p> <p>*Faiblement sensible : rouille brune, septoriose .</p>
<b>Massinissa</b>	Algérie	<p>Rendement :Elevé</p> <p>Poids de mille graines :Elevé</p> <p>Qualité semoulière :bonne</p> <p>Mitadinage : résistante</p> <p>Teneur en protéines :15,87%</p>	<p>Résistantes : charbon, fusariose, septoriose .</p> <p>Faiblement sensibles : Oïdium sur feuille , Oïdium sur épi, rouille brune.</p>
<b>Sebaou</b>	Tunisie	<p>Rendement : Elevé</p> <p>Poids de mille graines :Elevé</p> <p>Qualité semoulière :</p>	<p>Résistantes : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, rouille brune, septoriose.</p>

## Matériel et méthodes

		Mitadinage : résistante Teneur en protéines :	
<b>Hbb</b>	/	/	/
<b>Bolenga</b>	Espagne	Rendement :Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière : bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :11.43%	Résistante : Oïdium sur épis .  Faiblement sensibles : Oïdium sur feuille, septoriose.  Très sensible : rouille brune.
<b>Vitron</b>	Espagne	Rendement : Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière :bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :13.50%	Résistantes : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épis .  Sensible : : rouille brune.  Moyennement sensible : septoriose.
<b>Megress</b>	Algérie	Rendement :Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière : bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :14,76%	Résistantes : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, charbon, fusariose, septoriose  rouille brune
<b>Hieder</b>	Syrie	Rendement :Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière : Mitadinage : Teneur en protéines :	Résistantes : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, rouille brune, septoriose.
<b>Gtadur</b>	Mexique	Rendement : Elevé	Résistantes : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi,

## Matériel et méthodes

		Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière Mitadinage : Teneur en protéines :	rouille brune, septoriose.
<b>Mansourah</b>	Algérie	Rendement :Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière :bonne Mitadinage : faiblement sensible Teneur en protéines :14.77%	Résistante : septoriose Faiblement résistante : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, rouille brune,
<b>Colosseo</b>	Italie	Rendement :Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière : bonne Mitadinage : faiblement sensible Teneur en protéines : 15,30%	Résistante : rouille brune, fusariose, charbon. Moyennement sensible : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi. Faiblement sensible : septoriose.
<b>Hdba03</b>	Algérie	Rendement :Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière : Mitadinage : Teneur en protéines :14,50%	Résistante : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, rouille brune, septoriose.
<b>Kebir</b>	Syrie	Rendement :Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière Mitadinage : Teneur en protéines :	Résistante : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, septoriose. Moyenne sensible : rouille brune,
<b>17 Rdente</b>	/	/	/

## Matériel et méthodes

<b>Orjaune</b>	France	<p>Rendement :Elevé</p> <p>Poids de mille graines :Elevé</p> <p>Qualité semoulière : très bonne</p> <p>Mitadinage : faiblement sensible</p> <p>Teneur en protéines :16,46%</p>	<p>Résistante : rouille brune</p> <p>Sensible : Oïdium sur épi.</p> <p>Moyennement sensible : Oïdium sur feuille</p> <p>Faiblement sensible : septoriose.</p>
<b>Ofanto</b>	Italie	<p>Rendement :Elevé</p> <p>Poids de mille graines :moyen</p> <p>Qualité semoulière :bonne</p> <p>Mitadinage : sensible</p> <p>Teneur en protéines :15.64%</p>	<p>Résistante : Oïdium sur épi.</p> <p>Moyennement sensible : Oïdium sur feuille, rouille brune, septoriose.</p>
<b>Polinicum</b>	France	<p>Rendement :moyen</p> <p>Poids de mille graines :moyen</p> <p>Qualité semoulière :moyenne</p> <p>Mitadinage : résistante</p> <p>Teneur en protéines :</p>	<p>Résistante :Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, rouille brune, septoriose.</p>
<b>Carioca</b>	France	<p>Rendement :Elevé</p> <p>Poids de mille graines :Elevé</p> <p>Qualité semoulière :bonne</p> <p>Mitadinage : sensible</p> <p>Teneur en protéines :14,79%</p>	<p>Résistante : Oïdium sur épi.</p> <p>Moyennement sensible : rouille brune</p> <p>Faiblement sensible : Oïdium sur feuille, septoriose.</p>
<b>Bousselam</b>	Syrie	<p>Rendement : Elevé</p> <p>Poids de mille graines :Elevé</p> <p>Qualité semoulière :bonne</p> <p>Mitadinage : résistante</p> <p>Teneur en protéines :15,01%</p>	<p>Résistante : Oïdium sur épi.</p> <p>Sensible : rouille brune</p> <p>Moyennement sensible : Oïdium sur feuille, septoriose.</p>

## Matériel et méthodes

<b>Ain lehma</b>	/	/	/
<b>Durbel</b>	Espagne	Rendement :Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière :bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :13.43%	Résistante : Oïdium sur épi, charbon , fusariose.  Très sensible : rouille brune  Faiblement sensible : Oïdium sur feuille, septoriose.
<b>Poggio</b>	France	Rendement :elevé Poids de mille graines :elevé Qualité semoulière :très bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :13,78%	Résistante : Oïdium sur épi, rouille brune  Moyennement sensible : septoriose.  Faiblement sensible : Oïdium sur feuille .
<b>Tassili</b>	Mexique	Rendement :Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière :bonne Mitadinage : moyennement sensible Teneur en protéines :	Résistante : Oïdium sur feuille .  Sensible : Oïdium sur épi, rouille brune, septoriose.
<b>Simeto</b>	Italie	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière : très bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :15,80%	Résistante : Oïdium sur épi  moyennement sensible : Oïdium sur feuille , rouille brune, septoriose.
<b>Cirta</b>	Algérie	Rendement : Elevé Poids de mille graines :Elevé Qualité semoulière :bonne	Résistante : Oïdium sur épi.  Moyennement sensible : Oïdium sur feuille.  Moyennement sensible :

## Matériel et méthodes

		Mitadinage : résistante Teneur en protéines :15,19%	septoriose.
<b>Ciccio</b>	Italie	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière : bonne Mitadinage : résistante Teneur en protéines :15.89%	Résistante : Oïdium sur épi, charbon , fusariose .  Faiblement sensible : Oïdium sur feuille, septoriose.  Très sensible : rouille brune
<b>Guengoum R'khem</b>	Algérie	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière Mitadinage : résistante Teneur en protéines :	Résistante : rouille brune, septoriose.
<b>Bidi 17</b>	Espagne	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière :bonne Mitadinage : assez sensible Teneur en protéines :	Sensible : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi, rouille brune.  Peu sensible : septoriose
<b>Karim</b>	/	/	/
<b>Cham3</b>	Syrie	Rendement : Elevé Poids de mille graines : Elevé Qualité semoulière Mitadinage : Teneur en protéines :	Résistante : rouille brune.
<b>Wahbi</b>	Algérie	Rendement :Elevé	Résistante : Oïdium sur feuille, Oïdium sur épi,

		<p>Poids de mille graines : Elevé</p> <p>Qualité semoulière : bonne</p> <p>Mitadinage : moyennement sensible</p> <p>Teneur en protéines :14,77%</p>	rouille brune, septoriose
<b>Belikh 02</b>	Syrie	<p>Rendement : Elevé</p> <p>Poids de mille graines : Elevé</p> <p>Qualité semoulière</p> <p>Mitadinage :</p> <p>Teneur en protéines :</p>	
<b>Gloire de montgolfier</b>	Algérie	<p>Rendement :moyen</p> <p>Poids de mille graines :moyen</p> <p>Qualité semoulière :moyen</p> <p>Mitadinage : résistante</p> <p>Teneur en protéines :</p>	Moyennement sensible : septoriose.
<b>Capeti</b>	Italie	<p>Rendement :Elevé</p> <p>Poids de mille graines : Elevé</p> <p>Qualité semoulière</p> <p>Mitadinage : assez sensible</p> <p>Teneur en protéines :</p>	<p>Résistante : Oïdium sur feuille</p> <p>assez sensible :rouille brune</p> <p>moyennement résistante : septoriose.</p>
<b>Oum-Rabi</b>	Syrie	<p>Rendement : Elevé</p> <p>Poids de mille graines : Elevé</p> <p>Qualité semoulière</p> <p>Mitadinage :</p> <p>Teneur en protéines :</p>	

### 3.2.2 Equipements et produits de laboratoire :

Nous avons utilisé des équipements et des produits disponibles au niveau de laboratoire de Physiologie Végétale de l'Amélioration des Plantes de l'INRAA (annexe1).

### 3.3. Méthodes :

#### 3.3.1. Germination :

Le Décembre 2017, dix graines de chaque variétés ont été stérilisées dans le fongicide Vitavaxe (50%) et mises dans des boites de pétri, ces dernières sont tapissées par trois couches de papier filtre comme substrat. Dans notre cas, nous avons imbibé les boites contenant des graines avec l'eau 3 fois par semaine.

Elles sont régulièrement arrosées et placées dans l'obscurité pendant 15 jours, à température ambiante du laboratoire pour la réalisation de la germination (Fig 3.2)



**Figure 3.2 :** Germination de blé dur (source personnelle).

### 3.3.2. Transplantation:

Le Janvier 2018, les plantules sont transférées dans petits pots en plastiques de 3kg. Les pots sont remplis d'un mélange de substrat contenant deux volumes de terre stérilisée et un volume de sable également stérilisé; ils sont placés dans une serre contrôlée, sous une température de 20°C le jour et de 15°C et une humidité compris entre 60 et 80% (Figure 3.3).

### 3.3.3 Echantillonnage :

L'essai est mené en dispositif randomisation totale qui garantit l'élimination des erreurs systématiques et le caractère purement aléatoire de tout élément d'erreur persistant dans les observations.



**Figure 3.3 :** Transplantation des variétés du blé dur (source personnelle)

### 3.4. Méthodes géotypage

#### 3.4.1. Prélèvement de feuille

Les feuilles sont prélevées au stade juvénile (au cour de germination), elles sont coupées à l'aide de ciseaux stériles et posées dans les tubes Eppendorf, ils sont numérotés selon l'emplacement de chaque échantillon et ils sont mis dans l'étuve pour sécher à 60-65°C pendant 48 heure (Figure 3.5).



**Figure 3.4** : Prélèvement de feuille (source personnelle)

### 3.4.2. Broyage de feuilles

Les feuilles séchées sont broyées manuellement avec du sable stérilisé jusqu'à l'obtention d'une poudre, puis conservées les Eppendorf dans le congélateur à une température de  $-80^{\circ}\text{C}$  jusqu'à l'extraction d'ADN (Figure 3.6).



**Figure 3.5 :** Broyage de feuilles (source personnelle).

### 3.4.3. Extraction d'ADN :

Ce travail est réalisé au laboratoire de biologie moléculaire des plantes au INRA (Alger). l'extraction d'ADN à partir de feuilles issues de chaque variétés broyées. Les broyats sont mis dans des tubes Eppendorf 2ml, addition de tampon de l'extraction CTAB (Tris + NaCl+ EDTA) et 2 %  $\beta$ mercapto-ethanol. Mélanger, et mettre au bain marie à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 10min puis prélever 1400 $\mu\text{l}$  (700 $\mu\text{l}$  puis agitation manuelle +700 $\mu\text{l}$ ) dans chaque tubes Mettre au bain marie pendant 1h, chaque 15 min fait une agitation manuelle. Additionner 500 $\mu\text{l}$  de chloroforme, laisser en agitation pendant 15 min. Après centrifugation pendant 15min, le surnageant (1000 $\mu\text{l}$  est transféré a un nouveau tube eppendorf contient 660 $\mu\text{l}$  de isopropanol mettre dans un congélateur pendant 30 min pour la précipitation, puis mettre au centrifugeuse a froid pendant 10 min après en récupéré l'ADN, le deuxième lavage

par éthanol à 70% ajouter 1ml ou bien 1000µl , puis centrifuger à 1300 tr/min à 4°C pendant 5 min le surnageant est éliminé et le culot laissant sèche pendant 30 min , puis additionner de 100µl de l'eau ultra pure laisser les tubes dans le congélateur .

L'ADN extrait peut être stocké dans un congélateur. La quantité d'ADN a été estimée visuellement sous rayons ultraviolets après migration sur mini gel d'agarose (100-120)v .

### **Protocol d'extraction d'ADN :**

**Les étapes suivantes se feront sous la hotte (sauf les centrifugations) :**

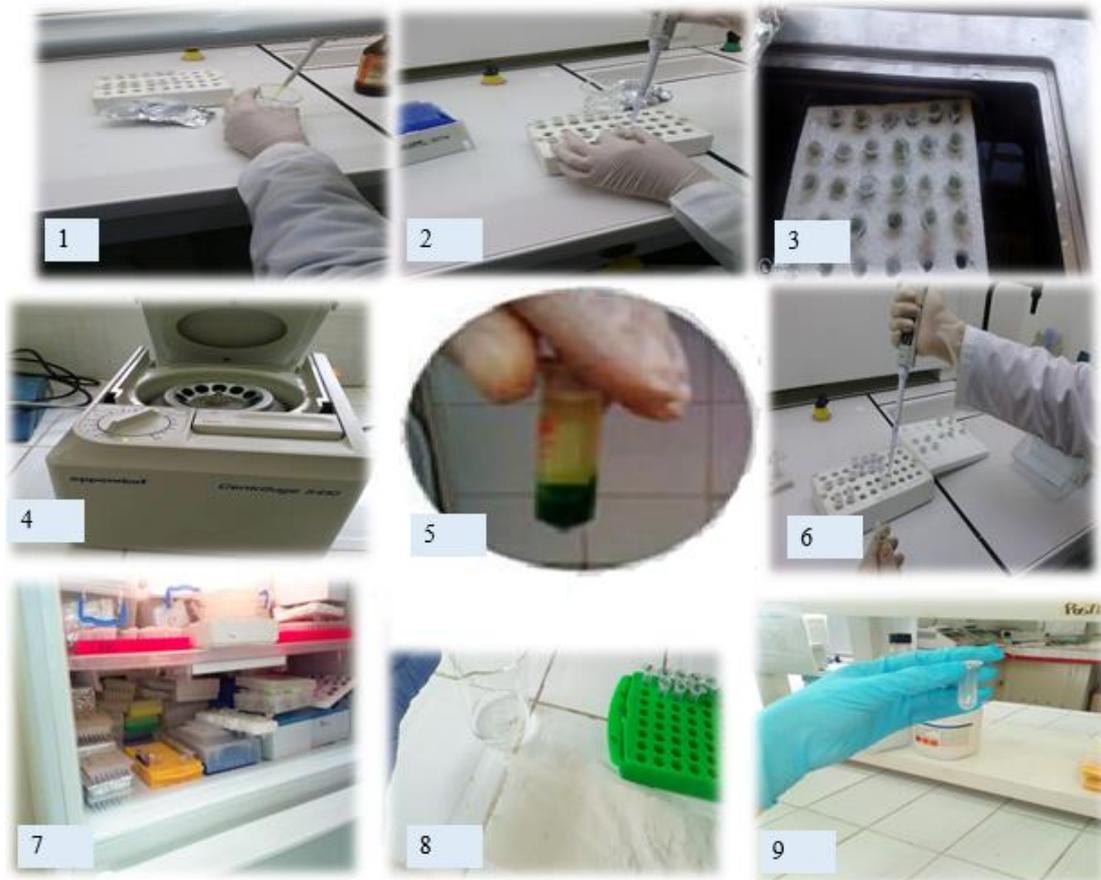
- Pour 100ml de CTAB avec 0.2% µl de β-mercaptoéthanol et préchauffer la solution dans un bain marie à 65° pendant 10 min.
- Ajouter 700 µl d'une solution CTAB/ β-mercaptoéthanol dans chaque tube puis agiter manuellement pour homogénéiser la solution après ajouter 700µl d'une solution dans chaque tube puis agiter manuellement.
- Incuber pendant une heure à 65 ° au bain marie avec agitation chaque 15 min.
- Ajouter 600 µl chloroforme : alcool isoamylique dans chaque tube et agiter manuellement (par inversement des tubes) pendant 15 min.
- Centrifuger les tubes pendant 15 minutes accélérer la phase de séparation, si nécessaire cette étape est répétée sur le surnageant pour clarifier la phase aqueuse.

**Pour les étapes suivantes on ne travaille plus sous hotte :**

Dans des nouveaux tubes, ajouter 600 µl d'isopropanol.

- Après centrifugation, récupérer la phase aqueuse supérieure sans aspirer l'interphase et la transférer dans des nouveaux tubes puis laisser précipiter au congélateur pendant 1 heure.
- Centrifuger à 13000g à 4°C pendant 10 minutes.
- Eliminer l'isopropanol par retournement lent et progressif du tube sur papier absorbant ; on peut voir apparaitre un filament blanc ou un amas correspondant à l'ADN extrait.
- Ajouter 1000 µl d'éthanol 70% dans chaque tube pour rincer le culot.

- Centrifuger à 13000g à 4°C pendant 5 minutes.
- Retourner les tubes afin d'éliminer l'éthanol et de récupérer seulement le culot d'ADN qui reste collé au fond du tube. Attention l'ADN peut se détacher du fond du tube et être éliminé avec l'éthanol, on utilise alors la pipette afin d'éliminer l'éthanol sans le culot.
- Laisser sécher les culots obtenus dans la hotte pendant 20min (en laissant les bouchons des tubes ouverts).
- Reprendre le culot d'ADN et ajouter 100 µl de l'eau ultra pure.
- Agiter les échantillons doucement et mettre dans le congélateur.



**Figure 3.6 :** principaux étapes d'extraction d'ADN (source personnelle)

### **3.4.3.1. Quantification d'ADN :**

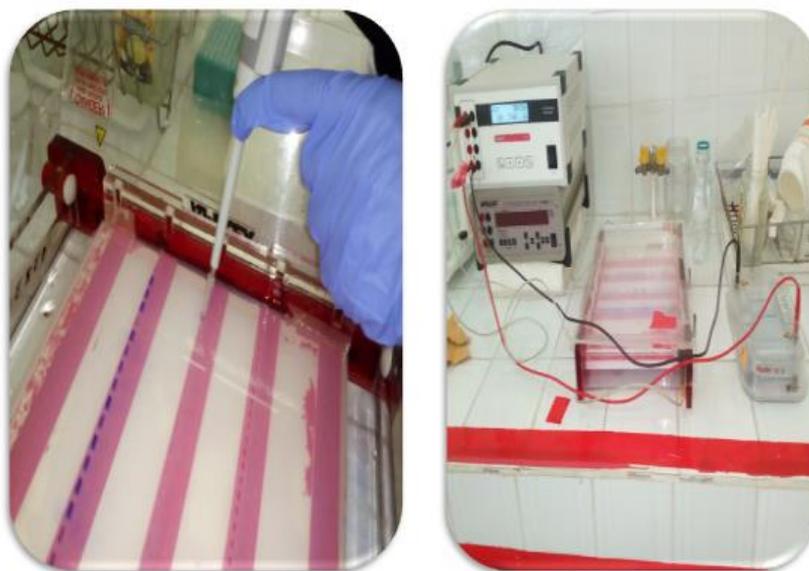
La quantification d'ADN ainsi que les tests quantité et de qualité ont été réalisés par spectrophotométrie et sur gel d'agarose à 1%.

#### **3.4.3.1.1. Dosage de l'ADN :**

Le dosage de l'ADN est réalisé par électrophorèse, permettant à la fois d'évaluer sa quantité et d'en apprécier sa qualité (bonne migration, pas de dégradation). L'électrophorèse est réalisé sur grand-gel d'agarose à 1 % ( 3g d'agarose dans 15 ml de TBE ajusté jusqu'à 300ml par l'eau distille) pour chaque solution à doser , trois dilutions ( 20% , 50% et 100% ) Sont préparer . La migration est faite à «100v- 120v » .

#### **3.4.3.1.2 Quantification de l'ADN par l'électrophorèse (quantité d'ADN sur un gel d'agarose) :**

Le test à réaliser sur gel d'agarose à 1% (Annexe 3). Le gel est coulé dans la cuve, une fois refroidie, il est placé dans la cuve pleine de tampon de migration (TBE  $\times$  5) (Annexe 2 ). Jusqu'à recouvrir légèrement le gel. Le mix d'ADN (4  $\mu$ l d'ADN + 3  $\mu$ l de bleu d'agarose +3 $\mu$ l de l'eau ultra pure), puis bien mélange le mix est déposée dans les puits 7 $\mu$ l de mix pour chaque échantillons d'ADN et 5 $\mu$ L marqueur du taille .

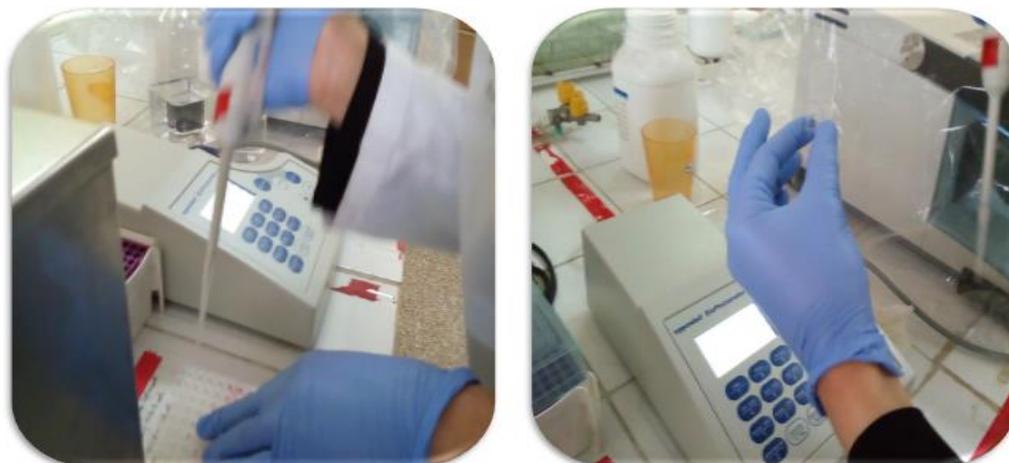


**Figure 3.7 :** Quantification d'ADN par électrophorèse (source personnelle).

### 3.4.3.1.3. Quantification d'ADN par spectrophotométrie :

L'ADN extrait est ensuite quantifié à l'aide d'un spectrophotométrie, ce qui permet de connaître la quantité et la pureté d'ADN recueillie. L'appareil permet de réaliser un dosage spectrophotométrie en utilisant une quantité des échantillons dilués (20 $\mu$ l d'ADN +80 $\mu$ l d'eau ultra pure). Avant de commencer les mesures, un blanc est réalisé avec de l'eau ultra pure. Par la suite 100 $\mu$ l de chaque échantillon est déposé dans la cuve de l'appareil.

L'absorbance de l'acide nucléique est à 260 nm, ceux des protéines à 280 nm et les composés organiques comme le phénol absorbent à 230 nm. Ainsi, les rapports 260nm /280nm et 260nm/230nm donnent une information sur la « pureté » des échantillons.



**Figure 3.8 :** Quantification d'ADN par spectrophotométrie (photo personnelle).

### 3.4.3.2 La réaction de polymérisation en chaîne PCR :

La réaction de polymérisation en chaîne PCR est réalisée dans un plaque PCR, mélange réactionnel qui comprend d'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon (tableau 3.1). Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température réitérés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant du thermocycleur. L'appareil permet la programmation de la durée et la succession des cycles de paliers de température.

**Tableau 3.1 :** Composition du mélange réactionnel de la PCR

	<b>Pour 1 échantillon</b>	<b>Pour n échantillons</b>
<b>Eau ultra pure</b>	4.975 $\mu$ l	248.75 $\mu$ l
<b>5<math>\times</math> Buffer</b>	2 $\mu$ l	100 $\mu$ l
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	0.6 $\mu$ l	30 $\mu$ l
<b>DNTP</b>	1 $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>Amorce</b>	1 $\mu$ l	50 $\mu$ l
<b>Taq polymérase</b>	0.025 $\mu$ l	1.25 $\mu$ l
<b>ADN</b>	1 $\mu$ l	/

Les amplifications sont réalisées selon différents programmes de PCR , basées sur la température ainsi que sur le temps , le principe est le suivant :

\*Pré-dénaturation à 94°C .

\*Dénaturation :

-Dénaturation à 94°C .

-Hybridation d'amorce.

-Elongation à 72°C .

\*Finalisation d'élongation 72 °C .

. La température d'hybridation de chaque amorce dépendant Tm des paires d'amorces.

➤ La température d'hybridation de chaque amorces dépendant Tm des paires d'amorces (Tableau 3.2.) et le temps de chaque étapes dépend de la taille des amplifias.

➤ 3 paires d'amorces a été testé pour l'évaluation du polymorphisme des génotypes représentés au tableau suivants (Tableau 3.2).

**Tableau 3.2. :** Microsatellites testés pour l'analyse des génotypes de dur.

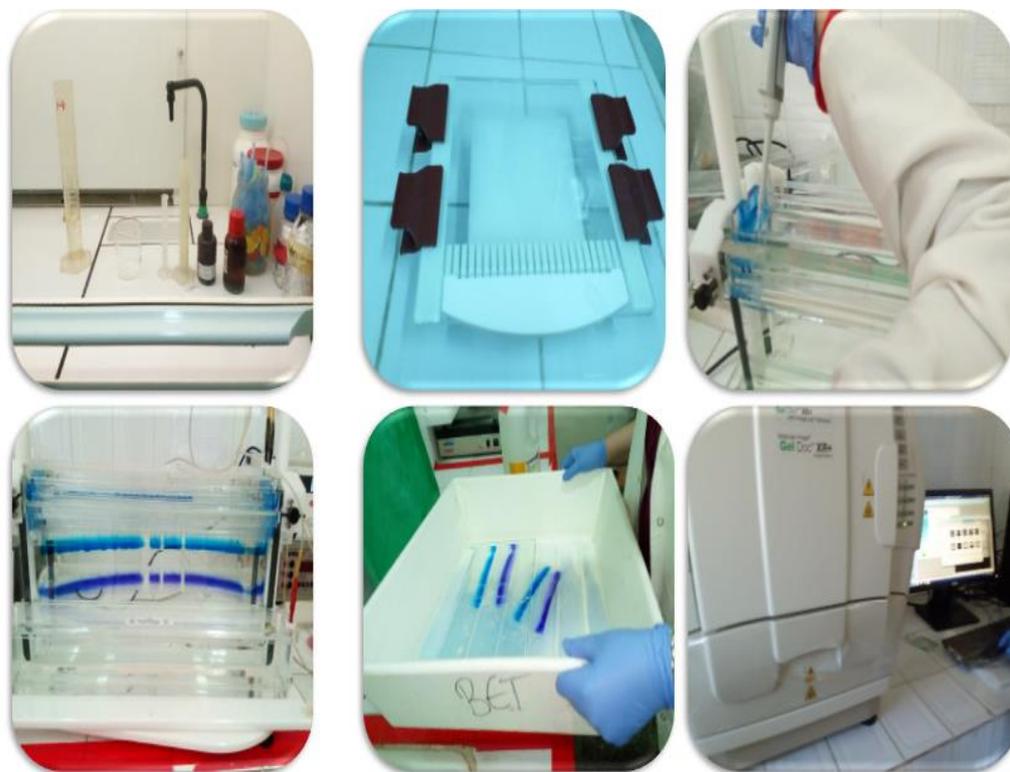
M	Locus	Amorce gauche 5' 3' Amorce droite 5' 3'	T° d'hybridation	Type de marqueur
M1	Xwmc44 Lr46	GGTCTTCTGGGCTTTGATCCT GTTGCTAGGGACCCGTAGTGG	61 °C	SSR
M2	Xwmc140 Lr46	ATGGAGATATTTGGCCTACAA CATTGACTTCAAGGCGTGACA	60 °C	SSR
M3	Lr34	AGCTATGCTTCACGAGGAAG CTCCTCTTTATATCGCGTCCC	55 °C	STS

### 3.4.3.3 Electrophorèse des produits de la réaction PCR :

Lorsque la quantité de produits d'amplification est suffisante, ceux-ci sont soumis à une électrophorèse en gel d'acrylamide à 40% pour une meilleure résolution des bandes (annexe3).

Cette étape est initiée par le traitement des plaques en verre au NAOH pendant 5 mn puis rincées à l'eau. Le coulage de gel est effectué après un bon serrage des plaques ; puis laissé pendant 30min pour une bonne polymérisation. Les plaques sont déposées dans une solution de tampon TBE (5x). Le mix PCR (10  $\mu$ l de mixte +5  $\mu$ l de bleu acrylamide) est déposé dans chaque puits : 7  $\mu$ l pour les échantillons de mixte et 5  $\mu$ l pour marqueur de taille, la migration se déroule sous une tension de 300 V pendant 2 heures (figure 3.10).

La visualisation des produits PCR se fait sous lampe UV reliée à un dispositif photographique en liaison avec un ordinateur permettant de sauvegarder l'image.



**Figure 3.9 :** Les étapes d'électrophorèse sur gel d'Acrylamide et la révélation sur lampe des UV (photo personnelle).

## 3.5. Phénotype :

### 3.5.1 La longueur de la tige :

Elle a été mesurée à partir de la base de la tige jusqu'à la base de l'épi.



Figure 3.10: Mesure de la longueur de tige du blé dur.

### 3.5.2 Longueur de l'épi :

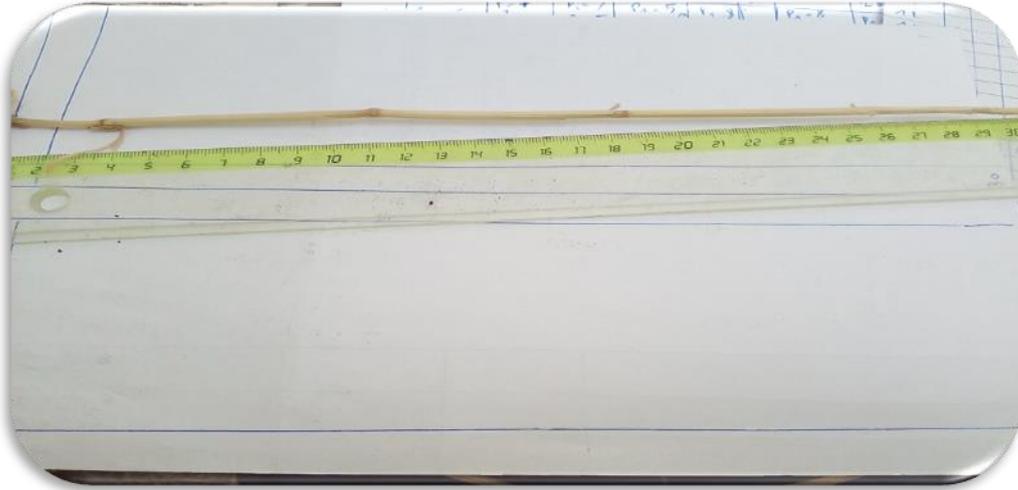
Elle a été déterminée par la mesure de la distance qui sépare la base de l'épi et son extrémité mise à part les barbes.



Figure 3.11 : Mesure la longueur de l'épi du blé dur.

### 3.5.3 Nombre des nœuds :

Elle a été déterminée par compter les nœuds à la base de la tige.



**Figure 3.12** : nombre des nœuds de blé dur.

### 3.5.4 Nombre des grains par épi :

Ce paramètre consiste à dénombrer les grains qui se trouvent sur chaque épi.



**Figure 3.13** : nombre des grains par épi de blé dur.

### 3.5.5 Poids de mille grains :

Le poids de mille grains est exprimé en gramme, après de comptage 10 grains de chaque échantillon à cause de la faiblesse du nombre de grains par épi obtenus par certains génotypes, on les pesé à l'aide d'une balance de précision, puis extrapolé à 1000 graines ce qui nous donne le poids de mille grains.



**Figure 3.14** : Mesure le poids de mille grains de blé dur.

### 3.6.6 Nombre d'épillets total par épi :

Ce paramètre correspond au nombre total des épillets qui se trouvent sur l'épi.



**Figure 3.15** : nombre d'épillets total de blé dur.

### 3.5.7 Nombre d'épillets stériles et fertiles par épi :

On a compté sur chaque épi le nombre d'épillets stériles et fertiles.

### 3.5.8 Nombre de talles par plante

Le nombre de talles par plante est estimé à partir du comptage du nombre de talle de chaque échantillon.



**Figure 3.16** : nombre de talle par plant de blé dur (source personnelle).

### 3.6. Analyses statistique

A partir de phénotypage les données recueillies ont fait l'objectif d'une analyse de la variance avec comparaison de moyennes. Cette analyse a été suivie par le test LSD qui permet de classer les moyennes dans différents groupes homogènes. Le logiciel utilisé est GenStat. On admet que :

- **P=0.001** Effet variable très hautement significatif (THS).
- **P=0.01** Effet variable hautement significatif (HS).
- **P=0.05** Effet variable significatif (S).
- **P>0.05** Effet variable non significatif (NS).

On a considéré le coefficient de variation (CV) qui représente l'erreur, il est exprimé en pourcentage de la moyenne comme suit :

- **Faible** : CV = 10%.
- **Moyen** : 10%=CV=20%.
- **Elevé** : 20%=CV=40%.

### 4.1. Génotypage

#### 4.1.1 Vérification de la qualité et la quantité d'ADN extrait

##### 4.1.1.1 quantification de l'ADN par spectrophotométrie

Après l'extraction d'ADN, on a prrécédé à une quantification de nos extraits parr spectrophotométrie pour connaitre les concentrations de nos echentillons et leur purté afin de réaliser l'amplification par PCR.

**Le tableau 4.1** : représente la quantification au spectrophotomètre des extraits d'ADN des variétés de blé dur étudiées.

Echant	[ADN] µg/µl	260/280	260/230	Echant	[ADN] µg/µl	260/280	260/230
01	129	1.12	0.78	22	98.6	1.20	0.79
02	137.9	1.10	0.87	23	108.8	1.19	0.80
03	142.9	1.15	0.89	24	136.8	1.23	0.88
04	213.9	1.13	0.83	25	67.2	/	1.94
05	151.2	1.14	0.83	26	56.6	/	/
06	132.5	1.15	0.87	27	13.2	/	/
07	121.8	1.13	0.83	28	44.7	/	1.17
08	128.5	1.16	0.81	29	0.8	/	/
09	139.7	1.21	0.87	30	9.5	/	/
10	115.8	1.16	0.84	31	3.8	/	0.17
11	117.2	1.14	0.74	32	48	2.62	0.48
12	138.4	1.24	0.89	33	74.9	1.82	0.86
13	158.6	1.12	0.82	34	116.1	2.10	1.23
14	124.9	1.14	0.88	35	159.9	/	/
15	151.2	1.25	0.89	36	158.6	/	/
16	162.9	1.26	1.05	37	371	2.02	1.61
17	116.5	1.16	0.77	38	29.5	2.41	0.35
18	90.9	1.17	0.75	39	35	2.29	0.47
19	131.3	/	/	40	353.5	1.85	1.64
20	75.8	1.15	0.81	41	52.2	1.95	0.50
21	81.0	1.13	0.80	/	/	/	/

On note que les concentrations obtenues sont largement suffisantes pour un bon déroulement d'une amplification d'ADN, les concentrations de nos échantillons varient entre 3.8 µg/µl et 213.9 µg /µl. avec un rapport 260/280 nm inférieur à 1.8 pour la majorité des échantillons, ce qui reflète la présence des 'ARN dans nos échantillons, puisqu'on n'a pas utilisé l'ARNase lors de l'extraction. (tableau 4.1).

La présence des ARN dans nos échantillons ne va pas agir sur le bon déroulement de l'amplification des SSRs.

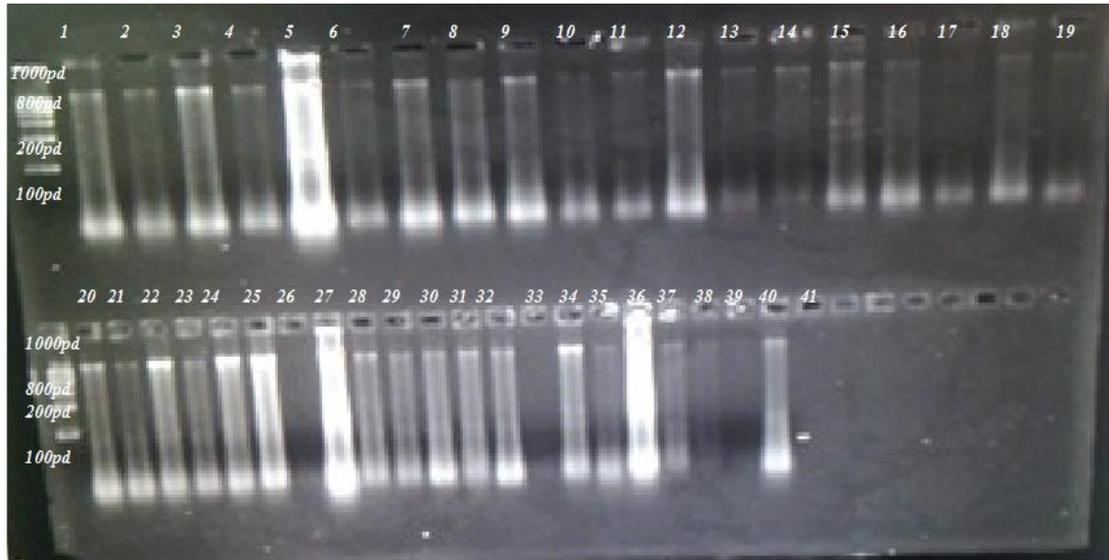
L'analyse des rapport  $R_1 = 260/280$  et  $R_2 = 260/230$  montrent que la pureté d'ADN pour les contaminations en protéines et en ARN respectivement est assurée, pour cette évaluation nous avons utilisé les normes suivantes (Nolan et *al.*, 2006).

- $1.8 \leq R \leq 2$  ADN est pur.
- $R \leq 1.8$  contamination par protéines.
- $R > 2$  présence d'ARN.

### 4.1.1.2 Qualités d'extraction sur gel d'agarose

A partir des résultats d'électrophorèse sur gel d'agarose à 1% effectué sur les extraits d'ADN des différents génotypes étudiés, on note que la qualité des extraits d'ADN est bonne et ceci se rapporte à l'obtention d'une seule bande de taille commune et d'intensité variable pour l'ensemble des individus, selon les quantités obtenues.

D'autre part ces gels (figure 4.1) montrent l'absence totale de la contamination protéique ce qui confirme les résultats de quantification par spectrophotomètre. En revanche, nous avons observé la présence d'ARN (smear), ceci s'explique par le fait que nous n'avons pas éliminé les ARN par l'ARNase lors de l'extraction selon le protocole (annexe) modifié par Udupa et *al.*, (1999).



**Figure 4.1:** analyse de la qualité et la quantité d'extraction d'ADN des échantillons de blé dur étudié par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. 1 : Sahel; 2 : Stetifs ; 3 : Chen's; 4 : Core; 5 : Waha; 6 : Cammizza; 7 : Saourah; 8 : Massinissa; 9 : Sebaou; 10 : Hbb; 11 : Bolenga; 12 : Vitron; 13 : Megress; 14 : Hieder; 15 : Gtadur; 16 : Mansourah; 17 : Colosseo; 18 : Hdba03; 19 : Kebir; 20 : 17 Rdente; 21 : Orjaune; 22 : Ofanto; 23 : Polinicum; 24 : Polinicum; 25 : Bousselam; 26 : Bousselam; 27 : Durbel; 28 : Poggio; 29 : Tassili; 30 : Simeto; 31 : Cirta; 32 : Ciccio; 33 : Guengoum R'khem; 34 : Bidi 17; 35 : Karim; 36 : Cham3; 37 : Wahbi; 38 : Belikh 02; 39 : Gloire de montgolfier; 40 : Capeti; 41 : Oum-Rabi.

### 4.2 Analyses de polymorphisme des génotypes avec 3 marqueurs

Pour cette analyse, les étapes précédentes a été réalisée par méthodes CTAB selon Udupa *et al.*, (1999).

L'utilisation des marqueurs pour caractériser les génotypes exprime les résultats sous forme d'amplification et ils sont présentés au profil électrochimique comme suit :

#### 4.2.1 Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 34 :

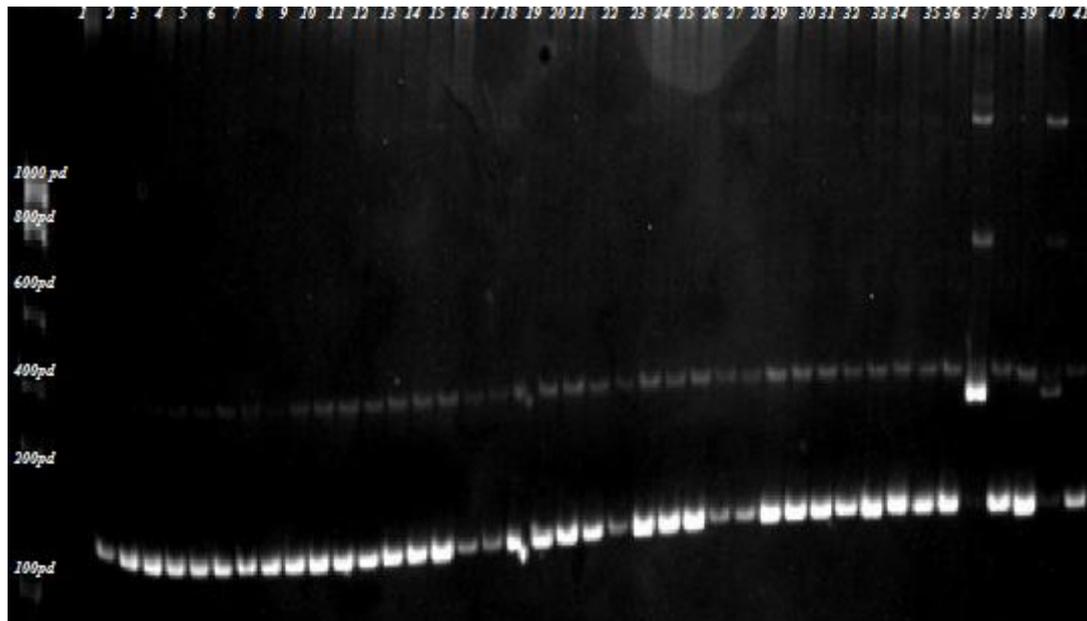
L'analyse du gel d'acrylamide du gène Lr34(Fig4.4) montre la présence des amplifications de la bande à environ 125 pb pour la majorité des génotypes Stetif's, Chen's, Core, Waha, Cammizza, Souarah, Massinissa et Sebaou etc. Ce résultat supposera que ces génotypes seraient résistants à la rouille, nous pouvons supposer que ce gène est dominant, donc les génotypes sont homozygotes pour ce caractère. L'absence d'amplification à 125 pb pour les autres génotypes Sahel, Colesseo, Hdba03, Polinicum, Durbel, Poggio, Wahbi et Capeti , indique que ces génotypes seraient susceptibles à la rouille et donc le gène semble récessif.

Plus de 60 gènes Lr et QTL ont été décrits dans le blé (McIntoch *et al.*, 2005). Toutefois, beaucoup d'entre eux sont des gènes spécifiques à la race (gène pour gène) et actuellement plusieurs sont utilisés par les améliorateurs.

Cependant, la résistance fournie par ces gènes peut être de courte durée car les rouilles sont en constante évolution d'acquérir la virulence contre ces gènes, d'où la nécessité de pyramider dans les nouveaux cultivars des « slow rusting » gènes.

Selon Singh et Huerta-Espino (2003), Lr34 est un slow rusting gène qui offre une résistance des plantes adultes durable et non spécifique. Les travaux de Sucenga *et al.*, en 2003 et Krattinger *et al.*, en 2009 ont montré que Lr34 est le même gène que Yr 18 (résistance à la rouille jaune) ; PM38 (résistance à l'oidium) et Ltn1 (nécrose des feuilles).

Lr34 a été décrit la première fois par Dyck *et al.*,(1966) dans le cultivar Frontana. Il est situé sur le bras court du chromosome 7D (Ciuca *et al.*, 2015) à proximité de locus Xgwm295.



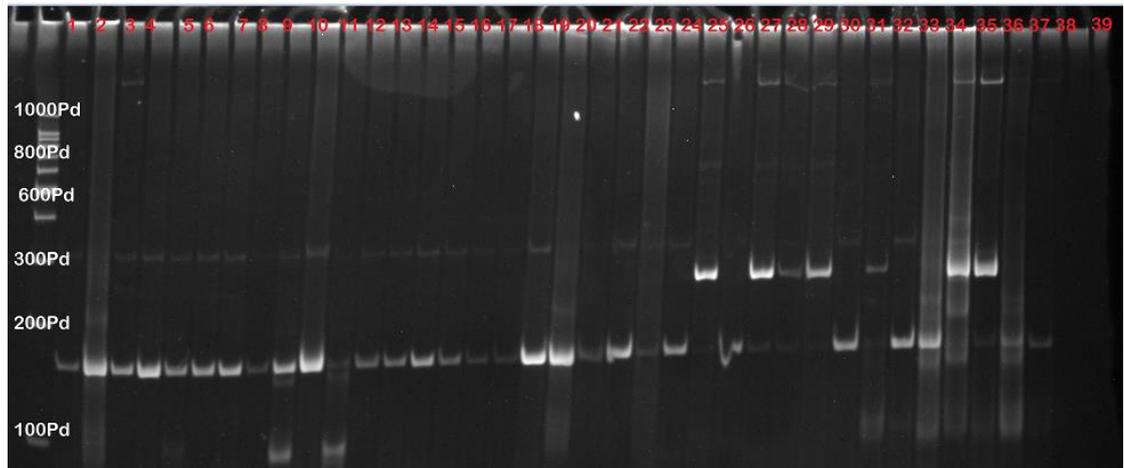
**Figure 4.2:** Polymorphisme des génotypes avec marqueur STS pour le gène Lr34 ,analyses par électrophorèse sur gel d'acrylamide,200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb. 1 : Sahel; 2 : Stetifs ; 3 : Chen's; 4 : Core; 5 : Waha; 6 : Cammizza; 7 : Saourah; 8 : Massinissa; 9 : Sebaou; 10 : Hbb; 11 : Bolenga; 12 : Vitron; 13 : Megress; 14 : Hieder; 15 : Gtadur; 16 : Mansourah; 17 : Colosseo; 18 : Hdba03; 19 : Kebir; 20 : 17 Rdente; 21 : Orjaune; 22 : Ofanto; 23 : Polinicum; 24 : Polinicum; 25 : Bousselam; 26 : Bousselam; 27 : Durbel; 28 : Poggio; 29 : Tassili; 30 : Simeto; 31 : Cirta; 32 : Ciccio; 33 : Guengoum R'khem; 34 : Bidi 17; 35 : Karim; 36 : Cham3; 37 : Wahbi; 38 : Belikh 02; 39 : Gloire de montgolfier; 40 : Capeti; 41 : Oum-Rabi.

### 4.2.2 Analyse des résultats du génotypage pour le gène de résistance à la rouille brune Lr 46 avec les marqueurs Xwmc44 et Xgwm140 :

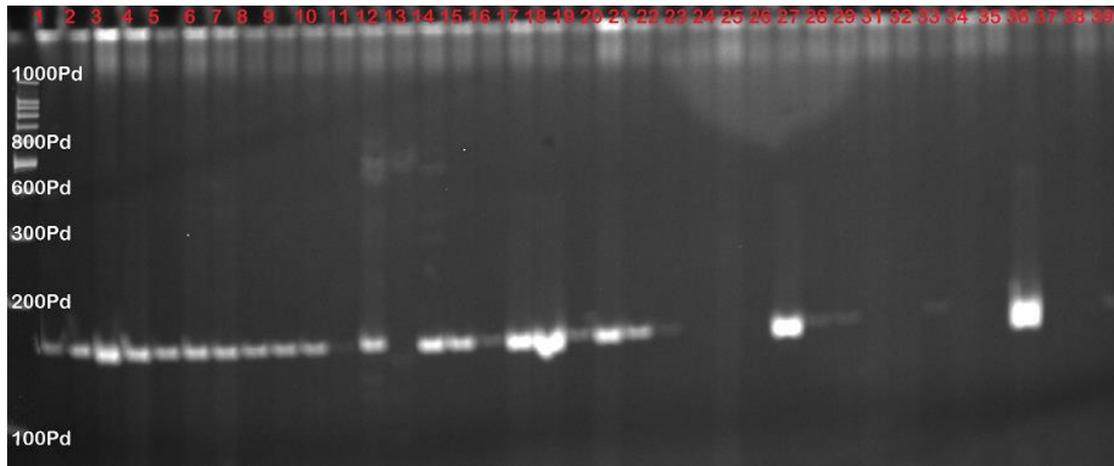
Deux marqueurs SSR Xwmc44 et Xgwm140 ont été testés pour l'analyse du polymorphisme des 23 génotypes pour le gène de résistance à la rouille brune. L'analyse du gel montre la présence des amplifications de la bande à environ 250 pb chez la plupart des génotypes : Stetif's, Chen's, Core, Waha, Cammizza, Souarah ect, (Fig 4.2 et 4.3). Ce résultat supposera que ces génotypes seraient résistants à la rouille, alors que les génotypes sahel, colesseo hdb03 polinicum, cirta, belikh02, et Gloir de montgolfier ne présentent aucune amplification, ce qui traduit que ces génotypes seraient susceptibles à la rouille.

Lr46 est un gène de résistance à la rouille (slow rusting). Ce gène ne confère pas à la plante une résistance à toutes les races de rouille brune (*Puccinia triticina*), mais permet de retarder le processus de l'infection ou de réduire le développement des symptômes causés par un large éventail de race de rouilles sur plantes adultes (Martinez et al., 2001).

Lr46 a été décrit pour la première fois en 1988 par Singh et al., dans le cultivar Pavon76. En 2003, William et al., ont également constaté que Lr46 a été étroitement lié ou pléio tropique à un gène de résistance à la rouille jaune Yr29. Martinez et al., (2001) ont montré que la période de latence des plantes adultes infectées était significativement plus faible chez les plantes portant Lr46 par rapport aux témoins sans gène (William et al., 2003).



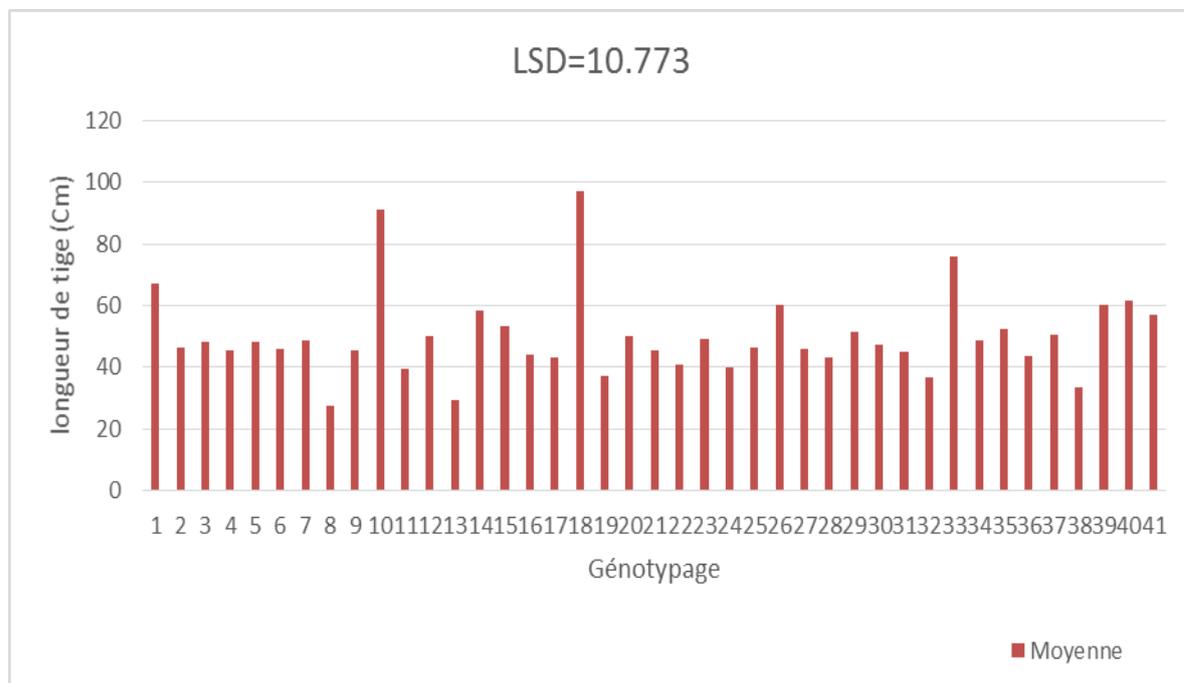
**Figure 4.3:** Polymorphisme des génotypes avec marqueur SSR pour le gène Lr46 avec le marqueur X gwm 44 Analyses par électrophorèse sur gel d'acrylamide, 200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb. 1 : Sahel; 2 : Stetifs ; 3 : Chen's; 4 : Core; 5 : Waha; 6 : Cammizza; 7 : Saourah; 8 : Massinissa; 9 : Sebaou; 10 : Hbb; 11 : Bolenga; 12 : Vitron; 13 : Megress; 14 : Hieder; 15 : Gtadur; 16 : Mansourah; 17 : Colosseo; 18 : Hdba03; 19 : Kebir; 20 : 17 Rdente; 21 : Orjaune; 22 : Ofanto; 23 : Polinicum; 24 : Polinicum; 25 : Bouselam; 26 : Bouselam; 27 : Durbel; 28 : Poggio; 29 : Tassili; 30 : Simeto; 31 : Cirta; 32 : Ciccio; 33 : Guengoum R'khem; 34 : Bidi 17; 35 : Karim; 36 : Cham3; 37 : Wahbi; 38 : Belikh 02; 39 : Gloire de montgolfier; 40 : Capeti; 41 : Oum-Rabi.



**Figure 4.4 ;** Polymorphisme des génotypes avec marqueur SSR pour le gène Lr46 avec le marqueur X gwm 140, analyses par électrophorèse sur gel d'acrylamide, 200volts pour migration pendant 3h, visualisé sous UV en présence d'un marqueur de taille 100pb. 1 : Sahel; 2 : Stetifs ; 3 : Chen's; 4 : Core; 5 : Waha; 6 : Cammizza; 7 : Saourah; 8 : Massinissa; 9 : Sebaou; 10 : Hbb; 11 : Bolenga; 12 : Vitron; 13 : Megress; 14 : Hieder; 15 : Gtadur; 16 : Mansourah; 17 : Colosseo; 18 : Hdba03; 19 : Kebir; 20 : 17 Rdente; 21 : Orjaune; 22 : Ofanto; 23 : Polinicum; 24 : Polinicum; 25 : Bousselam; 26 : Bousselam; 27 : Durbel; 28 : Poggio; 29 : Tassili; 30 : Simeto; 31 : Cirta; 32 : Ciccio; 33 : Guengoum R'khem; 34 : Bidi 17; 35 : Karim; 36 : Cham3; 37 : Wahbi; 38 : Belikh 02; 39 : Gloire de montgolfier; 40 : Capeti; 41 : Oum-Rabi.

### 4.3. Phénotypage

#### 4.3.1 La longueur de tige



**Figure 4.5 :** longueur de tige de génotypes étudiés.

L'ANOVA a révélé un effet très hautement significatif ( $P < 0.001$ ), du facteur génotype sur la longueur de tige, (Annexe 7, Tab 1). Le test LDS présenté par les variétés étudiées varie entre 97.25 cm à 27.50 cm.

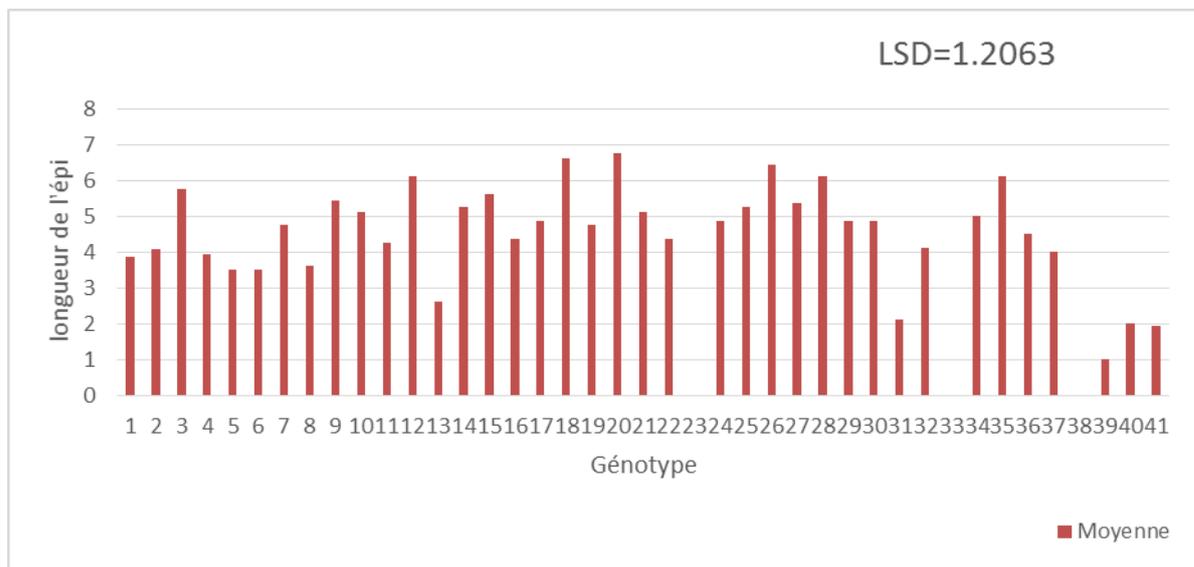
La moyenne la plus élevée a été enregistrée par la variété Hadb03 avec 97.25 cm, alors que la moyenne la plus faible a été enregistrée chez la variété Massinissa avec 27.50 cm. Les autres variétés montrent des valeurs intermédiaires 50.05 cm.

La longueur de la tige est fortement corrélée avec la durée de la montaison. Cette liaison est plus souvent respectée dans les conditions naturelles : une montaison lente se traduit généralement par des tiges hautes (Gate, 1995). La longueur réduite de paille n'est qu'un des facteurs de résistances à la verse (Clément-Grandcourt et Prats, 1971). Les variétés à paille courte et grosse sont plus résistantes que les variétés à paille haute et fine (Karrou, 2000).

Les génotypes de blé dur à paille haute sont plus tolérants, ils peuvent remplir le grain en cas de déficit hydrique par leur capacité de remobiliser les assimilats stockés dans la tige (Blum, 1988). Une étude de Bada (2007) dans les conditions du climat

semi aride a montré que les variétés locales comme M.B. Bachir possèdent une meilleure capacité à rivaliser avec le brome rouge, en raison essentiellement de leur grande taille qui leur confie une tolérance à la sécheresse.

### 4.3.2. La longueur de l'épi



**Figureur4.6** : longueur de l'épi de génotypes étudiées

L'ANOVA a révélé un effet très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) du facteur génotype sur la longueur de l'épi, ce résultat est (Annexe 7, Tab 2).

Le test LSD présentées par les variétés étudiées varient entre 6.75 cm à 2.125 cm. La longueur de l'épi la plus élevée 6.75 cm chez 17 Rdente par contre la plus faible 2.125 chez la variété Cirta. Les autres variétés présentent des moyennes variables.

Les résultats obtenus pour ce caractère d'adaptation pour l'ensemble des variétés étudiées marquent la présence d'une grande variabilité.

La longueur des épis sans barbes varie entre 8,06 à 5,02 cm chez les variétés de blé dur. Selon Febrero *et al.*, (1990) ce paramètre est un indice de rendement, parce qu'il participe par les assimilés photosynthétiques à la formation du grain.

Selon Gate *et al.*, (1992) ,le nombre d'épis subira une forte diminution si le déficit hydrique intervient durant la phase de montée des épis.

4.3.3 Nombre des nœuds :

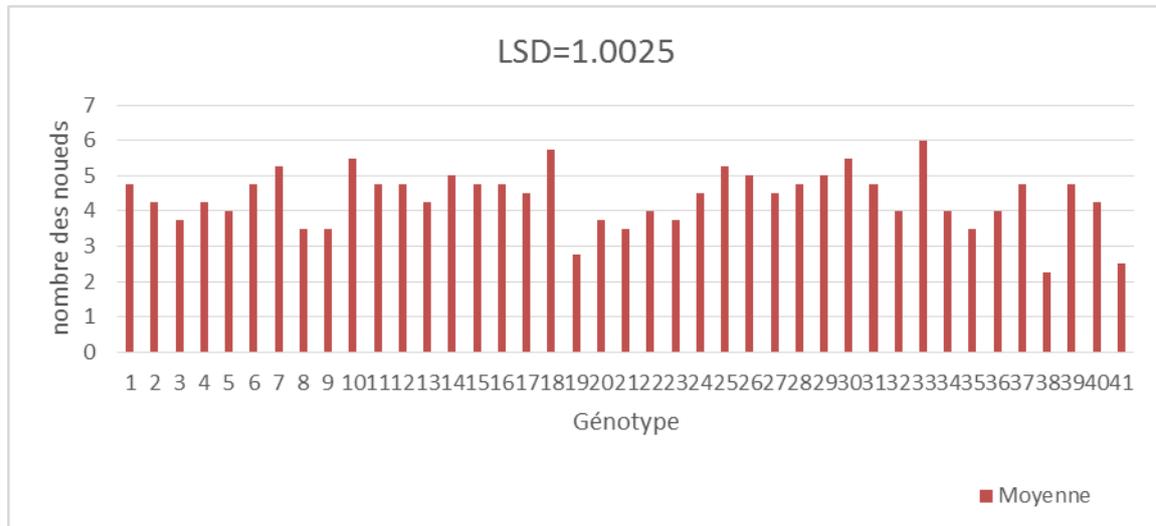
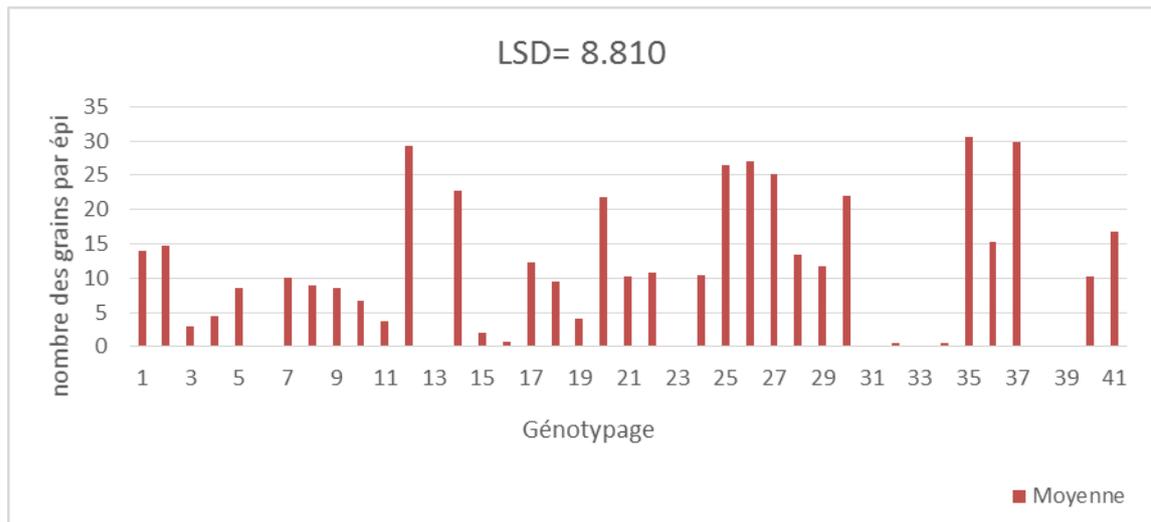


Figure 4.7 : nombre des nœuds de génotypes étudiés

L’ANOVA de 41 génotypes a révélé un effet hautement significatif ( $P < 0.001$ ) du facteur génotype sur la longueur de l’épi de blé dur, on confirmé nos résultat selon (Annexe7, Tab3).

Le test LSD présenté par les variétés étudiées varient 5.75 à 2.75. La moyenne de nombre de nœuds la plus élevées 5.75 correspond la variété Hddba 03 et par contre la moyenne la plus faible chez la variété Kebir à 2.75. Les autres moyennes sont variables variété à l’autre.

### 4.4.4. Nombre de grains par épi :



**Figure 4.8** : nombre des grains par épi de génotypes étudiés

L'ANOVA a révélé un effet très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) du facteur génotype sur le nombre des grains par épi. ce résultat est on confirmé selon (Annexe7, Tab 4). Le test LSD présenté par les variétés étudiées varie entre 30.50 à 0.50.

La moyenne des grains par épi la plus élevée 30.50 correspond la variété Karim par contre la moyenne la plus faible chez les variétés Bidi 17, les autres variétés possédant des moyennes variables.

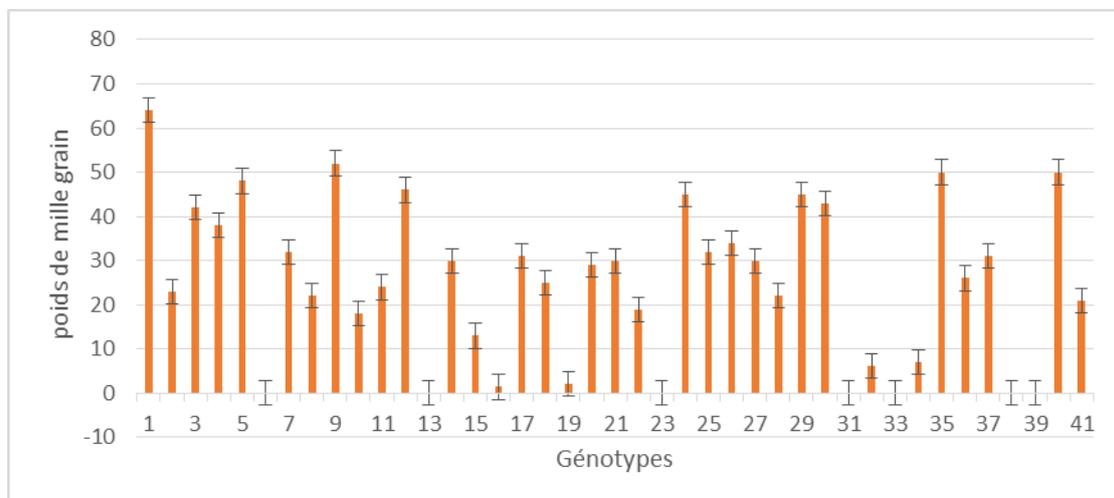
Des variations significatives à très hautement significatives du nombre de grains par épi sont observées respectivement chez la variété M.B. Bachir et La variété Bousselam. Le nombre de grains par épi est une caractéristique variétale, très influencée par le nombre d'épis par mètre carré (Couvreur, 1981). Le nombre moyen de grains produits par les trois variétés étudiées apparaît plus faible comparativement aux résultats d'autres études. Bien que, Cherfia (2010) a enregistré des valeurs allant de 2,8 jusqu' à 36,4 grains par épi, Makhoulf et *al.*, (2012) ont enregistré des valeurs comprises entre 24,4 et 31,4 et Bousba (2012) a enregistré des moyennes allant de 16,72 jusqu' à 50,02. Les différences du nombre de grains par épi est plus indicatrices des capacités productrices d'un génotype donné. Le rendement en grains est positivement corrélé et significativement au nombre de grains par épi (Attab et Brinis, 2012).

### 4.4.5. Poids de mille grains :

Les moyennes du facteur génotype sur poids de mille grains varient entre 64 à 1.4 , et la moyenne la plus élevée enregistrée chez variété Sahel à 64g par contre le valeur le plus faible chez Mansourah à 1.4 . Les autres variétés présentent des moyennes variables.

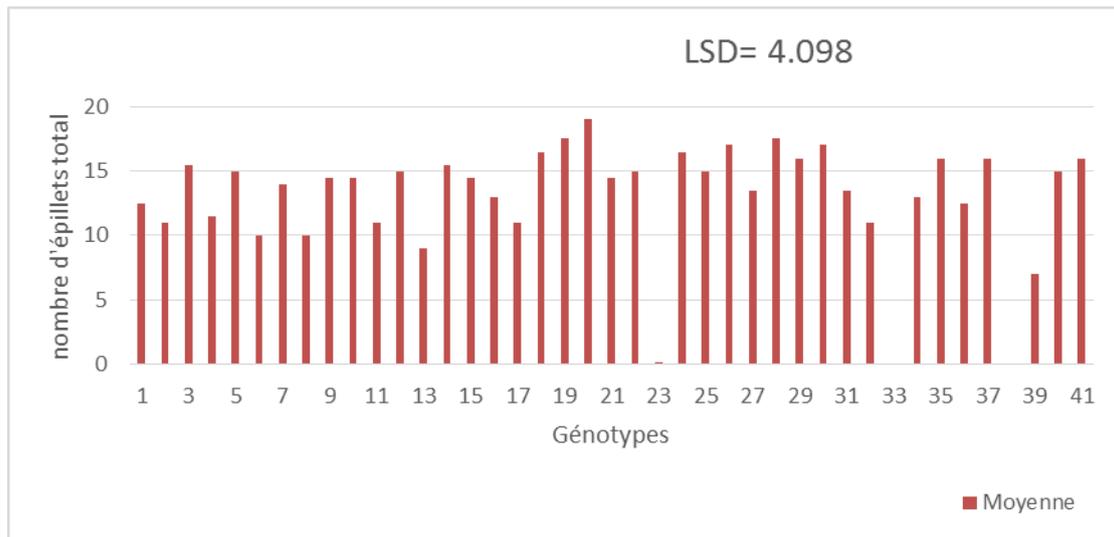
Le poids de mille est un paramètre très important. Il est utilisé dans la sélection des variétés pour caractériser la grosseur et la densité des grains. Grignac (1981) précise que le poids de mille grains diminue lorsque la fertilité de l'épi augmente .Ce poids dépend fortement des conditions climatiques et de la nutrition azotée durant la maturation.

Les résultats concernant le poids de mille grains montrent que la majorité des génotypes ont un P.M.G élevé à très élevé.



**Figure 4.9 : poids de mille grains de de génotypes étudiés**

### 4.4.6 Nombre de l'épillets total :



**Figure 4.10 :** nombre d'épillets total de génotypes étudiées.

L'ANOVA a révèlè un effet très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) du facteur génotype sur le nombre d'épillets total. (Annexe7, Tab5) .Annexe, Tab) . Le test LSD présenté par les variétés étudiées varient entre 17.50 à 7.

La moyenne des grains par épi la plus élevées 17.50 selon les variétés Poggio , Kebir et note la moyenne la plus faible chez la variété Gloire de Montgolfier .Les autres moyennes sont variables d'une variété à une autre.

Selon Gate,( 1995) le nombre totale d'épillets dépend simultanément de la vitesse de production et de la durée de formation des ébauches, l'élévation de température a pour effet d'accélérer la vitesse d'initiation des ébauches et de raccourcir la durée.

Les facteurs qui déterminent de façon dominante la production d'épillets sont la température et la durée de jour (Mekli et al.,1995).

4.4.7. Nombre d'épillet stériles et fertiles par épi :

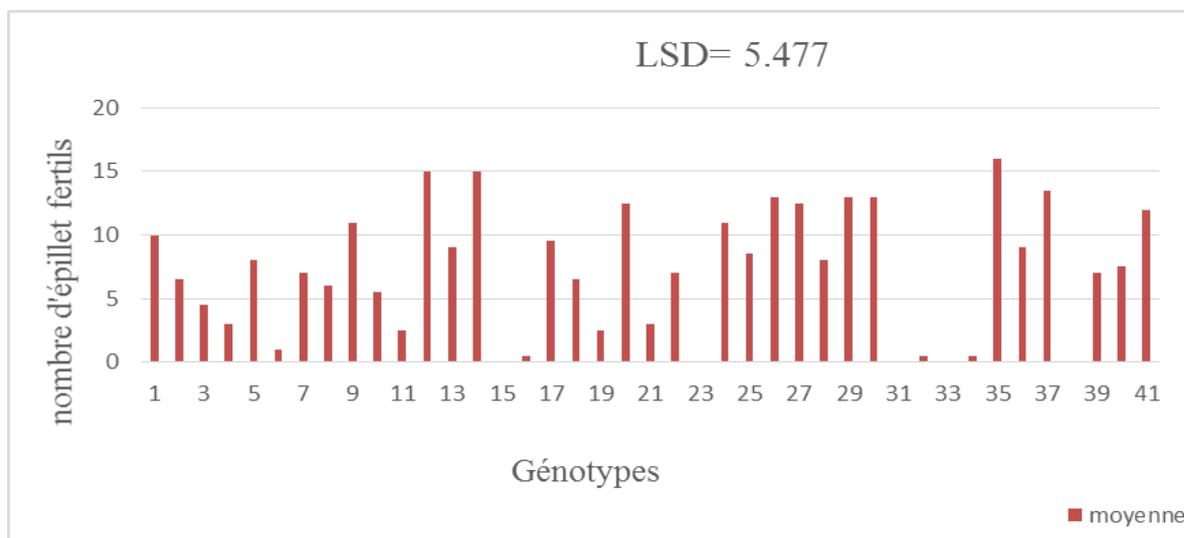


Figure 4.11 : nombre d'épillet fertile de génotypes étudiée.

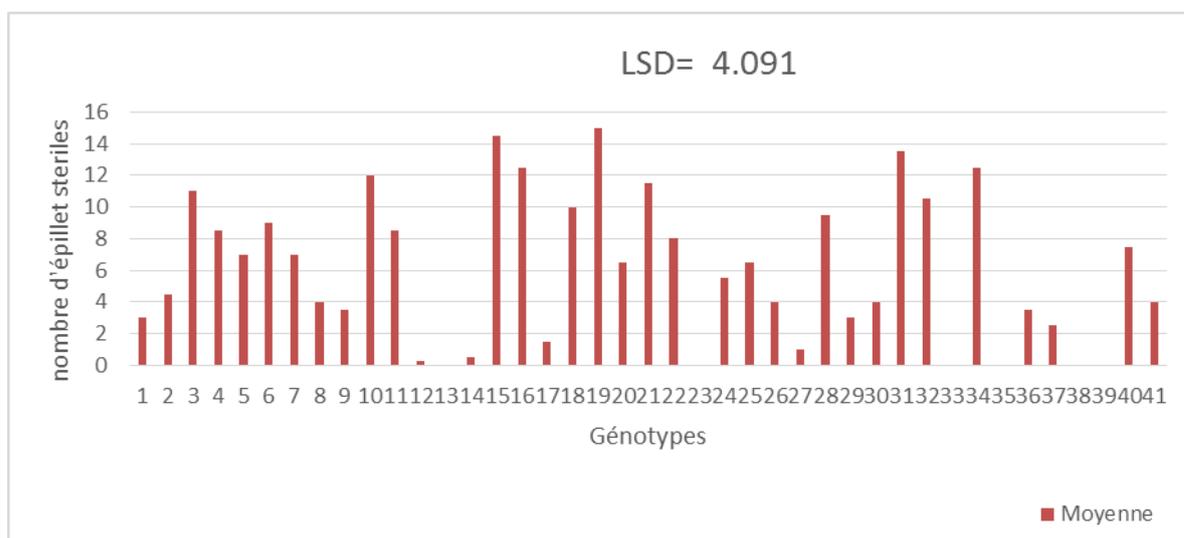


Figure 4.12 : nombre d'épillets stérile de génotypes étudiées

L'ANOVA a révélé un effet très hautement significatif du facteur ( $P < 0.001$ ) du génotype sur le nombre d'épillet fertile (Annexe7, Tab6) Le test LSD présentées par les variétés étudiées varient entre 16 à 0.5.

La meilleure valeur a été enregistré chez la variété Karim, les variétés suivantes Mansourah, Ciccio et Bidi 17 présentent des valeurs très faibles à 0.5. La moyenne générale de l'épillet fertile c'est : 7.09

L'ANOVA à révélé un effet très hautement significatif ( $P < 0.001$ ) du facteur génotype sur le nombre d'épillet stérile, une a confirmé ce résultat est (Annexe7, Tab7). Le teste LSD présentées par les variétés étudiées varient entre 15 à 0.25.

La meilleure valeur à été enregistré chez la variété Kebir à 15, la variété Vitron présente de valeur la plus très faible à 0.25.

L'analyse a révèle un effet très hautement significatif du facteur génotype sur les deux paramètres : nombres d'épillet stériles et fertiles par épi , cependant on remarque la moyenne de nombre d'épillet fertiles sont plus élevée de 7.09 par contre moyenne assis faible que de nombre d'épillet stériles de 5.99.

L'ensemble des variétés étudiées présentent des taux de fertilité très variables, cette variabilité est très hautement significative chez la variété Bousselam. Des études antérieures ont démontré l'effet variétal hautement significatif sur le taux de fertilité de l'épi. Cherfia (2010), a enregistré des taux moyens variant de 5 à 76,63 % et Oudjani (2009) a trouvé sous des conditions semi contrôlées des valeurs allant de 29 à 86 % avec une moyenne générale des 29 génotypes étudiées de 48 %.

4.4.8. Nombre de talles par plante

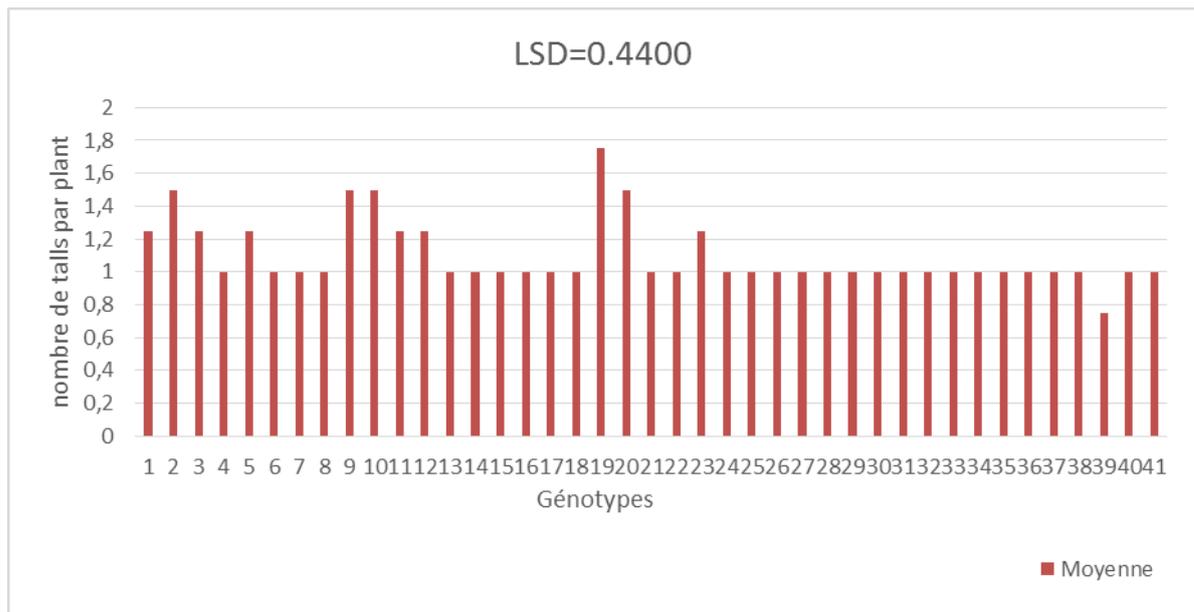


Figure 4.13 : nombre de talles par plante de génotypes étudiés.

L’ANOVA a révélé un effet hautement significatif ( $P < 0.023$ ) du facteur génotype sur le nombre de talles, (Annexe 7.Tab8). Le test LSD présentés par les variétés étudiées varient entre 1.75 à 0.75 talles par plant.

Le nombre de talles par plant le plus élevée 1.75 talle par plant chez le Kebir par contre la variété Gloire de Montgolfier à 0.75talle par plant. Les autres variétés présentent des moyennes variables.

Les résultats recueillis pour le tallage herbacé montrent que la majorité des génotypes ont un tallage faible.

Ceci s’oppose avec les résultats de Zaghouane- Boufenar et Zaghouane (2006) .Cette différence est marquée, parce que notre matériel végétal a été mis dans une serre en plastique et les grains sont semés dans des pots avec un volume de sol réduit ce qui aura limité l’expression du tallage.

### 1. Conclusion :

La production de blé est fortement limitée par plusieurs contraintes biotique ( insectes, bactéries etc..) abiotique ( la chaleur, la salinité...).

L'aspect d'une plante peut être modifié par ces conditions qui peuvent rendre l'identification d'une variété malaisée.

La lutte contre ces contraintes doit être gérée en prenant plus en compte les techniques des biotechnologies végétales ; l'introduction et l'utilisation de ces derniers sont étroitement liées à l'évolution de l'amélioration des plantes en tant que science ; plus précisément la création des nouvelles variétés résistantes aux différents stress biotiques et abiotiques.

Au-delà de la sélection classique, différentes techniques biotechnologiques comme les marqueurs moléculaires peuvent être utilisées pour améliorer la tolérance ou la résistance aux stress biotiques et abiotiques dans le but d'augmenter, de stabiliser la productivité des plantes cultivées.

De plus le développement des marqueurs moléculaires et les différentes techniques (RFLP, AFLP, RAPD, Microsatellites) offrent la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection. L'amélioration du blé dur dans divers domaines est actuellement longue et continue d'évoluer. En effet, le développement de variétés à grande production avec une qualité adéquate du grain reste le principal objectif du sélectionneur.

Ce travail illustre l'intérêt de l'utilisation des marqueurs microsatellites pour la caractérisation morphologique et moléculaire de quelques variétés de blé dur ( triticum durum. Dsfr).

La hauteur de tige, la longueur de l'épi, le nombre de nœuds.....ect, ou caractères d'adaptation révèle la présence d'une variabilité intra spécifique élevée .

Enfin, l'établissement des fiches descriptives, la connaissance de la phénologie et des paramètres de production et d'adaptation sont des mécanismes primordiaux qui constituent le point de départ de tout programme pour la création d'une nouvelle variabilité. Elles restent un facteur puissant pour améliorer le rendement, préserver les ressources génétiques contre l'érosion et l'enrichir par les croisements.

## Conclusion et perspectives

---

Au terme de cette étude, il paraît clair que la diversité génétique et phénotypique du blé dur constitue une étape primordiale pour la sélection dans le programme d'amélioration de blé dur. D'ailleurs, tous les outils présentés ici sont complémentaires les uns des autres et leur combinaison optimale avec l'analyse des marqueurs moléculaires reste le moyen le plus sûr d'évaluer avec justesse la diversité.

### 2. Perspectives

Aujourd'hui, avec le marquage moléculaire, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour le sélectionneur. La disponibilité de marqueurs moléculaires permettant de suivre les gènes influençant les performances, a ouvert la voie à une amélioration des évaluations. Ainsi, la sélection assistée par marqueurs (SAM) n'est possible que si les marqueurs moléculaires sont facilement utilisables et informatifs. Pour cela les marqueurs moléculaires deviennent un outil essentiel dans les programmes de sélection.

L'objectif du sélectionneur est de rassembler dans une plante d'une espèce donnée, le maximum de caractères favorables -propriétés agronomiques et qualité du produit destiné à l'alimentation ou à l'agro-industrie. Pour cela, il faut connaître le ou les gènes qui gouvernent chaque caractère, puis le transmettre par croisement aux variétés d'intérêt agronomique. La génétique d'association permet d'accéder à ces caractères complexes sans avoir besoin de séquencer tous les gènes impliqués.

Dans le cadre d'un travail futur, il serait souhaitable :

- Améliorer le potentiel agronomique et la qualité d'usage du blé dur.
- Sélectionner des plantes résistantes aux maladies.
- Optimiser et adapter les pratiques culturales.
- Prendre en compte les contraintes pédo-climatiques.
- Évaluer la souplesse des procédés de transformation.
- Prendre en compte les évolutions.

- Aguiriano E., Ruiz M., Fité R., Carrillo J. M. (2006).** Analysis of genetic variability in a sample of the durum wheat (*Triticum durum* Desf.) Spanish collection based on gliadin markers. *Gen Res and Crop Evolution*, 53(8): 1543-1552
- Akbari M., Wenzl P., Caig Carling J., Xia L., Yang S., Uszynski G., Mohler V., Lehmsiek A., Kuchel H., Hayden M. J., Howes N., Sharp P., Vaughan P., Rathmell B., Huttner E., Killian A. (2006).** Diversity arrays Technology (DART) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical and Applied Genetics* 133 : 1409-1420.
- Al Khanjari S., Filatenko A. A., Hammer K., Buerkert A. (2008).** Morphological spike diversity of Omani wheat. *Gen Res and Crop Evolution*, 55(8), 1185-1195.
- Amallah L., Hassikou R., Rhrib K., Gaboun, F., Ennadir J., Bouazza F., Taghouti, M. (2016).** Analyse de la diversité génétique d'une collection de blé dur par les marqueurs agro-morphologiques et biochimiques. *J. Mater. Env. Sci.*, 7(7) : 2435-2444.
- Annichiarico P., Bellah F., Chiari T. (2006).** Repeatable genotype x location interaction and its exploitation by conventional GIS-based cultivar recommendation for durum wheat in Algeria. *Europ. J. Agronomy*. 24:70 -81.
- Anonyme, 2007.** La gestion des principales maladies foliaires des blés. Syngenta. Notice technique 5, 4p.
- Anonyme ; 2008.** Maladies et insectes des céréales en Algérie. Syngenta. Guide de champ.
- Aouali S. et Douici-khalfi A.,** Recueil des principales maladies fongiques des céréales en Algérie : symptôme. Développement et moyens de lutte ; ITGC. El Harrach, Alger. 56p.
- Anonyme a, 2014.** Problématique de la fusariose des céréales en Algérie Identification des espèces et leurs répartitions dans les zones potentiellement céréalières. Bulletin d'informations phytosanitaires N° 33. Infos phyto. INPV. 3p.
- APG III. 2009** An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants : APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161 : 105-121.
- Attab S. et Brinis L. 2012 :** Etude comparative de la réponse physiologique de 2 variétés de blé dur à l'infection par *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici* agent causal de l'oïdium. *Rev. Sci. Technol.*, Synthèse 25 : 83-85.
- Beckman J. S., Soller M. (1986).** Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35 : 111-124.

- Belaid Dj., 1996.** Aspects de la céréaliculture Algérienne. Offices de publications universitaires. 203p.
- Benbelkacem A. et Zeghouane O. 2012:** Current state and trends of wheat production in Algeria. *Presentation at wheat for food security in Africa conference*, Oct 9, 2012, Addis Ababa, Ethiopia: 15 p.
- Benbelkacem, A. (2013).** Rapport national des activités du projet : INRA-ICARDA, 2012/2013 : 45p.
- Bhatramakki D., Dolan M., Hanafey M., Wineland R., Vaske D., Register J. C., Tingey S. V., Radalski A. (2002).** Insertion-deletion polymorphisms in 3' regions of maize genes occur frequently and can be used as highly informative genetic markers. *Plant Molecular Biology* 48 : 539-547.
- Blair M. W., Panaug O., McCouch S. R. (1998).** Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) *Theoretical and applied Genetics* 98 : 780-792.
- Bonjean A. et Picard E., 1990.** Les céréales à paille. Origine, Histoire, Economie et sélection. Ed. Software ITM. 201p.
- Bostein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980).** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32: 314-331.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980).** Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32 : 314-331.
- Boufenar-zaghouane F. et Zaghaoune O., 2006.** Guide des principales variétés de céréales à paille en Algérie (blé dur, blé tendre, l'orge et avoine). ITGC, ICARDA., Alger .154p.
- Boyedieu J. ,1980.** Les cultures céréalières. Ed hachette. France.
- Brunel, S., Teulat-Merah, B., Wagne, M.H., Huguet, T., Prospero, J.M., et Durr, C., (2009).** Using a model-based framework for analysing genetic diversity during germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula*. *Annals of Botany* 103, 1103-1117.
- Chargué, V., Fahima, T., Dahan, A., Sun, G.L., Korol, A.B., Ronin, Y.I., Grama, A., Röder, M.S., Nevo, E., (1999).** Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Y-15 gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. *Genome* 42, 1050-1056.

## Références bibliographique

---

- Chao, S., Sharp, P.J., Worland, A.J., Warham, E.J., Koebner, R.M.D., Gale, M.D., (1989).** RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78:495-504.
- Cherfia R. 2010 :** Etude de la variabilité morpho-physiologique et moléculaire d'une collection de blé dur algérien (*T.durum* Desf.) Mémoire de magister, université de Constantine : 77 p.
- Clement-Grandcourt M. et Prats J., 1971.** Les céréales collections d'enseignement agricole 2<sup>ème</sup> Ed, Ballier France.351p.
- Colwyn, M.Thomas., Vos, Pleter., Zabeau, Marc., Jones, David.A., Norcott, Karen.A., Chadwick, Brian.P., et Jones, Jonathan .D.J, (1995).** identification of amplified fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The plant Journal* (1995.8 (5). 785-794.
- Couvreur F., 1981 -** La culture du blé se raisonne .perspectives agricoles 91,28-32.
- Cronquist, A. (1981)** An Integrated System of Classification of Flowering Plants. ColubiaUniversityPress, New York, 248-250.
- Daguenet, G., 1990.** Les dégâts de certaines maladies Cultivar. 226 ; 50-52.
- David F et Yrlootr T <<An Isothermal amplification Methodes>>.** Comtes-rendu de l'Académie des Sciences.2002 ; 321 : 909-914.
- Demarly Y. (1977),** Génétique et Amélioration des plants. Masson. Paris. 287p.
- Demarly Y. et Sibi M., 1989.** Amélioration des plantes et biotechnologies. AUPELF. Ed. John Libbeyeurotext, 152p.
- Demarly Y., 1990.** Réflexion sur le rapport entre culture in vitro et amélioration des plantes. Cinquantenaire de la culture in vitro, Versailles (France). 24-25 oct. 1989. Ed. INRA Paris 1990 (Les colloques de l'INRA n°51). végétales.  
*2ème ed. INRA, Paris, 200p.*
- De Moraes, P.L.R., Nehme, C.J., Alves, M.C., Teresa, M., Derbyshire, M.T., Cavaleiro, A.J., (2007).** Chemical composition of flavonoids and styrylpyrones and the genetic variability of isozymes in natural polpulations of *Cryptocaryamandioccana* Meisner (Lauraceae). *Biochemical systematic s and Ecology* 35: 233-244.
- Delseny, M., Caubier, P., Hull, G., Saez-Vasquez, J., Gallois, P., Raynal, M., Cooke, R., Grellet, F., (1993).** Nuclear genes expressed during seed dessication : relationship with response to stress. In: *Stress inducrd gene expression*, Harwood Academic Reading (UK).

**David F et Urlotte T** « An Isothermal Amplification Methodes ». comptes-rendu de l'Académie des Sciences.2002 ; 321 :909-914.

**De Vienne, D., (1998).** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies.

**Eliard JI.,1979.** Manuel d'agriculture générale. Bases de la production végétale. Ed. J.B. Bailliére. 344p.

**Elyse P et Aain H.** << LA PCR en temps réel : principe et application >>Review in Biology and Biotechnology (Canada). 2002 ; 2 : 2-11.

**Erroux J.et Laumon P., 1961.**mémoire de a société d'histoire naturelle de l'Afrique du nord,5,95p.

**Ezzahiri B., 2001.** Les maladies du blé identification, facteurs de développement et méthodes de lutte. Transfert de technologie en Agriculture. Bulletin mensuel d'information et de liasion du PNTTA 77 ,4p.

**F l'agriculture :Perspectives de récolte et situation alimentaire 2016.**In, FAO, La carte FAO, 6p. [\*\*F.A.O.\(2016\).\*\*Organisation des nations unies pour l'alimentation et.fao .org \(consultée Mars 2016\).](http://www.A.O. (2015). Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture : Perspectives de récolte et situation alimentaire 2015. In, FAO, La carte FAO, 16p. http://www.fao.org /giewx/english/listerv.htm(consultée mars 2015).</a></p></div><div data-bbox=)

**Flaque , M., Santoni, S., (2004).** Les marqueurs moléculaires, la génomique en biologie végétale, J.F. Morot-Gaudry et J.F. Briat (Eds), INRA Editions, science update,INRA, paris, pp 349-375.

**Febrero A.; Brot J.; Brown R.H. et Araus J.L., 1990 -** The role of durum wheat ear as photosynthetic organ during grain filling. In: advanced trends in photosynthetic, Mallorca, Spain (unpublished).

**Fehr W.R. (1987).** Principles of culticardevelopment. Vol. I. Theory technique, MacMillan, New York, 672p.

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

**Feuillet, C., Travella, S., Stein. N.,(2003).** Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 form the hexaploid wheat (*Triticumaestivum* L.) genome. Proc Natl Acad Sci. USA, 100: 15253-15258.

## Références bibliographique

---

- Gallais A. (1990).** Théorie de la sélection en amélioration des plants, Masson, Paris. 588p.
- Gallais.A (2011) :** « méthodes de création de variétés en Amélioration des plantes ».Quae Edition.p280.
- Gallais . A (2013) :** Evolution des outils pour l'amélioration des plantes. De la Domestication a la Transgénèse. Quae Edition. P184.
- Gallais, A. (2015).**Comprendre l'alimentation des plantes. Enjeux, méthodes, objectifs et critères de selection.EdsQuae, 240p.
- Gate P., Bouthier A., Casablanca H. et Deleens E., 1992 -** Caractères physiologiques décrivant la tolérance à la sécheresse des blés cultivés en France. Interprétation des corrélations entre le rendement et la composition isotopique du carbone des grains. In : Tolérance à la sécheresse des céréales en zone méditerranéenne. Diversité génétique et amélioration variétale. Montpellier (France) INRA. (Les colloques n°64).
- Gate P., 1995.** Ecophysiologie du blé. Ed. Lavoisier, Paris.429p.
- Gate P., 1995.** Ecophysiologie du blé de plante à la culture. Es Lavoisier, 417 p.
- Gate Ph. Et Giban M., 2003.** Stade du blé . Edition ITCF, Paris 68p
- Giancola, S., Mckhann, H., Berard, A., Camilleri, C., Libeau P., Roux F., Reboud , X., Gut I.G, Brunel D. (2006) .** Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay. Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. *TheorAppl Genet* 112 :1115-1124.
- Gooding, M. J. (2009).** The wheat crop.In: Wheat chemistry and technology, Khan, K., Shewry P.R, eds. St.Paul, MN: AACCC International, 19-38.
- Grignac P., 1978.** Le blé dur : techniques agricoles. Tome 1,6-10.
- .Hervieu, B., Capone,R.,Abis, S.(2006).**The challenge posed by the cereals sector in the Mediterranean. Ciheam analytical note, (9): 14p.
- Housset K., 2002.** Problèmes liés à l'information diffusée et au débat social autour des organismes génétiquement modifiés (OGM). A : / Inserm. Fr /.Ethique /travaux, nsf.
- Huang, J., S.M. Sun., (2000).**Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomea* series Batatas ( Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat ( ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *TheorAppl Genet* 100 : 1050-1060.

## Références bibliographique

---

- Kantety, R.V., X.P. Zeng, J.L. Bennetzen et B.E. zehr. (1995).** Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zeamays L.*) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular breeding* 1 : 365-373.
- Kellou Ryn (2008).** Analyse du marché algérien du blé dur et les opportunités d'exportation pour les céréales françaises dans le cadre du pôle de compétitivité Quali-Méditerranée. (Master of Science, IAMM, 2008, Série Thèses & Masters n°93).
- Kochert G. (1994).** RFLP technology. IN : Phillips R. L. Vasil I. K. (Ed). *DNA-based Markers in Plants*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. P. 8-38.
- Lamari L., Bernier CC. Et smith RB., 1991.** Wheat genotypes that develop both tan Necrosis and extensive chlorosis in response to isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* Plant diseases. Vol 75. 121-122.
- Lapeysonnie L.** Cerebro-Spinal Meningitis in Africa. *Bulletin of the world Health organization*. 1963; 28; Supp 1:1-114.
- Lefort-Buson, M., Rodolphe, F., Charcosset, A., (1990).** De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. A la recherche des locus importants. *Biofutur* :30-37.
- Le poivre P., 2003.** *Phytopathologie*. Ed. De boeck. Bruxelles. 427 p.
- Mac Key J. ; (2005).** Wheat : Its concept, evolution, and taxonomy. In : *Conxita*.
- Marchenay, P. (1987).** À la recherche des variétés locales de plantes cultivées : Guide méthodologique. Paris, Page Paca, 125 p.
- Masale MJ., 1980.** L'élaboration de nombre d'épi chez le blé d'hiver. Influences de différentes caractéristiques de la structure du peuplement sur l'utilisation de l'azote et de la lumière. Thèse doctorat. Ing7 INA, Paris Grignon, 274 p.
- McCouch S. R., Chen X. L., Panaud O., Temnykh S., Xu Y. B., Cho Y. G., Huang N., Ishii T., Blair M. (1997).** Microsatellite marker development, mapping and application in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35 :89-99.
- Mekhlouf A. et Bouzerzour H., 2000.** Comparaison de l'efficacité de la sélection précoce directe et indirecte pour améliorer le rendement en grain chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.), en zone semi- arides d'altitude. *Recherche agronomique*.
- Mekhlouf A., Dehbi F., Hannachi A. et Harbi M. 2012 :** Réponses du blé dur (*Triticum durum* Desf.) aux basses températures en relation avec la capacité de production. *Revue Agriculture* N° 3 : 13-23.

## Références bibliographique

---

- Mekli M. , A.P.K Dahmane et Garoui A.,** « effet de la variation saisonnière des facteurs climatiques sur les composantes du rendement des céréales ( blé dur et l'orge)» INAT. Vol. 10, n°1-juin 1995, pp105-114
- Michel L., 2002.** Maladies des céréales et de la luzerne. Diagnostic, dépistage et prévention. Ministère de l'agriculture, des pêches et de l'alimentation. Québec. 25p.
- Monneveux, D., and Depigny6THIS., (1995).** Génétique et Amélioration des Plantes, ENSA-INRA, Montpellier, France. Quel avenir pour l'amélioration des plantes. Ed. AUPELF-UREF.JohnLibbeyEurotext. Paris.pp : 149-163.
- Mosiniak M., Prat R., et Roland J.C., (2006).** Biologie et Multimédia. Université Pierre et Marie Curie : [http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/l\\_ble/l\\_1\\_plant/plante.htm](http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/l_ble/l_1_plant/plante.htm)
- Moule C., 1980.** Les céréales .Ed. la maison rustique . paris. 318p.
- Muthamilarasan M., Prasad M., (2014) :** An overview of wheatgenomesequencinganditsimplications for cropimprovement, 30 Jul 2014 (National Institute of Plant GenomeResearchIndia)''.
- Nelson, J.C., M. E. Sorrells, A. E. Van Deyze, Y. H. Lu, M. Bernard, P. Leroy, J.D.Faris, and J.A.Anderson., (1995).** Molecularmapping of wheat( Majorgenes and rearrangements in homoeologous groups 4,5, and 7. Genetics 141, 721-731
- Oudjani W. 2009:** Diversité de 25 génotypes de blé dur etude des caractères de production et d'adaptation. Mémoire de magistère, Université de Constantine : 112 p.
- Pearse P., 1999.** L'ergot des céréales et des graminées commissioncanadienne des grains.
- Plucknett D.L., Smith N.J.H., Williams J.T &MurthiAnishetty N. (1990).** Banques de Gènes et alimentation mondiale, INRA-Economica. Paris. 288p.
- Prat. D, Faivre Rampant. A, prado (2006) :** « Analyse du Génome et Gestion des ressources génétique forestières » . INRA Edition. P456.
- Prescott JM., Brunett PA., Saari EE., Ransom J., Bowman J W., Milliano do., Singh RR. Et Bekele G., 1987.** Maladies at ravagours du blé : Guide d'identification au champ. CIMMYT. Mexico,D.F., Mexico. 135p.
- Prevost Ph.,1976.** Génétique. Ed. lavoisier. Paris,299p.
- Rapilly, E., Lemaire, J.M., Cassini.1971.** Les maladies des céréales : Les rouilles. INRA. I.T.C.F, 30-54.
- Richards A.H. (1986).** Plant systems, Allen &Unwin. Lndres. 529 p.

- Rolf D. Schmid.**(2005), Biotechnologie et de génie génétique, France ., Ed par IME.25110 Baume-les-dames. N°10809.
- RUEL T., 2006.** Document sur la culture du blé, édition Educagri.
- Sanchez A. C., Brar D. S., Huang N., Li Z., Khush G. S. (2000).** Sequencetagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice. *Crop Science* 40 : 792-797.
- Sayoud, R., Ezzahiri, B., & Bouznad, Z., 1999.** Les maladies des céréales et des légumineuses alimentaires au Maghreb. Projet maghrébin sur la surveillance des maladies et le développement de Germoplasme résistant des céréales et des légumineuses alimentaires. PNUD RAB/91/007. Maroc -Algérie- Tunisie. 64pages.
- Schmid KJ, Sorensen TR ,Stracke R, Torjek O, Altmann T, Mitchell-Olds T, Weisshaar B. (2003).** Large-scale identification and analysis of genome-wide single-nucleotide polymorphisms for mapping in Arabidopsis thaliana. *Genome Res* 13 :1250-125.
- Serre J.L.,(2006).** Génétique des populations. Edition Dunos, Paris. P56.
- Shan X., Blake T. K., Talbert L. E. (1999).** Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theoretical and applied Genetics* 98 :1072-1078.
- Shan, X., T.K. Blake, and L. E. Talbert., (1999)** conversion of AFLP markers to sequence specific PCR markers in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1078.
- Simon H. , Codaccion P. et Lecoeur X., 1989.** Produire des céréales à paille. Agriculture d'aujourd'hui. Ed. Lavoisier. Paris ,346p.
- Slama A., Ben Salem M., Zid E. (2005).** Les céréales en Tunisie : Production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. *Science et changements planétaires/Sécheresse*, 16(3) :225-229.
- Soltner P., 2005.** Les bases de la production végétales : La plante et son amélioration 4<sup>ème</sup>Ed. Collection et techniques Agricoles. 248p.
- Somers D. J., Kirkpatrick R., Moniwa M., Walsh A. (2003).** Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome* 49 : 431-437.

- Talhinahs P. Nevers-Martins J. Leitaó J. (2003).** AFALP. ISSR and markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breeding* Volume 122 Issue PAGE 507-510.
- Tanksley S. D., Young N. D., Paterson A. H., Bounie M. (1989).** RFLP mapping in plant breeding : New tools for an old science. *Biotechnology* 7 : 257-264.
- Vasil I. K., 1994.** Molecular improvement of cereals. *Plant Molecular Biology* 25, 925-937.
- Vedele, Françoise., Et Loudet, Olivier., (2001).** Ecole Thématique Biologie végétale- 2001.p6.
- Vos P., Hogers., Bleeker. M., Reijnders M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. (1995).** AFLP : A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 : 4407-4414.
- Vroh Bi., Du jardin, Patrick., Margeai, Guy., Baudion, Jean pierre., (1996).** Optimisation et application de la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) dans un programme de sélection récurrente chez le cotonnier (*Gossypium* spp). *Biotechnologie. Agron. Soc. Environ.* 1997 1 (2).142-150.
- Welsh J., McClelland M. (1990).** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 : 7213-7218.
- Welsh J., M. McClelland ., (1991)** *Nucleic Acids Res.* pp. 5275-5279.
- Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18 : 6531-6535.
- Williams, John G.K., Kubelik, Anne. R., Livak, Kenneth ,J. Rafalski, J. Antoni., et Tingey, Scott. V., (1990).** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Oxford Journals. Life sciences, Nucleic Acids Research,* volume 18, Issue 22 Pp.6531-6535.
- Yadav, S. S., Redden, R. J.L., Lotze-Campen, H., Hall, A. E. (2011).** Crop adaptation to climate change, eds. Oxford, Blackwell, 595 p.
- Yang, W. A.C de Oliveira I., Godwin, K., Schertz, et J.L. Bennetzen., (1996).** Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity : variability in Chinese sorghums. *Cropsci* 36 :1669-1676.
- Zaaboubi, S. (2007)** – Effet comparatifs de deux outils aratoires (Disque- Dents) et de différents précédents culturaux sur les propriétés physiques d'un sol cultivé en céréales dans la région de Timgad. Mémoire magister. Université de Batna. Pp.78.

## Références bibliographique

---

**Zahour, 1992.** Eléments d'amélioration génétique des plantes. Ed. Actes. 223p.

**Zahri S., Farih A., Badoc A. et Douria A., 2014.** Statut des principales maladies, cryptogamiques foliaires du blé au Maroc en 2013. Journal of Applied Biosciences 77, 6543-6549.

**Zeven, A. C. (1998).** Landraces: A review of definitions and classification .Euphytica 104 (2): 127-139.

## Glossaire

**Acide désoxyribonucléique ou ADN (DNA en anglais)** : dimère fait de deux brins hélicoïdaux composés de nucléotides . Support chimique de l'hérédité.

**Amorce (angl.primér)** : se dit de séquence courtes soit naturellement présentes au cours de la replication de l'ADN, soit sous forme d'oligonucléotides artificiellement synthétisés et qui servent à amorcer la synthèse d'une copie complémentaire d'ADN . Ces amorces ont une séquences complémentaires de celle des deux extrémités de la séquence d'intérêt au cours de la PCR.

**Chromosome** : structure nucléaire visible à certains moments du cycle cellulaire (mitose) et contenant le message de l'hérédité. Les chromosomes sont formés par deux batonnets identiques, les chromatides réunis par un centromère.

**Dominant** : par opposition à récessif , se dit d'un allèle ou d'une mutation qui code pour un phénotype qui s'exprime chez les hétérozygotes.

**Diploïde** : jeu de chromosomes en double exemplaire (pour les chromosomes autosomaux) et où figurent deux chromosomes sexuels, par opposition à haploïde.

**Gène** : ensemble de séquence nucléotidiques, mal limité, contenant toute l'information nécessaire à la transcription d'un ARNm. Cet ensemble comprend essentiellement dit et la porties, située en amont, en 5', dite régulatrice.Un gène code soit pour une séquence d'acides aminés soit pour un ARN.

**Haploïde** : une cellule haploïde est une cellule, comme les gamètes, dont les chromosomes n'existent pas par paire.

**Locus** : locus génétique ou position spécifique d'une séquence sur un chromosome.

**Morgan** : unité de mesure en génétique. Une distance de 1Cm entre deux locus signifie que le risque de survenue d'une recombinaison entre ces deux locus, lors de la transmission du chromosome du parent à l'enfant, est très faible de l'ordre de 1% .Le M a un équivalent physique, le nombre de paire de base, mais ce n'est qu'un équivalent, pas une identité.

**PCR ou polymérase chaine réaction** : technique d'amplification d'une séquence nucléotidique basée sur le principe de la réplication de l'ADN, cette technique utilise un appareil l'on qualifie également ainsi.

**Satellite** : mini ou microsattellites, polymorphisme de répétition le plus fréquent, ce sont des séquences répétitives en tandem.

**Séquence** : une séquence nucléotidique, c'est un fragment d'ADN ou ARN, une séquence d'acides aminés c'est un fragment peptidique.

**Ségrégation** : transmission. Exemple, on peut suivre la ségrégation d'un locus morbide au sein d'une famille atteinte.

**Southern** : P. Southern est un scientifique qui a eu le premier l'idée de faire migrer l'ADN après coupure, de transférer les fragments sur une membrane, et de les hybrider avec une sonde radioactive pour les identifier. Qualifie la technique correspondante.

**Autogames** : c'est une fécondation forcée exclusive d'individu par lui-même dans la nature.

**Homozygotes** : individu qui possède un même gène, le même allèle sur les deux chromosomes homologues de la paire.

## Annexe 1 : Equipement et produits de laboratoire

Verrerie et Petit Matériel	Appareil	Solution et produit
-Bicher	-Bain marie	-Eau distillée stérilisée
-Boite pétri	-Centrifugeuse	-CTAB
-Tube Eppandof	-Congélateur	-NaCl
-Eprouvette graduée.	-La hôte	-EDTA
-Entonnoir verre	-Agitateur	-TRIS
-Micropipette	- ph mètre	-Marcrapro éthanol
-Papier absorbant	-Balance	-Chloroforme
- papier filtre	-Spectrophotomètre	-Isopropanol
- Papier aluminium	-Electrophorèse	-Ethanol 70%
-Ciseau	-PCR	-Eau ultra pure
-Pince	-Etuve	-TBE
- Barreaux magnétiques.	-Autoclave	-APS
-Icones	-Appareil à glace	-Master mixe
-Plaque PCR	-Etallomage (pH) basique-	-Naoh
-Pot	Agitateur balance	-Marqueur
	- Réfrigérateur	-BET
	- Lampe ultra-violet	-Acrylamide
		-Alcool

## Annexe 2 : Mode de préparation des solutions

### 1M Tris-Hcl (Ph=8)

Pour 100 ml	
-Tris base	12.114g
L'eau distillée	Compléter par l'eau distillé jusqu'à 100 ml

-Ajuster le pH avec le HCl jusqu'à pH=8

### 5M Nacl

Pour 250 ml	
-Nacl	73.05g
L'eau distillée	Compléter par l'eau distillé jusqu'à 250 ml

### 0.5M EDTA (Ph=8)

Pour 100 ml	
- EDTA	18.6g
L'eau distillée	Compléter par l'eau distillé jusqu'à 100ml

-Ajuster le PH avec le NaOH jusqu'à pH=8

### CTAB

Pour 100 ml	
-EDTA	4ml
-Nacl	28ml
-Tris llée	10ml
-CTAB	2g
L'eau distillée	Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100 ml

### TBE x5

Pour 1L	
-Acide borique	27.5g
-Tris base	54g

<b>-EDTA (pH=8)</b>	20ml
<b>L'eau distillée</b>	Compléter par l'eau distillée jusqu'à 1L

### APS 10%

<b>-Ammonium persulfate</b>	1g
<b>-L'eau distillée</b>	10ml

### BET

Pour 1l	
<b>-Bromure d'éthidium(10lg/ml)</b>	100 µL
<b>-L'eau distillée</b>	1l

### NAOH

<b>-NAOH</b>	40g
<b>-L'eau distillée</b>	1l

### Annexes 3: préparation de gel

#### □ Gel d'Agarose 1%

Pour grande cuve :	
<b>Agarose</b>	3g
<b>TBE x5</b>	30ml
<b>L'eau distillée</b>	Compléter par l'eau distillée jusqu'à 300 ml

## □ Gel d'acrylamide 40%

acrylamide 40%	40ml
<b>TBE x5</b>	20ml
<b>APS</b>	700µl
<b>TEMAD</b>	40µl
<b>L'eau distillée</b>	Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100 ml

### **Annexe 4 : Protocol de préparation de gel d'agarose**

L'électrophorèse d'ADN est constituée de cinq étapes importantes :

#### **1) Préparation du gel d'agarose**

Le gel est constitué de 3g d'agarose et 30ml d'un tampon TBE (5×) puis compléter jusqu'à un 300 ml d'eau distillée.

Porter à ébullition la solution aux micro-ondes à 1000W jusqu'à ce que celle-ci soit transparente et sans grumeaux (2 à 3 minutes), refroidir le gel.

Pour cela mettre en place le moule et le peigne puis y couler l'agarose fondu pour obtenir un gel d'environ 5mm d'épaisseur (le moule est en plastique transparent qui possède généralement des côtés en caoutchouc détachables pour démouler le gel. Il est fourni avec un peigne qui permet de constituer les puits du gel). Laisser ensuite refroidir jusqu'à solidification. Laisser le peigne en place jusqu'au début du dépôt ADN.

Au moment du dépôt ADN, enlever le peigne et placer le gel dans la cuve à électrophorèse avec son support en veillant à ce que les puits du gel soient orientés du côté de l'électrode négative de la cuve (borne noire).

### 2) Dépôt de l'ADN dans les puits

Remplir la cuve de tampon TBE1x jusqu'à recouvrir légèrement le gel. Les fragments d'ADN sont mélangés avec du bleu d'agarose (10  $\mu$ L d'ADN +5  $\mu$ L de bleu d'agarose) . Le bleu d'agarose permet d'alourdir l'ADN pour qu'il tombe bien au fond des puits lors des dépôts et de suivre l'avancée de la migration car un de ses constituants (le bleu) marque le front de migration des plus petits morceaux d'ADN.

Déposer à l'aide d'une micropipette 7  $\mu$ L d'ADN au fond de chaque puits (le volume peut varier selon le nombre de puits, les kits et l'épaisseur des gels). Les échantillons sont également déposés ainsi qu'un marqueur de taille avec des fragments d'ADN de taille connue.

### 3) Migration

Fermer le couvercle de la cuve. Brancher la cuve au générateur et le générateur à la prise de courant. Préférer un réglage de la tension à 80V.

En utilisant un voltage plus élevé, la séparation des bandes lors de la révélation sera moins nette. Plus la tension est élevée et plus la migration est rapide mais elle devient moins précise. La durée de migration est proportionnelle à l'épaisseur du gel et à la quantité de tampon dans la cuve (compter entre  $\frac{3}{4}$  heure et 1h30).

### 4) Coloration

Retirer délicatement le gel de la cuve et le placer dans un récipient, rincer le gel à l'eau distillée. Recouvrir le gel de solution BET et laisser le gel dans ce bain de colorant pendant 30 minutes placer sur Agitateur balance, afin d'homogénéiser la coloration, puis décolorer le gel. Rincage le gel dans un bain d'eau ou bien à l'eau courante sous le robinet et ils seront prêts à la lecture.

### 5) Observation

Placer le gel sur une lampe UV Trans-illuminateur pour une observation par la classe entière.

## Annexe 5 : Les analyses statistiques

**Tableau 1 : La longueur de tige**

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	240.24	80.08	1.35			
variété	40	30206.13	755.15	12.75	<.001	THS	2.8
Residuelle	120	7105.48	59.21				
total	163	37551.85					

**Tableau 2 : La longueur de l'épi**

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	6,1288	2,0429	2,75			
variété	40	498,5639	12,4641	16,79	<.001	THS	5.2
Residuelle	120	89,0912	0,7424				
total	163	593,7839					

**Tableau3 : nombre des nœuds de génotypes étudiés**

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	4.9756	1.6585	3.23			
variété	40	109.0122	2.7253	5.32	<.001	THS	4.7
Residuelle	120	61.5244	0.5127				
total	163	175.5122					

**Tableau4 : Nombre de grains par épi de génotypes étudiés**

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	289.80	96.60	2.44			
variété	40	14885.56	372.14	9.40	<.001	THS	14.1
Residuelle	120	4752.20	39.60				
total	163	19927.56					

**Tableau 5 : Nombre de l'épillet total de génotypes étudiés**

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	113.590	37.863	4.42			
Variété	40	3243.587	81.090	9.46	<.001	THS	7.4
Residuelle	119	1019.585	8.568				
Total	162	4194.258					

**Tableau 6 : Nombre d'épillet stériles et fertiles par épi de génotypes étudiés**

- Epillet stérile

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	18.945	6.315	0.74			
variété	40	3399.244	84.981	9.95	<.001	THS	6.5
Residuelle	120	1024.805	8.540				
total	163	4442.994					

- Epillet fertile

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	82.27	27.42	1.79			
Variété	40	3977.80	99.45	6.50	<.001	THS	11.5
Residuelle	120	1836.73	15.31				
Total	163	5896.80					

**Tableau 7 : Nombre de talles par plante de géotypes étudiés**

Source de variance	ddl	SCE	CM	F	P	Signification	cv%
Bloc	3	0.14634	0.04878	0.49			
variété	40	6.43902	0.16098	1.63	0.023	HS	3.1
Residuelle	120	11.85366	0.09878				
total	163	18.43902					