

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE SAAD DAHLEB-BLIDA

♣Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologique♣

*Mémoire de Fin D'études Pour L'obtention du Diplôme  
De Master II en Biologie.*

*Option : GENIE BIOLOGIQUE*

*Thème:*

Etude de la variabilité génétique de quelques  
Cultivars de *Médicago sativa L.*  
Par des marqueurs moléculaires SSRs.

**Présenté par :**

♣ Mme SEMIANI Yasmina ♣

*Soutenu-le: 18/12/2012*

**Devant le Jury :**

- ♣ Président : Mer LARBI DOUKARA., (U.S.D.B).
- ♣ Promoteur : Mer MEFTLM., (U.S.D.B).
- ♣ Examineur : Mer BENYAHIA N., (U.S.D.B).
- ♣ Examinatrice : Mme CHERRALLAH A., (U.S.D.B).

Promotion 2011/2012

# Remerciements

*Je remercie Mme SAIDI F., chef d'option du master II en Genie Biologique de m'avoir accepté dans cette option.*

*J'adresse mes grands remerciements à Mer Mefti M. maitre de recherche à l'Institut National de l'Agronomie d'El-Harrach qui a accepté d'encadrer ce travail, je lui exprime ma grande considération pour ses conseils et ses orientations.*

*Je remercie Mer ABDELGUERFI A., professeur à l'Institut National d'Agronomie d'El-Harrach et Mme ABDELGUERFI M., Maitre de recherche à l'INRAA de m'avoir offert les moyens et la possibilité de réaliser mon travail dans le cadre du projet PERMED.*

*Je tiens à remercier beaucoup Mme JULIER B., pour son accueil au laboratoire à l'INRA de France et de m'avoir initié sur des logiciels pour l'analyse statistique de mon travail. Je lui exprime ma grande considération pour ses conseils et ses orientations.*

*Mes plus vifs remerciements à:*

*Monsieur LARBI DOUKARA K. enseignant à l'université de SAAD DAHLAB de BLIDA qui nous a honorés pour présider ce jury.*

*Mme CHERRALLAH A. et Mer BENYAHIA N. enseignants à l'université de SAAD DAHLAB de BLIDA d'avoir accepté d'examiner mon travail.*

*Mes remerciements s'adresse aussi à:*

- ❖ *Mer BOULBINA K., chercheur à l'INRAA d'Alger.*
- ❖ *Mes collègues du laboratoire de ressources phytogénétique, en l'occurrence Mme MAAMRI M.*

*Yasmine*

## LISTE DES FIGURES UTILISEES DANS LE TEXTE

<b>Numéros</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Dissémination de la luzerne dans le monde.	<b>10</b>
<b>02</b>	Les phases du développement de <i>Medicago sativa</i> L.	<b>11</b>
<b>03</b>	Morphologie de la Luzerne; 1: feuilles trifolié, 2: fleurs, 3: inflorescence, 4: racine latérales, 5: pivot,6: collet (Whyte <i>et al.</i> ,1953).	<b>13</b>
<b>04</b>	Racine de luzerne avec chapelet particulièrement dense de nodules. Source: MEURIOT, 2004.	<b>13</b>
<b>05</b>	Représentation de l'acide désoxyribonucléique ADN.	<b>17</b>
<b>06</b>	Situation de quatre allèles d'un gène sur une plante tétraploïde Source: (Tourte, 2002).	<b>17</b>
<b>07</b>	Principe de la PCR « Polymerase Chain Reaction ». Source: Marty, 2001.	<b>24</b>
<b>08</b>	Séquence microsatellite avec répétition du motif (CA). Source : Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie.	<b>27</b>
<b>09</b>	Un marqueur microsatellite de motif (TA) avec les régions flanquantes.Source : (Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie).	<b>27</b>

<b>10</b>	Exemple de gel acrylamide analysé sur 38 individus.	<b>32</b>
<b>11</b>	Profil d'ADN sur gel agarose de 1,2%.	<b>42</b>
<b>12</b>	Profil électrophorétique de 21 individus amplifiés par le marqueur MTIC 562.	<b>43</b>
<b>13</b>	Profil électrophorétique de 21 individus amplifiés par le marqueur FMT13.	<b>44</b>
<b>14</b>	Nombre d'allèle moyen par individus pour l'ensemble des cultivars.	<b>47</b>
<b>15</b>	Classification des cultivars en groupes.	<b>52</b>

## LISTE DES TABLEAUX UTILISEES DANS LE TEXTE

Numéros	Titre	Page
I.	Evolution des superficies des pacages et parcours sur dix ans (1998-2007) en Algérie.	05
II.	la morphologie de deux variétés de Luzerne; <i>Medicago sativa</i> et <i>Medicago fatcata</i> .	11
III.	les caractéristiques des principaux marqueurs.	28
IV.	La liste de 16 cultivars de luzerne.	31
V.	La liste des marqueurs microsatellites.	32
VI.	Composition du mix PCR.	35
VII.	Constituants des solutions de révélation.	38
VIII.	Estimation du nombre d'allèle, du nombre d'allèle moyen par individus ( $A_i$ ) et du taux d'hétérozygotie par marqueur pour l'ensemble des cultivars.	45
IX.	Origine géographique de 16 cultivars de luzerne cultivé, et l'estimation du nombre moyen d'allèles par individu ( $A_i$ ) et le la fréquence théorique d'hétérozygotie moyen ( $D$ ) pour l'ensemble des marqueurs.	46
X.	les valeurs de l'indice de Fixation «Fis» par cultivars et par marqueur moléculaire.	49

<b>XI.</b>	les valeurs de Fst global par marqueur pour l'ensemble de cultivars.	<b>50</b>
<b>XII.</b>	Valeurs de Fst par paires de cultivars pour l'ensemble de marqueurs.	<b>51</b>

## LISTE DES ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

<i>ABRIVIATION</i>	<i>SIGNIFICATION</i>
<b>A</b>	Nombre d'allèle par marqueur.
<b>Ai</b>	Le nombre d'allèle moyen par individus.
<b>ADN</b>	Acide Désoxyribonucléique
<b>AFLP</b>	Amplified Fragment Length Polymorphism
<b>APS</b>	Persulfate d'ammonium
<b>CBBT</b>	Centre de Biotechnologie de Borj Cedria de Tunisie.
<b>D</b>	La fréquence théorique d'hétérozygotie moyen.
<b>Dntp</b>	Désoxyribonucléotides Triphosphate.
<b>dATP</b>	Désoxyribose adénine triphosphate.
<b>dTTP</b>	Désoxyribose thymine triphosphate.
<b>dGTP</b>	Désoxyribose guanine triphosphate.
<b>dCTP</b>	Désoxyribose cytosine triphosphate.
<b>EDTA</b>	Ethylène Dinitrillo Tetra Acétique acide.
<b>FIS</b>	Le paramètre de Wright, dénommé aussi indice de fixation et appelé auparavant coefficient de consanguinité.
<b>Fst</b>	Indice de fixation
<b>GL</b>	Groupe De Liaison
<b>He</b>	Le taux d'hétérozygotie
<b>Ha</b>	Héctar
<b>Ho</b>	Observed heterozygosity
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Composition chimique de l'eau (deux molécules d'hydrogène et une molécule d'oxygène).
<b>INRA</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>ISSR</b>	Inter Simple Sequence Repeat
<b>Kb</b>	Kilobases

<b>L</b>	Left
<b>Mgcl2</b>	Chlorure de magnésium
<b>µg</b>	Microgramme
<b>Mg</b>	Milligramme
<b>Min</b>	Minute
<b>NAOH</b>	Hydroxyde de sodium
<b>Ng</b>	Nanogramme
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Pb</b>	Paires de bases
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>PM</b>	Poids Moléculaire
<b>PAGE</b>	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
<b>PM</b>	Poids Moléculaire
<b>QTL</b>	Quantitative Trait Loci
<b>Qx</b>	Quanto
<b>R</b>	Right
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SSR</b>	Single Sequence Repeat
<b>SAU</b>	surface agricole utile
<b>T°C</b>	Température en degré Celsius
<b>Taq</b>	Enzyme thermostable, Taq ; vient du nom de la bactérie d'où provient cette enzyme <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Tris Base EDTA
<b>TEMED</b>	NNN'N tétraméthyléthylènediamine
<b>UF</b>	Unité fourragère
<b>V</b>	Volte
<b>W</b>	Wate

:



## Résumé

Le bassin méditerranéen est une région potentielle pour la culture de la luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.). Toutefois, le maintien de la diversité génétique de cette espèce permet l'adaptation au changement de l'environnement, au changement climatique ou à la présence de ravageurs et de maladies.

Cette recherche vise essentiellement l'évaluation de la diversité intra-cultivars de la luzerne pérenne du bassin méditerranéen. Dans ce contexte, on a utilisé six marqueurs microsatellites et 16 Cultivars de luzerne en provenance de l'Algérie, France, Italie, Tunisie, Maroc, Australie et USA, chacune est représentée par trente (30) individus. Le nombre d'allèles et la fréquence théorique des hétérozygotes ont été calculés pour évaluer la diversité intra-cultivars.  $F_{IS}$  a été calculé pour tester si les cultivars sont à l'équilibre. La structuration des cultivars a été analysée par le calcul de l'indice  $F_{ST}$ .

Les résultats ont montré que La diversité génétique intra-cultivars était assez large chez toutes les cultivars qui apparaissent à l'équilibre. Le  $F_{ST}$  Global était significatif mais très bas (0.016). Trois (03) groupes ont été identifiés. Le premier groupe était composé, seulement, par le cultivar Gabes, le deuxième groupe était composé de trois (03) cultivars en provenance de l'Afrique du Nord, deux (02) cultivars d'origine Australiennes, un (01) cultivar d'origine Américaine et un (01) cultivar d'origine Européenne. Quant au troisième groupe, il est composé de six (06) cultivars d'origine Européennes, un (01) cultivar d'origine Marocaine et un (01) cultivar d'origine Américaine. Ceci pourrait être expliqué par les nombreux écoulements de gènes à partir des cultivars tels que les échanges de graines ou les flux de pollen. La biologie reproductrice (allogamie) et la génétique (autotétraploïde) favorisent l'entretien de la grande diversité intra-cultivars.

**Mots clés:** *Medicago sativa* L, Marqueurs microsatellites, Génotypage,  $F_{ST}$ , Diversité Génétique.

## Abstract

The Mediterranean Basin is a major region of lucerne (*Medicago sativa* L.) cultivation. However, the maintain of genetic diversity of this specie allows adaptation to environment change, climate change or the presence of pests and diseases.

This research is focussed, essentially toward the evaluation of within-cultivars diversity of Mediterranean basin lucerne. In this context, we used six microsatellites markers and 16 cultivars originated from Algeria, France, Italy, Tunisia, Morocco, Australia and the USA, each one is represented by 30 individuals. The number of alleles and expected heterozygosity were calculated to evaluate within-cultivars diversity.  $F_{IS}$  was calculated to test departure of cultivars from panmictic equilibrium. Cultivars structure was, also, analyzed by the calculation of  $F_{ST}$  index. The results showed that within-cultivars genetic diversity was large in all cultivars, and they appeared to be at panmictic equilibrium. Global  $F_{ST}$  was significant but very low (0.016). Three groups were identified, one composed by only Gabes, a second group composed by three North African cultivars, the two Australian cultivars, one American cultivar and one European cultivar and a third group with six European cultivars, one Moroccan cultivar and one American cultivar. This is could be explained by the numerous possibilities of genes flow among cultivars, such as seed exchange or pollen flux. Reproductive biology (allogamy) and genetics (autotetraploidy) favour the maintenance of large within-cultivars diversity.

**Key words:** *Medicago sativa* L, Microsatellites markers, Génotypage, Fst, Génétic Diversity.

## **INTRODUCTION**

Les différentes régions du Bassin Méditerranéen constituent un large continuum à climat méditerranéen. Cependant, d'importantes zones bioclimatiques donnent lieu à des formes de végétation très diversifiées (forêts, maquis, matorrals, prairies, pâturages, parcours, pelouses, steppes...). En général, la flore méditerranéenne présente une grande richesse, les espèces pastorales originelles sont plus de 500 (Talamucci et Chaulet, 1989).

Dans la région du Nord de l'Afrique et du Sud de l'Europe, les systèmes de productions fourragers se diversifient d'une façon remarquable.

Les cultures fourragères occupent une grande place et jouent, avec les sous-produits de la céréaliculture, un rôle important dans l'alimentation du cheptel.

Ainsi, l'Algérie pour sa situation géographique, chevauche entre deux empires floraux: l'Holarctis et le Paleotropis. Cette position lui confère une flore très diversifiée par des espèces appartenant à différents éléments géographiques (Chwaki, 2006).

La diversité génétique désigne la variation des gènes et des génotypes entre espèces (diversité interspécifique) et au sein de chaque espèce (diversité intraspécifique). Elle correspond à la totalité de l'information génétique contenue dans les gènes de tous les animaux, végétaux et micro-organismes qui habitent la terre. Au sein d'une espèce, la diversité permet l'adaptation au changement de l'environnement, du climat ou des méthodes de culture ou à la présence de ravageurs et de maladies. La variabilité génétique des populations naturelles est la condition première de leur survie à long terme, puisque elle dépend de leur capacité d'adaptation à des conditions changeantes. Elle est importante dans l'orientation ultérieure des prospections et collectes du matériel génétique et également dans le but d'accélérer le processus de son amélioration génétique.

Le maintien de la diversité génétique des plantes est une nécessité pour assurer la sécurité alimentaire.

A coté des ressources fourragères spontanées et naturelles, certaines espèces cultivées peuvent fortement répondre aux préoccupations des éleveurs en raison de leur intérêt agronomique qui est basé sur la haute valeur protéique, et les incidences favorables sur l'environnement (la pérennité et l'enrichissement du sol en azote). C'est le cas de la luzerne

pérenne. On trouve notée pour la première fois l'existence de luzernières en 1852 (Laumont, 1940).

La Luzerne (*Medicago sativa L.*) est une espèce cultivée, allogame, tétraploïde et pérenne. Elle fournit un fourrage riche en protéine, en éléments nutritifs, en matière azotée digestible et en vitamines (Janati, 1990 ; Chaïbi, 1995), elle est considérée comme étant l'une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde, avec environ 25 millions d'hectares (Maurières, 1994). En Algérie, elle occupe une superficie très réduite au niveau des cultures fourragères. Par contre, dans les régions sahariennes, elle constitue la première culture fourragère et occupe la place la plus importante (Chaabena *et al.*, 2006).

Sa structure dans le bassin méditerranéen est peu décrite ainsi que peu d'études ont été effectuées en utilisant des marqueurs microsatellites (SSRs) pour évaluer le niveau de variation entre des espèces de *Medicago*. Diwan *et al.* (1997) ont été les premiers à développer des marqueurs microsatellites chez *Medicago*. Ils ont montré comment les microsatellites peuvent être utilisés pour décrire la diversité génétique et analyser les relations génétiques chez plusieurs génotypes de luzerne. Mengoni *et al.*, (2000) ont vérifié la puissance de SSR chloroplastique pour la détection du polymorphisme chez des populations de luzerne cultivées. Récemment, un ensemble de 107 SSRs identifié dans la base de données de *Medicago truncatula* a été cartographié chez *M. sativa* (Julier *et al.*, 2003) dont appartiennent les marqueurs SSRs qu'on a utilisés dans notre expérimentation pour l'analyse de la diversité génétique des cultivars de luzerne.

Notre travail s'attache à l'étude de la diversité et structure génétique de seize cultivars de luzerne pérenne *Medicago sativa L.* provenant de différentes origines; d'Afrique du Nord, d'Europe du sud, d'Australie et des Etats-Unis par l'utilisation de 06 marqueurs moléculaires microsatellites (SSRs).

Ce travail s'articule autour des parties suivantes :

- Mise au point bibliographique;
- Matériel et Méthodes où figure l'ensemble des approches et des méthodes employées;
- Résultats et discussion où seront présentés et discutés les résultats obtenus durant la réalisation de ce travail ;
- Conclusion générale.

## II. MATERIEL ET METHODES

### II.1. MATERIEL BIOLOGIQUE

#### II.1.1. MATERIEL VEGETAL

Cette étude a porté sur l'analyse de l'ADN de 16 variétés de luzerne cultivée (*Medicago sativa L.*) à raison de 30 individus par cultivars, à l'aide de six marqueurs moléculaires microsatellites SSRs. Ces cultivars proviennent de différents pays (Algérie, France, Italie, Maroc, Tunisie, Etats-Unis). L'origine des différents cultivars est résumé dans le Tableau IV.

**Tableau IV:** Liste de 16 cultivars de luzerne.

Code	Cultivars	Origine	Groupe
1	Ecotipo siciliano	Italie	Sud de l'Europe
2	Prosementi	Italie	Sud de l'Europe
3	ABT805	USA	Américain
4	Ameristand	USA	Américain
5	Mamuntanas	Italie	Sud de l'Europe
6	Tamantit	Algérie	Afrique du Nord
7	Sardi10	Australie	Australien
8	Siriver	Australie	Australien
9	African	Maroc	Afrique du Nord
10	Gabes	Tunis	Afrique du Nord
11	Magali	France	Sud de l'Europe
12	Melissa	France	Sud de l'Europe
13	Coussouls	France	Sud de l'Europe
14	Rich2	Maroc	Afrique du Nord
15	Erfoud	Maroc	Afrique du Nord
16	Demnat203	Maroc	Afrique du Nord

#### II.1.2. LES MARQUEURS MOLECULAIRES

Au niveau de notre étude nous avons choisi comme marqueurs moléculaire; les microsatellites (SSRs) pour le génotypage des différents cultivars. Ces marqueurs sont codominants et reproductibles, constituée de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri-, ou

tetranucléotidiques qui existent dans le génome de la plante. Leur détection est obtenue par PCR (polymerase chain reaction) du locus contenant la séquence répétée, suivie d'une électrophorèse qui permet de distinguer les allèles en fonction de leur taille.

Six paires d'amorces SSR ont été choisies selon leurs positions sur la carte génétique afin d'avoir un marqueur sur chaque chromosome (**Julier *et al.*, 2003**) (Tableau V).

Ces marqueurs provenant de la plante modèle *Medicago truncatula*, ont déjà montré un bon profil d'amplification (**Flajoulot *et al.*, 2005**). Le marqueur de taille utilisé varie entre 30 et 300pb.

On a choisi les marqueurs polymorphes qui ont un profil de dosage facile à réaliser. Pour chaque individu et chaque marqueur, le dosage d'allèles a été marqué, chaque allèle étant présent de 1 à 4 doses ou absent.

**Tableau V** : Liste des marqueurs microsatellites.

Marqueurs moléculaire	Groupe de liaison	Température (°c) d'hybridation	Motif répété	Taille des allèles chez <i>M. truncatula</i> (pb)	Taille des allèles chez <i>M. sativa</i> (pb)
FMT13	1	50	[GA]2GG[GA]9	132	108-128
MTIC451	2	55	(TC) 11	129	145-181
MTIC338	3	55	(CTT) 5	146	160-180
B14B03= MTIC562	5	55	[CA] 9	151	145-175
MTIC343	6	55	(GAA) 8	134	125-138
MTIC432	7	55	(AG) 6	163	160-185

## **II. 2. MATERIEL NON BIOLOGIQUE**

### **II.2.1 Equipements**

- Thermocycleur (applied biosystem),
- Machine à glace,
- Centrifugeuse,
- Bain marie,
- La cuve d'électrophorèse (HOEFER SQ3 PHARMACIA BIOTECH),
- Générateur (PHARMACIA BIOTECH-ELECTROPHORESIS POWER SUPPLY-EPS 3501XL),
- Réfrigérateur (SUMSUNG),
- Hote chimique,
- Balance électronique,
- Plaques en verre,
- Les pipettes (20microl, 100microl, 2ml),
- Autoclave
- Agitateur

### **II.2.2 Réactifs**

Lors de notre travail expérimental nous avons utilisé les réactifs suivants:

Acrylamide/bis-acrylamide 40%, persulfate d'ammonium, acide acétique glacial, nitrate d'argent, carbonate de sodium 1%, formaldéhyde 37%, Dimethyldichlorosilane (silane répulsif), silane attractif, TEMED (NNN'N tétraméthyléthyléthyldiamine), tris acétate, chlorure de sodium 5M (Fluka), chlorophorme, isopropanole, Rnase, ethanol pure, eau pure, agarose (SIGMA), bromure d'ethidium, glycérole, bleu de Bromophénol (SIGMA), acide Borique, DNA Ladder 1KB, DNTP, le persulfate d'ammonium (APS), TEMED (NNN'N tétraméthyléthyléthyldiamine), Urée.

## **II. 3. METHODE**

Le génotypage de la luzerne cultivé au laboratoire de Biologie moléculaire de l'INRA Algérie, par l'utilisation de deux marqueurs microsatellites SSRs; FMT13 et B14B03. A l'aide

d'une technique qui nécessite plusieurs étapes pour chaque marqueur et qui se résume comme suite:

- Amplification des marqueurs microsatellites par l'utilisation de la méthode PCR « Polymerase Chain Reaction ».
- Révélation des amplifias sur gel d'acrylamide :
  - Faire migrer les produits de la PCR sur un gel d'acrylamide soumis à un champ électrique. Les fragments les plus courts (ceux portant moins de répétitions du motif microsatellite) migrent plus rapidement, dans le gel, que ceux qui ont des fragments plus longs ; ainsi, on pourra voir s'il y a polymorphisme entre les individus.
  - Coloration au nitrate d'argent qui va nous permettre la révélation des bandes migrées et ainsi la visualisation des allèles par marqueur.

Initialement, le génotypage devait être effectué pour l'ensemble des marqueurs au niveau de notre laboratoire de biologie moléculaire à l'INRA Algérie, mais devant les difficultés des techniques rencontrées dans ce laboratoire et les délais maintenus très courts, j'ai réalisé le génotypage des deux marqueurs FMT13 et B14B03 au niveau de notre laboratoire INRA Algérie. Le reste des marqueurs ont été génotypés au laboratoire de biologie moléculaire de l'INRA de France sous la direction du Docteur Bernadette Julier, sur gel acrylamide à l'aide d'un séquenceur.

### **II.3.1. EXTRACTION D'ADN**

Les échantillons des ADN extraits sont déposés dans des puits sur gel d'agarose à 1.2% pour une migration électrophorétique afin de vérifier la qualité d'ADN (présence ou absence), après une révélation sous exposition ultra violet.

Les échantillons d'ADN ont été envoyés à l'INRA de Lusignan, en tubes avec 16 cultivars et 30 plantes par cultivar. Les tubes sont étiquetés «Sx,y», x: pour désigner le code du cultivar et le y pour le numéro de la plante.

### **II.3.2. AMPLIFICATION DES MARQUEURS MOLECULAIRES SSRs**



Pour l'amplification des marqueurs moléculaires SSRs, nous avons utilisé la technique PCR (polymerase chaîne reaction) qui permet d'amplifier *in vitro* la séquence d'acide nucléique cible, en plusieurs milliers d'exemplaires à l'aide d'un thermocycleur pour donner ce que nous appelons amplifias. Ces derniers vont être dénaturés et séparés sur gel acrylamide (6%).

#### a) Le mix PCR:

Les réactifs nécessaires pour une PCR constituent le mélange réactionnel (mix) qui est composé de l'ADN génomique, les amorces (sens et anti-sens), Taq polymérase (INVITROGEN), et les quatre nucléotides dNTP (désoxyribonucléotides Triphosphate).

Les amorces (INVITROGEN CUSTOM PRIMERS) SSRs reçues lyophilisées sont diluées pour donner la solution mère à 100mM qui est stockée à -20°C.

Le mix est constitué des mêmes réactifs à l'exception de la différence dans les amorces SSRs. Chaque marqueurs SSRs a une paire d'amorce spécifique, amorce F (Forward) et amorce R (Reverse).

Le mix PCR utilisé est de volume final de 20µl par échantillon contenant les éléments suivants (Tableau VI):

**Tableau VI:** Composition du mix PCR.

	Concentration initiale	Concentration finale	Volume utilisé
H2O			14.775µL
Tampon PCR	10X	1X	2µL
Mgcl <sub>2</sub>	50 Mm	1.5mM	0.6µL
Amorce F	(10µM)	0.4µM	0.4µL
Amorce R	10µM	0.4µM	0.4µL
DNTP	(10Mm	0.2µM	0.2µL
Taq polymérase	5U	0.625U	0.125µL
ADN	25ng/µl	37.5 ng	1.5µL

**b) Programmation du thermocycleur pour l'amplification PCR:**

Le programme PCR que nous avons utilisé est comme suite :

- |               |   |           |
|---------------|---|-----------|
| 1. 94°C ..... | 4 minutes (Activation de la polymérase) |           |
| 2. 94°C ..... | 30 secondes pour la dénaturation.       | 35 Cycles |
| 3. 55°C.....  | 1 minute pour l'hybridation.            |           |
| 4. 72°C.....  | 1 minute pour l'élongation              |           |
| 5. 72°C.....  | 7 minutes (élongation finale)           |           |

Seule la température d'hybridation peut changer d'un marqueur à un autre. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des amorces. Pour la plupart des marqueurs SSRs testés la température d'hybridation était fixée à 55°C. Pour certains marqueurs nécessitant une stringence moindre nous avons diminué la température à 50°C.

Le produit PCR (amplifias) est stocké à 4°C ou à -20°C.

**II.3.3. LA REVELATION SUR GEL ACRYLAMIDE****a) Préparation du gel acrylamide à 6%**

Le volume total de la solution d'acrylamide est de 70ml, elle se prépare dans une éprouvette de 100 ml. La préparation de la solution d'acrylamide à 6% comprend les étapes suivantes:

- 33.6 g d'urée,
- 7 ml de TBE10X (annexe 3),
- 10.5 ml d'acrylamide / bis-acrylamide 40% (solution mix 19:1 stockée a 4°C),
- Compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 70 ml,
- Chauffer la solution sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution totale de l'urée et la solution deviendra limpide.

Le persulfate d'ammonium à 10% (700 µl) ainsi que le TEMED (14 µl) sont ajoutés à la solution d'acrylamide au dernier moment juste avant le coulage du gel sur les plaques en verre.

**b) Préparation des plaques**

Deux plaques de verre sont bien nettoyées avec de l'alcool absolu. La grande plaque (42 cm x 32.5 cm) est traitée par le Dimethyldichlorosilane (silane répulsif) qui empêche le gel acrylamide de se coller à la plaque tandis que la petite plaque (39.5cm x 32.5cm) est traitée par le silane attractif qui permet au gel de rester collé à cette dernière.

On place deux espaceurs d'une épaisseur de 4 mm sur les extrémités de la grande plaque, puis on positionne la plus petite plaque sur les espaceurs. Ensuite on serre les deux plaques grâce à des pinces et du scotch.

La solution du gel d'acrylamide préparé auparavant est coulée en sandwich entre les deux plaques. On garde le gel à 4°C pendant une nuit pour polymérisation.

### **c) La migration électrophorétique**

Pour l'analyse des différents amplifias, on utilise la technique électrophorèse PAGE (Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Après la polymérisation du gel, on le place dans la cuve électrophorétique.

La phase Pré-Run est essentielle avant le dépôt des amplifias. Elle permet de préchauffer le gel pour l'élimination de l'excès d'urée. Le tampon utilisé est le TBE1X.

Les conditions de pré-run sont :

- Température : 45°C
- Voltage : 1670 V
- Puissance : 70W
- Durée : 30 min (élimination de l'urée)

### **d) Préparation et dépôt des amplifias**

Pour obtenir une séparation efficace, les molécules doivent migrer sous forme simple brin linéaire. Les amplifias (07µL) sont donc soumis à une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes en présence de bleu de formamide (10µL) et de l'eau pure (3µL).

A la fin de la dénaturation, les amplifias sont déposés au froid pendant 5 minutes (choc thermique). Ensuite on dépose 3.5 µl de chaque amplifia par puits de peigne. Le peigne utilisé comprend 64 dents.

Sous l'influence d'un champ électrique les amplifias chargés négativement vont migrer vers l'électrode positive (anode), la vitesse ainsi que la durée de migration dépend du poids

moléculaire (PM) des marqueurs moléculaires, plus le poids moléculaire est élevé plus la vitesse est lente et la durée de migration est longue.

### e) Coloration au nitrate d'argent

A la fin de la migration électrophorétique, les deux plaques sont décollées et on récupère celle où le gel est fixé. Cette dernière est mise à plusieurs solutions de coloration; solution de fixation, solution de coloration et solution de développement (Tableau VII).

**Tableau VII :** Constituants des solutions de révélation.

	Eau distillée	Produits chimiques	Durée de traitement
<b>Solution de fixation</b>	1440 ml	160 ml Acide Acétique Glacial	20 à 25mn
<b>Solution de coloration</b>	2000 ml	2 g Nitrate D'argent	30 mn
<b>Solution de développement</b>	1600 ml	48 g Carbonate de Sodium	Quelques minutes

1. D'abord laissez la plaque dans la solution de fixation sous agitation,
2. Par la suite, réalisez 03 rinçages avec de l'eau distillée,
3. Ajoutez 03 ml de formaldéhyde à 37% dans la solution de coloration dans laquelle on laisse la plaque,
4. En suite, on ajoute dans chaque solution de développement 320 µl de Thiosulfate de sodium 1% et 2400 µl de formaldéhyde à 37%. Mettez la plaque dans la première solution de développement, dès l'apparition des premières bandes, on la transmet dans la deuxième solution de développement,
5. A l'apparition de toutes les bandes, ajoutez la solution de fixation récupéré et laissez sous agitation pendant 30minutes,
6. Rincez 03 fois à l'eau distillée (05minutes pour chaque rinçage),
7. Laissez sécher à l'air libre pendant quelques heures.

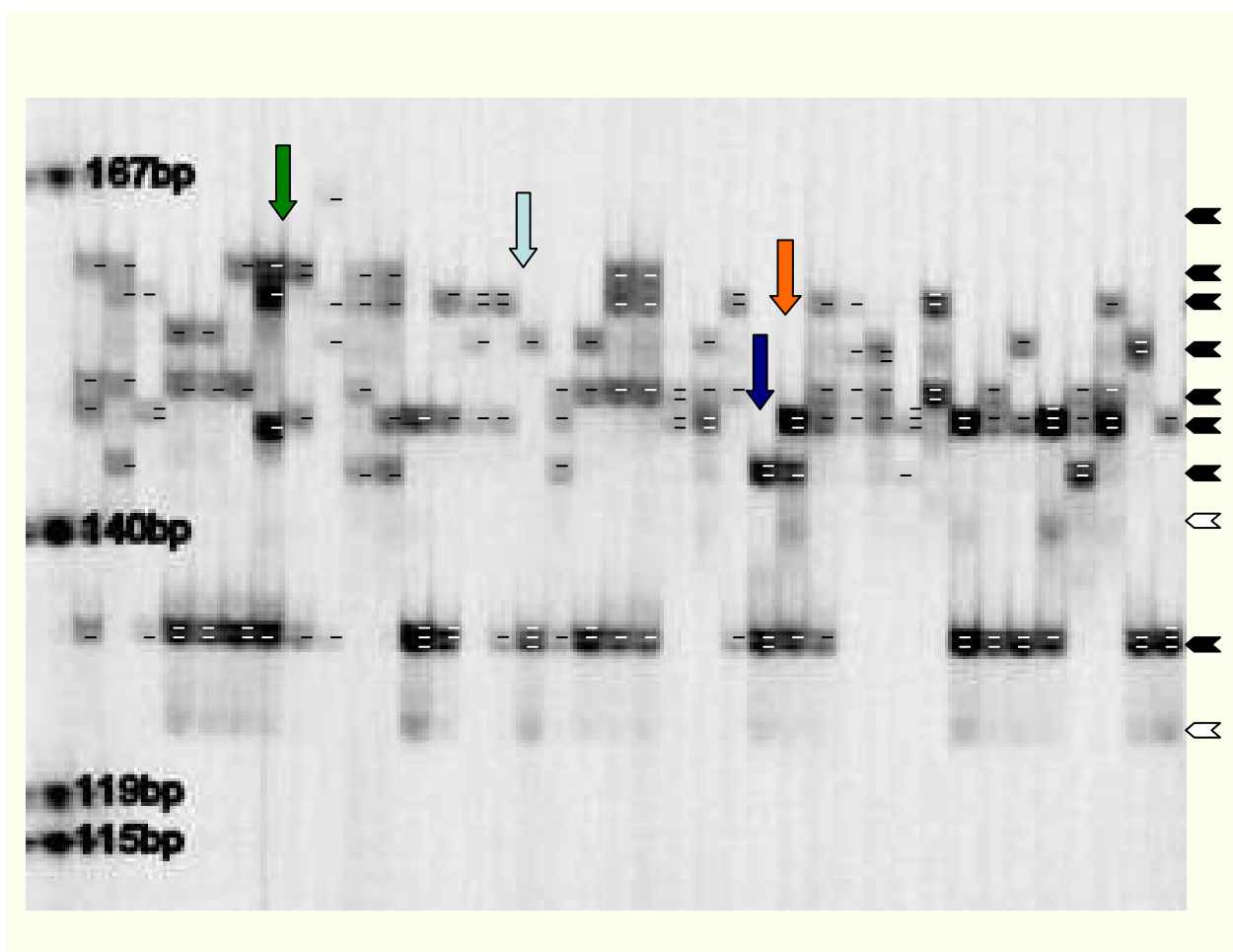
## II.4. LECTURE DES GELS ET ANALYSES STATISTIQUES

### II.4.1. Traitement des gels

Les gels obtenus ont été traités en deux étapes par l'utilisation d'un logiciel **Gene Profiler**. La première étape consiste en l'identification des différents allèles présents dans chaque individu. La deuxième étape consiste à la détermination de la dose de chaque allèle pour chaque individu;

- Quand un individu présente quatre (04) allèles, chacun est marqué par une seule dose.
- Si on aura un seul allèle, cet allèle est dans quatre doses.
- Dans le cas où on a trois allèles; l'allèle avec l'intensité la plus dense été marqué par double dose, tandis que les deux autres allèles sont marqués par une seule dose.
- Dans un individu où on a deux allèles; si les deux allèles sont de la même intensité, ils sont marqués par double dose, si un allèle est plus dense que l'autre, un est marqué par triple dose et l'autre par une seule dose (Figure 12).

Les données brutes ont été extraites comme base de données utilisant le logiciel de **Gene Profiler** et exportées en tailles alléliques pour les utiliser d'avantage dans la suite de notre étude statistique.



**Figure 10:** Exemple de gel acrylamide analysé pour le marqueur ATPase456 sur 38 individus

#### II.4.2. Analyse statistique des données des SSR

Après le codage des gels à l'aide du logiciel Gene Profiler, une base de données a été créée ensuite transférée vers le logiciel Excel, sur laquelle on applique le logiciel AUTOTET pour le calcul des indices de diversité.

La diversité génétique **intra-cultivars** a été estimée par le calcul de plusieurs paramètres: le nombre d'allèles «A», le nombre d'allèles moyen par individu «Ai», le taux d'hétérozygotie observé «Ho» (Observed heterozygosity) et la fréquence théorique des hétérozygotes «He» (expected heterozygosity) pour chaque marqueur microsatellite.

Selon Nei (1973), «Ho» peut être calculée à partir de la fréquence mesurée des hétérozygotes (nombre des individus hétérozygotes divisé par le nombre total des individus de l'échantillon). «He» peut être calculé à partir des fréquences Alléliques; S'il y a **n** allèles avec les fréquences  $p_1, p_2, p_3, \dots, p_n$ , la fréquence théorique des hétérozygotes sera :

$$H_E = \left(1 - \sum p_i^2\right)4n / (4n - 1)$$

$p_i$  fréquence allélique

n: le nombre d'individus

Le paramètre **FIS** de Wright, dénommé aussi indice de fixation et appelé auparavant coefficient de consanguinité (Wright, 1951), est calculé par le logiciel **AUTOTET** version 1.0 (Thrall et Yong, 2000) selon la formule :

$$Fis = (he - ho) / he = 1 - (ho/he)$$

ho: hétérozygotie observée

he: hétérozygotie attendue.

Le paramètre Fis reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations:

FIS = 1 signifie fixation complète (cas d'autofécondation),

FIS < 1: hétérozygotie excédentaire (cultivars en déséquilibre),

FIS = 0: population en équilibre de Hardy-Weinberg.

FIS < 0: hétérozygotie excédentaire (cultivars en déséquilibre).

Pour la diversité génétique **inter-cultivars**, elle a été estimée par le calcul de l'indice de structuration; le paramètre de différenciation  $F_{st}$  par le logiciel **Gene 4X** version 1.0 (Ronfort *et al.*, 1998) et le logiciel **SPAGeDI** version 1.2 (Hardy and Vekemans 2002).

Wright (1951) a défini l'indice  $F_{st}$  (variance standardisée) comme l'hétérogénéité des fréquences alléliques entre subdivisions d'une population. Il représente la corrélation entre allèles à l'intérieur d'une sous-population par rapport à l'ensemble des sous populations. La différenciation des populations par rapport au total ( $F_{st}$ ) est calculée en fonction des paramètres  $F_{is}$  (différenciation des individus à l'intérieur des populations) et  $F_{it}$  (différenciation des individus par rapport au total). Ils sont liés par la relation suivante:

$$(1 - F_{it}) = (1 - F_{st}) (1 - F_{is})$$

$$F_{st} = 1 - (1 - F_{it}) / (1 - F_{is})$$

D'après Wright, 1951:  $0 < F_{ST} < 0,05$  : **différenciation faible**,

$0,05 < F_{ST} < 0,15$  : **différenciation modérée**,

$0,15 < F_{ST} < 0,25$  : **différenciation importante**,

$F_{ST} > 0,25$  : **différenciation très importante**.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	01
<b>I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	03
<b>I.1 Les cultures fourragères en Algérie: situation actuelle et perspectives</b> .....	03
<b>I.2 Présentation des légumineuses</b> .....	05
<b>I.3 Présentation de la luzerne cultivée <i>Medicago sativa</i></b> .....	06
I.3.1 Définition.....	06
I.3.2 Systématique.....	07
I.3.3 Situation de la luzerne en Algérie.....	08
I.3.4 Origine et dispersion.....	09
I.3.5 Développement et croissance de la luzerne.....	10
I.3.6 Caractéristiques de la luzerne.....	11
I.3.6.1 Caractéristiques morphologiques.....	11
I.3.6.2 Caractéristiques physiologiques.....	13
I.3.7. Intérêt de la Luzerne.....	14
I.3.7.1 Intérêt agronomique.....	14
I.3.7.2 Intérêts zootechniques.....	14
I.3.7.3 Intérêts économiques.....	11
<b>I.4 La génomique végétale</b> .....	15
I.4.1 Notion d'allèle et de gène.....	15
<b>I.5 Le polymorphisme génétique</b> .....	15
<b>I.6 Les marqueurs génétiques</b> .....	18
I.6.1. Définition.....	18
I.6.2. Classification.....	12
I.6.2.1. Les marqueurs morphologiques (ou phénotypiques).....	19
I.6.2.2. Les marqueurs biochimiques.....	20
I.6.2.3. Les marqueurs moléculaires.....	20
a) Les marqueurs de type RFLP.....	22
b) Les marqueurs moléculaires basés sur l'utilisation de la méthode PCR.....	22
b1) Les marqueurs RAPD.....	25
b2) Les marqueurs AFLP.....	25
b3) Les marqueurs microsatellites (SSR).....	25
<b>I.7 La diversité génétique</b> .....	29
<b>I.8 Espèces, cultivars, variétés et populations</b> .....	29
<b>II. MATERIELS ET METHODES</b> .....	31
<b>II.1 Matériel biologique</b> .....	31
II.1.1 Matériel végétal.....	31
II.1.2. Les marqueurs moléculaires.....	31
<b>II. 2 Matériel non biologique</b> .....	33
II.2.1 Equipements.....	33
II.2.2 Réactifs.....	33
<b>II. 3. Méthodes</b> .....	33



II.3.1	Extraction d'ADN.....	34
II.3.2	Amplification des marqueurs moléculaires SSRs.....	34
	a) Le mix PCR.....	35
	b) Programmation du thermocycleur pour l'amplification PCR.....	36
II.3.3	La révélation sur gel acrylamide.....	36
	a) Préparation du gel acrylamide à 6%.....	36
	b) Préparation des plaques .....	36
	c) La migration électrophorétique.....	37
	d) Préparation et dépôt des amplifias.....	37
	e) Coloration au nitrate d'argent.....	38
<b>II.4</b>	<b>Lecture des gels et analyse statistiques.....</b>	<b>38</b>
II.4.1	Traitement des gels.....	39
II.4.2	Analyse statistique des données des SSRs.....	40
<b>III.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS.....</b>	<b>42</b>
<b>III.1</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>42</b>
III.1.1	Extraction d'ADN.....	42
III.1.2	Génotypage des cultivars.....	42
III.1.2.1	Le génotypage avec le marqueur microsatellite B14B03= MTIC 562.....	42
III.1.2.2	Le génotypage avec le marqueur microsatellite FMT13.....	44
III.1.3	Diversité génétique des cultivars.....	45
III.1.4	Structuration des cultivars.....	50
<b>III.2</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>53</b>
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>55</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>		
<b>ANNEXES</b>		

**Références Bibliographiques**

- 1) **Abdelguerfi A. et Laouar M.**, 1999. Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral : possibilités de valorisation en région méditerranéenne. *Pastagens et Forragens*, 20 : 81-112.
- 2) **Abdelguerfi A. et Abdelguerfi-Laouar M.**, 2004. Les ressources génétiques d'intérêt fourrager et/ou pastoral : Diversité, collecte et valorisation au niveau méditerranéen. *Options méditerranéennes*, 62 : 29-41.
- 3) **Abdelguerfi A., Laouar M. et M'Hammedi Bouzina M.**, 2008. Les productions fourragères et pastorales en Algérie : Possibilités d'Amélioration. *Revue Semestrielle 'Agriculture et développement'' (INVA, Alger)*, n°6 : 14-25.
- 4) **Adam A., et Dron M.**, 1993. Les Outils Moléculaires Et Leurs Applications A L'amélioration Des Plantes. *In Le Progres Genetique Passe-t-il Par Le Repérage Et L'inventaire Des Gènes ?.*, Edit : AUPELF-UREE John Libbey Eurotext., P ; 23-46.
- 5) **Anonyme** 1991. La luzerne : Culture et diagnostic. Les cahiers techniques de France Maïs. 28p
- 6) **Anonyme** 2001: URL: <http://www.inra.fr/Internet/Directions/DIC/ACTUALITES/SIA,2001/AMELIORATION/diversité.html>.
- 7) **Andersson MS, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano CE.**, 2006. Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research* 96: 387-406.
- 8) **Barnes, DK., E.T., Murphy, R.P., Hunt, O.J., Beard, D.F., Skrdla, W.H. et Teuber, L.R.**, 1977. Alfaalfa germoplasm in the United States: genetic vulnerability, use, and maintenance. USDA-ARS Tech. Bull. 1571. USDA-ARS, Hyattsville, MD.

- 9) **Birouk, A.**, 1993. Les complexes de Medicago au Maroc: Variabilité et ressources génétiques. Dans : le progrès génétique passe-t-il par le repérage et l'inventaire des gènes? Ed. AUPELF-UREF. John Libbey Eurotext. Paris. PP. 307-322.
- 10) **Bertheau Y., Darrasse A., Jouan B., Kotoujansky A., Priou S.**, 1993. Amplification Enzymatique *in vitro* D'ADN Et Ses Applications. In Le Progres Genetique Passe-t-il Par Le Repérage Et L'inventaire Des Gènes., Edit : AUPELF-UREE John Libbey Eurotext. P; 3-22.
- 11) **Bouchetata A.**, 1969. Mises au point des connaissances actuelles sur la luzerne en Algérie. *M.A.R.A., I.N.R.A., C.N.R.Z.*, 64 p.
- 12) **Bouaboub-Mossab K.**, 2001. Comportement de populations de luzerne pérenne *Medicago sativa L* dans la région d'Adrar, *thèse de magistère, Ina, Algérie*, P ; 03-08.
- 13) **Bolton J. L.**, 1962. Alfalfa -botany cultivation and fertilization., Edit: Interscience Publ. P; 474.
- 14) **Bolton J. L., Goplen B. P. et Baenziger H.**, 1972. World Distribution And Historical Developments, Ch. 1. In Alfalfa science and Technology, Monographie N°15. Edit: *American Society of Agronomy*. P; 1-34.
- 15) **Cui Z, Carter TE, Jr., Burton JW, Wells R** (2001). Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *Crop Sci.*, 41: 1954-1967.
- 16) **Casasoli M.**, 2004. Cartographie génétique comparée chez les Fagacées. *Thèse doctorat, université de bordeaux I*. France.
- 17) **Chaabena, A.**, 2001. Situation des cultures fourragères dans le Sud-Est septentrional du Sahara algérien et caractérisation de quelques variétés introduites et populations sahariennes de luzerne cultivée. *Thèse de Magister, INA, Alger*.
- 18) **Chaabena, A., Abdelguerfi, A., Eddoud, A., Chehma, A., Babahani, S., Bradai, L., Benamer, O. et Souta, H.** (2006). Importance des fabaceae dans la flore saharienne : cas

- des régions de Ouargla et oued Righ. In *Proc. Diversity of fodder fabaceae and their symbionts: biotechnological, agronomic, and Environmental Applications*, Algiers.2006, Abdelguerfi(ed.), pp. 49-51.
- 19) **Chaibi W., 1995.** Etude physiologique ultrastructurale et cytoenzymologique de l'effet de chlorure de sodium chez *Medicago sativa* L. *Thèse de doctorat, Faculté des sciences de Tunis.*
- 20) **Chehat F., 2001.** La question des fourrages en Algérie. *Actes du 1<sup>er</sup> Atelier national sur la stratégie de développement des fourrages en Algérie*, 10-12 juin 2001, Alger : 27-28.
- 21) **De Vienne D., Santoni S., 1998.** Les principales sources de marqueurs moléculaires. In *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. D.de Vienne ed. 130p.
- 22) **Demol J., Baudoin J., Louant B., Marechal R., Mergeai G., Otoul E., 2002.** Amélioration Des Plantes (application aux principales espèces cultivées en régions tropicales). Édit : *LES PRESSES AGRONOMIQUES DE GEMBLOUX. BELGIQUE.* P ; 41-70.
- 23) **Diwan N, Bhagwat AA, Bauchan GR, Cregan PB., 1997.** Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome* 40:887-895
- 24) **Falque M. et Santoni S., 2004.** Génomique, variabilité génétique et amélioration des plantes. Les marqueurs moléculaires. Dans *La Génomique en Biologie Végétale*. Édit. Morot-Gaudry J.-F. Et Briat J.-F. INRA édition. P ; 349-375.
- 25) **Flajoulot S.; Ronfort J.; Baudouin P.; Barre P.; Huguet T.; Huyghe C.; Julier B. 2008.** Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theor. Appl. Genet.*, 111:1420-1429.
- 26) **Gomez OJ, Blair MW, Frankow-Lindberg BE, Gullberg U (2004).** Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sci.*, 44: 1412-1418.

- 27) **Griffiths., Wessler., Lewontin., Gelbart., Suzuki., Miller.,** 2006. Introduction A L'analyse Genetique., *Edit : de bœck.* P; 116-135.
- 28) **Guyot L., et Gibassier P.,** 1967. Les noms des plantes, Collection (Que sais-je !) N°856, Presses Universitaires de France. Paris. P; 66-68.
- 29) **Gupta PK., Roy JK., Prasad M.** (2001). Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants [Review]. *Curr. Sci.*, 80 (4), p. 525.
- 30) **Hardy, O.J.; Vekemans X.** 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Mol. Ecol. Notes* 2:618-620.
- 31) **Herrmann, D.; Flajoulot, S.; Barre, P.; Huyghe, C.; Ronfort, J.; Julier, B.** 2008. Comparison of morphological traits and SSR to analyse diversity and structure of alfalfa cultivars. *North American Alfalfa Improvement Conference*, Dallas.
- 32) **Issolah R.,** 2008. Les fourrages en Algérie : Situation et perspectives de développement et d'amélioration. *Recherche Agronomique*, 22: 34-47.
- 33) **Janati, A.,** 1990. Les cultures fouragères dans les oasis marocain. *Cahiers option méditerranéen*, Vol. 11 : 163-169.
- 34) **Julier B, Flajoulot S, Barre P, Cardinet G, Santoni S, Huguet T, Huyghe C** (2003). Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biol.*, 3:9
- 35) **Julier B.,** 1995. Genetic variability for morphomogy, growth and forage yield among perennial diploid and tetraploid lucerne populations (*Medicago sativa* L.). *Agronomie*, 15: 295-304.
- 36) **Lazrek-Ben friha F.,** 2008. Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au

- stress salin 2008. *Thèse de doctorat de l'Université de TOULOUSE III, Paul Sabatier, Biologie*. 254 P.
- 37) **Laumont P.**, 1940. La luzerne et sa culture en algérie. *Doc. Rens. Agric. Bull.* N°31, p 1-47.
- 38) **MADR - DSASI**, 1998 – 2007. Statistiques agricoles. Série B
- 39) **Mauriés M.**, 1993. La luzerne aujourd'hui: Edit : Groupe France Agricole. P ; 17-75. Rome. P ; 82.
- 40) **Mauriés, M.**, 1994. La luzerne aujourd'hui : Vache laitières, vaches allaitantes, chèvres, brebis, chevaux. Ed France agricole. Paris.
- 41) **Marble V. L.**, 1993 ; Des fourrages pour le Proche-Orient: La luzerne. Etude FAO Production végétale et protection des plantes 97/1. FAO. Rome. P ; 237.
- 42) **Moinet M.L.**, 1990. Le cobaye vert. *Science et vie* n° 870. P ; 54-65.
- 43) **Meuriot F.**, 2004. Etude et modélisation des effets de l'intensité de la coupe et du niveau des réserves organiques initiales sur la dynamique de l'azote (et du carbone) au cours de la repousse chez la luzerne (*Medicago sativa* L.). *Institut de Biologie Fondamentale et Appliquée, Ecole Doctorale Normande de Chimie – Biologie*.
- 44) **Mengoni A., Gori A., Bazzicalupo M.**, 2000. Use of RAPD and microsatellites SSRs variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfaalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breed* 119:311-317.
- 45) **Mhiri C., Grandbastien M.-A.**, 2004. La génomique en biologie végétale", chapitre 19.. *Éléments transposables et analyse de la biodiversité végétale*. Editeurs JF Morot-Gaudry et JF Briat. Editions INRA, Paris, 2004, pp 377-401
- 46) **Nei M.**, 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3321-3323.

- 47) **Rossignol J.-L., Berger R., Deutsch J., Fellous M., Lamour-Isnard C., Ozier-Kalogeropoulos O., Picard M., et De Vienne D.**, 2000. Génétique Gènes et génomes. Édition DUNOD. France. P ; 115-141.
- 48) **Ronfort, J.; Jenczewski, E.; Bataillon, T.; Rousset, F.** 1998. Analysis of population structure in autotetraploid species. *Genetics*, 150: 921-930.
- 49) **Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coggill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D., Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. et Altshuler, D.**, 2001. International SNP Map Working Group. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 409: 928–933.
- 50) **Sfarni O**, 2007, Utilisation de quelques marqueurs microsatellites (SSR<sub>S</sub>) pour génotyper la population F1 de la Luzerne *Medicago sativa* L. *Mémoire d'ingénieur, USD, Blida, Algérie.*
- 51) **Si Ziani Y. et Boulberhane D.**, 2001. Bilan fourrager 1998 : comparaisons offre/besoins. *Actes du 1er atelier national Sur le développement des fourrages en Algérie ITGC* : 20-26.
- 52) **Tourte Y.**, 2002. Génie Génétique Et Biotechnologies concepts, méthodes et application agronomiques 2<sup>e</sup> édition. Édit : DUNOD. P ; 22-54.
- 53) **Toshihiko Y., Momotaz A.**, 2004: Usefulness of simple sequence repeat (SSR) polymorphism for breeding programs in *Festulolium*. In Development of novel grass with environmental stress tolerance and high forage quality through intergeneric hybridisation between *Lolium* and *Festuca*. Yamada T., and Takamizo T.ed.pp.43-47.
- 54) **Thrall PH, Young A.**, 2000. AUTOTET: A program for analysis of autotetraploid genotypic data. *J Hered* 91:348–349.

- 55) **Talamucci P., Chaulet C.**, 1989. Contraintes et évolution des ressources fourragères dans le Bassin Méditerranéen. In *Proc. of 17th Intern. Rang. Congr.*, Nice, France, 1 : 1731-1740.
- 56) **VILLAX E.J.**, 1963. Les cultures fourragères méditerranéennes occidentales.
- 57) **Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans 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. *Nucl. Acids Res.*, 23, p. 4407.
- 58) **Whyte R.O., Nilsson-Leissner G. et Trumble H.C.** 1953. Legumes in agriculture. FAO Agriculture Studies, series 21, Rome, Italy.
- 59) **Williams JGK., Kubelik AR., Livak KJ., Rafalski J A . , Tingey SV.**, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl.Acids Res.* 18 (22), p. 6531–6533.
- 60) **Wright S.**, 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen*, 15: 323-354.



### III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

#### III.1 RESULTATS

##### III.1.1 EXTRACTION D'ADN

Le contrôle de la qualité ainsi que la quantité d'ADN extraite se fait sur gel d'agarose. Les profils d'ADN de notre étude ont montré des bandes nettes avec l'absence des smires. Ceci implique la bonne qualité et la quantité suffisante de notre matériel génétique.

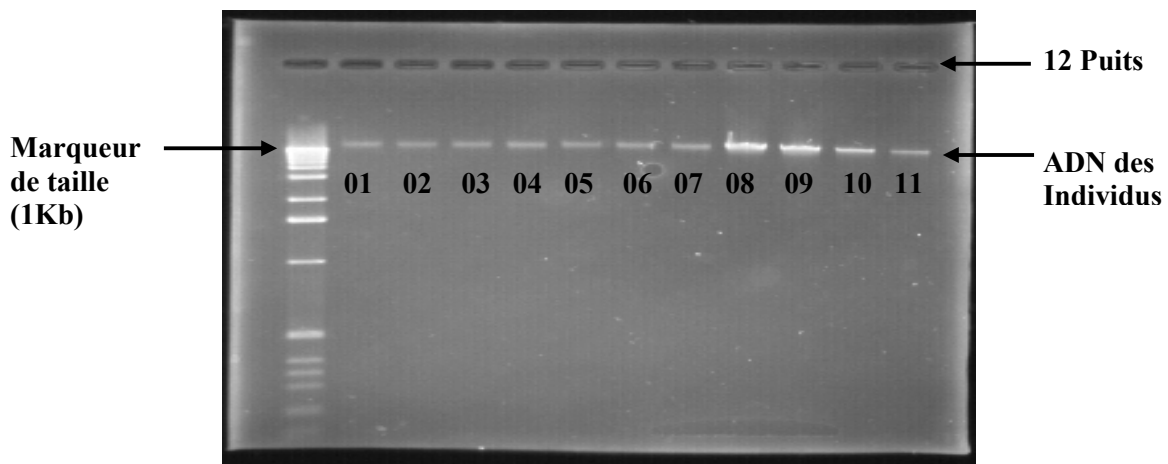


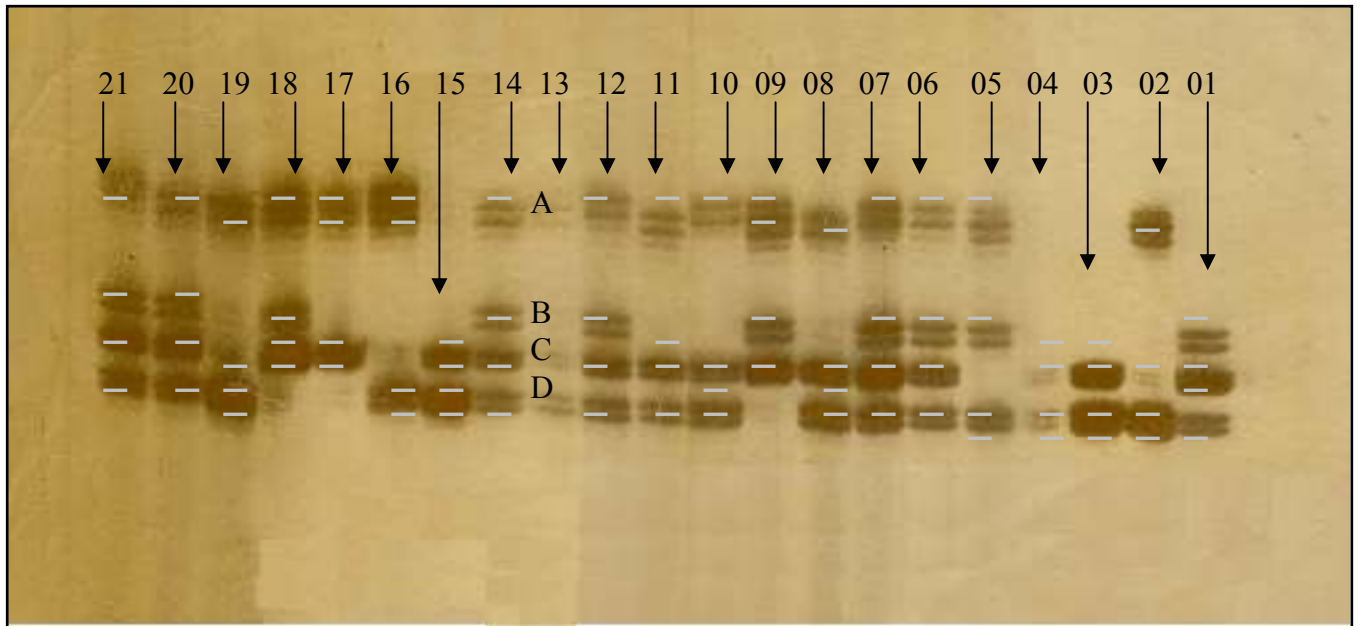
Figure 11 : Profil d'ADN sur gel agarose de 1,2%.

##### III.1.2 GENOTYPAGE DES CULTIVARS

Sur 16 Cultivars de luzerne (*Medicago sativa*) à raison de 30 individus par cultivars, le génotypage est réalisé, donc environ 480 individus par marqueur. Six marqueurs ont été choisis, un pour chaque chromosome à l'exception des chromosomes 4 et 8.

###### III.1.2.1 Le génotypage avec le marqueur microsatellite B14B03= MTIC 562

Le marqueur moléculaire MTIC562 est un marqueur équivalent au marqueur B14B03, il appartient au groupe de liaison 5 (GL5) dont la séquence est [CA] 9. Le génotypage de quelques individus à travers ce marqueur, a donné les profils des allèles représentés dans la Figure 12.



**Figure 12:** Profil électrophorétique de 21 individus amplifiés par le marqueur MTIC 562.

Après avoir identifié les différents allèles présents dans chaque échantillon, on a procédé au dosage de ces allèles. Donc la lecture de l'ensemble des gels a été réalisée non seulement par le marquage de la présence ou absence de l'allèle mais aussi par le dosage des différents allèles par le logiciel Gene profiler.

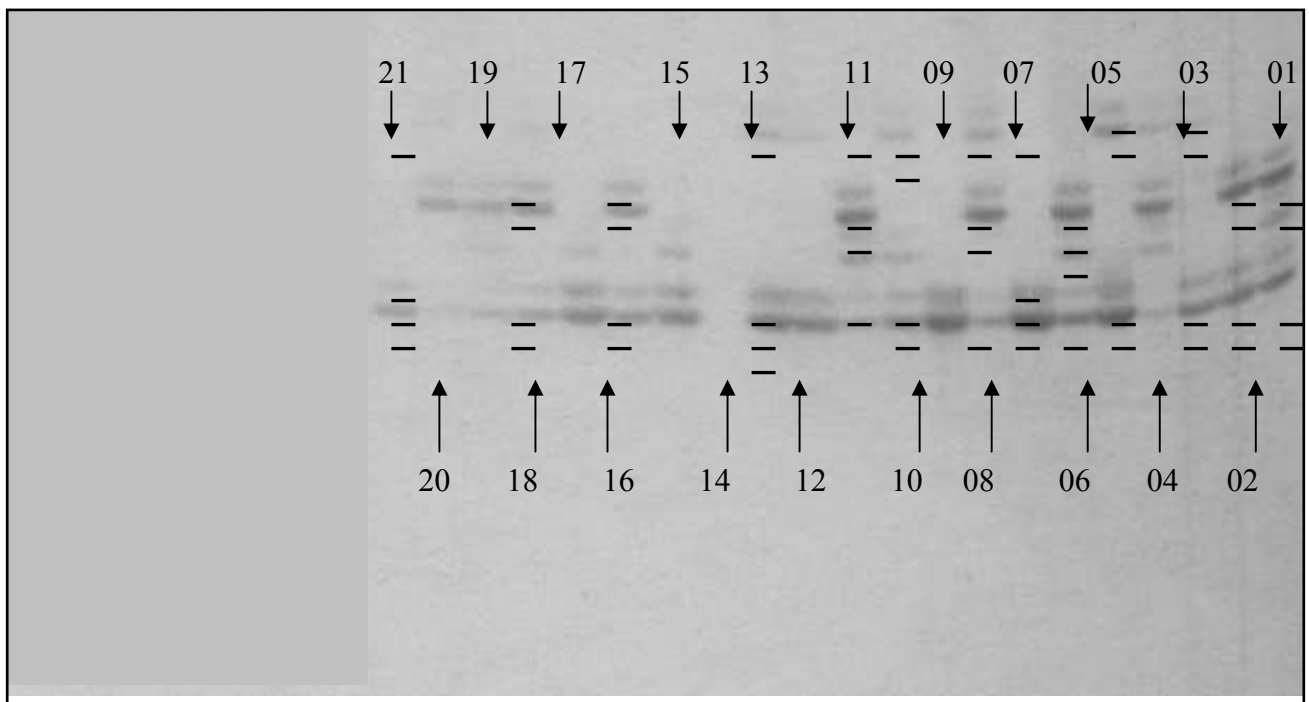
Le profil électrophorétique des amplifias dans la figure 12 montre que:

- Les individus 06, 07, 12, 14, 20 et 21 présentent quatre allèles de même intensité donc chacun est marqué par une simple dose.
- Les individus 08, 10, 11, 13, 18 et 19 présentent deux allèles dont un est plus dense que l'autre, donc un est marqué par triple doses et l'autre par une simple dose.
- Les individus 03, 04, 09, 15, 16 et 17 présentent deux allèles de même intensité dont chacun est marqué par double doses.
- Les individus 01, 02 et 05 présentent Trois allèles ; pour l'individu 01, le deuxième allèle présente l'intensité la plus dense alors que pour les individus 02 et 05 le troisième allèle présente l'intensité la plus dense. Donc la bande la plus dense est

marquée par double doses et les deux autres allèles d'une intensité égale sont marqués par une simple dose.

### III.1.2.2 Le génotypage avec le marqueur microsatellite FMT13

Le marqueur moléculaire FMT13, est un marqueur appartenant au groupe de liaison 1 (GL1), dont la séquence est [GA]<sub>2</sub>GG[GA]<sub>9</sub>. Le génotypage de quelques populations à travers ce marqueur, a donné les profils des allèles représentés dans la Figure 13.



**Figure 13:** Profil électrophorétique de 21 individus amplifiés par le marqueur FMT13.

Le profil électrophorétique des amplifias dans la figure 13 montre que:

- Les individus 01, 02, 03, 05, 09, 15, 10, 16 et 18 présentent deux allèles de même intensité dont chacun est marqué par double doses.
- Pour les individus 06, 07, 12, 13, 17, 20 et 21, présentant deux allèles dont un est plus dense que l'autre, donc un est marqué par triple doses et l'autre par une seule dose.

- Pour les individus 04, 08, et 11, présentant trois allèles où le deuxième allèle présente l'intensité la plus dense, il est donc marqué par double doses, tandis que les deux autres allèles d'une intensité égale, sont marqués par une simple dose.
- L'individu 19 présente trois allèles, le premier allèle présente l'intensité la plus dense, il est donc marqué par double doses, tandis que les deux autres allèles, d'une intensité égale, sont marqués par une simple dose.
- L'individu N°14, ne présente aucun profil, ceci peut être expliqué soit par la non amplification de l'ADN ou carrément par son absence dans cet échantillon.

### III.1.3 DIVERSITE GENETIQUE DES CULTIVARS

Un total de 147 allèles a été identifié rangé de 13 à 37 allèles pour les marqueurs MTIC338 et B14B03 respectivement. La moyenne des allèles est de 24.5 allèles par marqueur moléculaire (Tableau VIII).

**Tableau VIII:** *Estimation du nombre d'allèle, du nombre d'allèle moyen par individus (Ai) et du taux d'hétérozygotie (He) par marqueur pour l'ensemble des cultivars.*

Marqueur SSR	Chromosome	Nombre d' alleles	Nombre d'allèles moyen par individus (Ai)	He
FMT13	1	28	2.6	0.738
MTIC451	2	24	<b>3</b>	<b>0.818</b>
MTIC338	3	13	<b>2.4</b>	0.696
B14B03	5	37	2.6	0.681
MTIC343	6	15	2.6	0.716
MTIC432	7	30	<b>2.4</b>	<b>0.621</b>

Dans le Tableau VIII, on observe que le taux d'hétérozygotie par marqueur moléculaire microsatellite varie de **0.621** pour **MTIC432** à **0.818** pour **MTIC451**. Pour le nombre d'allèles moyen par individus (Ai), il varie de **2.4** pour les marqueurs **MTIC432** et **MTIC338**

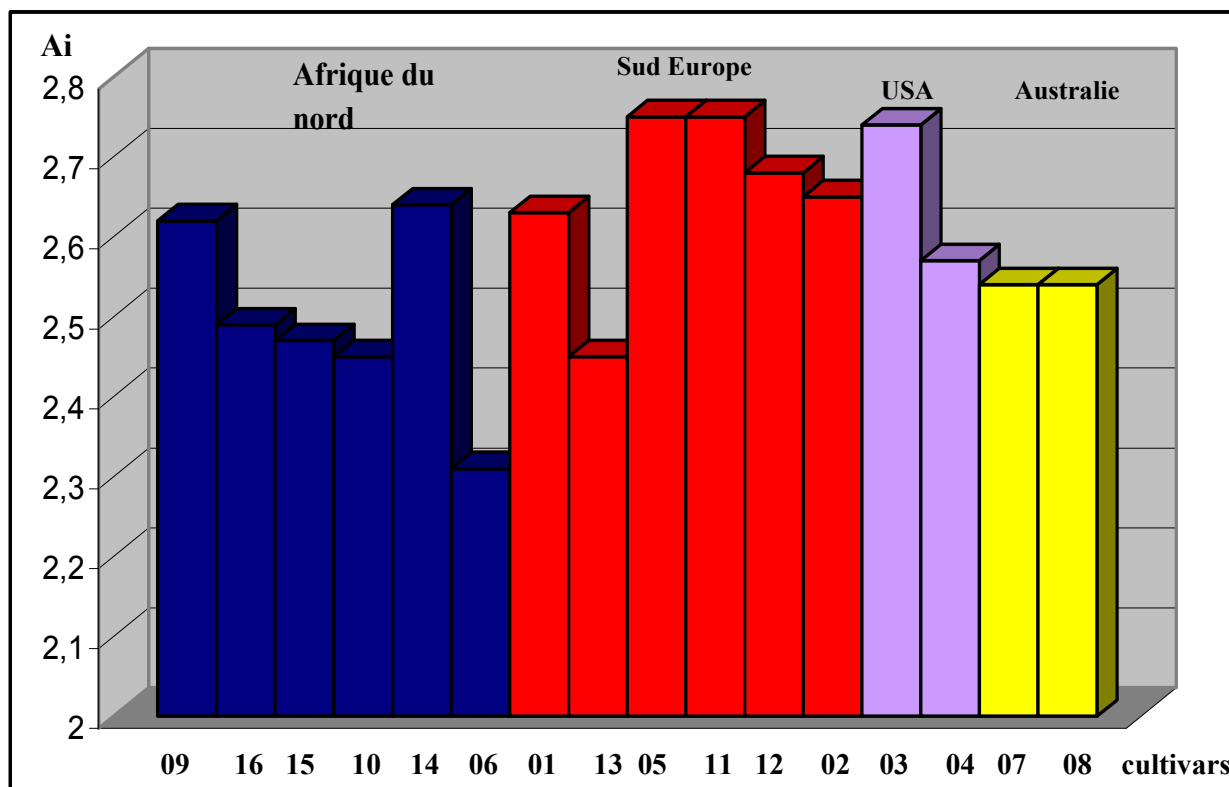
à 3 pour **MTIC451**. Cette variation indique une large diversité génétique à l'intérieur des 16 cultivars de luzerne.

Pour le nombre d'allèles par individus ( $A_i$ ), il varie de **2.45** pour les cultivars (**Gabes** et **Coussouls**) à **2.75** pour les cultivars (**Mamuntanas** et **Magalie**), et est de **2.58** en moyenne. Cette faible variation montre ainsi une légère différence entre les 16 cultivars étudiés selon leurs origines (Tableau IX).

**Tableau IX:** *Origine géographique de 16 cultivars de luzerne, et l'estimation du nombre moyen d'allèles par individu ( $A_i$ ) et le la fréquence théorique d'hétérozygotie moyen ( $D$ ) pour l'ensemble des marqueurs.*

Nom des cultivars	Origine	$A_i$	$D$
<b><i>Afrique du nord</i></b>			
African	Maroc	2.62	0.711
Demnat203	Maroc	2.49	0.696
Erfoud	Maroc	2.47	0.705
Gabes	Tunisie	<b>2.45</b>	0.674
Rich2	Maroc	2.64	0.719
Tamantit	Algérie	2.31	0.694
<b><i>Sud Europe</i></b>			
Ecotipo siciliano	Italie	2.63	0.721
Coussouls	France	<b>2.45</b>	<b>0.673</b>
Mamuntanas	Italie	<b>2.75</b>	<b>0.760</b>
Magali	France	<b>2.75</b>	0.735
Melissa	France	2.68	0.730
Prosementi	Italie	2.65	0.707
<b><i>Australie et USA</i></b>			
ABT805	USA	2.74	0.730
Ameristand	USA	2.57	0.710
Sardi10	Australie	2.54	0.718
Siriver	Australie	2.54	0.694

La moyenne de la diversité génétique «D» est calculée comme étant la moyenne de «He» par cultivar pour l'ensemble des marqueurs. Cette moyenne varie de **0.673** pour le cultivar d'origine française **Coussouls** à **0.760** pour le cultivar d'origine Italienne **Mamuntanas** (Tableau IX). Ce résultat montre encore une fois que la différence entre les cultivars selon leurs origines est limitée. Donc la différence entre les cultivars selon leurs origines géographiques est faible (Afrique du nord, sud Europe, Australie et USA) (Figure 14).



09: African, 16: Demnat203, 15: Erfoud, 10: Gabes, 14: Rich2, 06: Tamantit, 01: Ecotipo siciliano, 13: coussouls, 05: mamuntanas, 11: magali, 12: melissa, 02: prosementi, 03: ABT805, 04: Ameristand, 07: Sardi10, 08: siriver.

**Figure 14 :** Nombre d'allèles moyen par individus pour l'ensemble des cultivars.

A partir de résultats des deux tableaux VIII et IX ainsi que la figure 14, on peut conclure que les indices critiques de la diversité intra-cultivars (nombre d'allèles par marqueur «A», le nombre d'allèles moyen par individus «Ai» et le taux d'hétérozygotie «He») indiquent une large diversité génétique à l'intérieur des cultivars.

Le calcul du paramètre « Fis » a révélé que tous les marqueurs pour l'ensemble des cultivars sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ) à l'exception des cas suivants (Tableau X):

- FMT13 pour Tamantit ( $p < 0.05$ ).
- MTIC432 pour Ameristand et Gabes ( $p < 0.05$ ).
- B14B031 pour Tamantit et Sardi10 ( $p < 0.05$ ).
- MTIC338 pour Sardi10, Siriver, African et Erfoud ( $p < 0.05$ ).
- MTIC343 pour Melissa, Mamuntanas et Demnat203 ( $p < 0.05$ ).
- MTIC451 pour Prosementi, Ameristand, Tamantit, Mamuntanas, Erfoud et Sardi10 ( $p < 0.05$ ).

**Tableau X:** les valeurs de l'indice de Fixation «Fis» par cultivar et par marqueur moléculaire.

Cultivars	FMT13	MTIC432	B14B03	MTIC338	MTIC343	MTIC451
Ecotipo siciliano	0.162 <b>P&lt;0.005</b>	0.004 P>0.05	-0.014 P>0.05	-0.008 P>0.05	0.089 P>0.05	0.04 P>0.05
Prosementi	0.009 P>0.05	0.036 P>0.05	-0.015 P>0.05	0.169 P>0.05	-0.064 P>0.05	<b>0.063</b> <b>P&lt;0.001</b>
ABT805	0.035 P>0.05	0.022 P>0.05	-0.026 P>0.05	-0.066 P>0.05	-0.010 P>0.05	0.016 P>0.05
Ameristand	0.076 P>0.05	<b>0.094</b> <b>P&lt;0.05</b>	0.044 P>0.05	0.069 P>0.05	0.011 P>0.05	<b>0.103</b> <b>P&lt;0.001</b>
Mamuntanas	0.073 P>0.05	-0.025 P>0.05	0.014 P>0.05	0.131 <b>P&lt;0.05</b>	<b>0.138</b> <b>P&lt;0.005</b>	<b>-0.009</b> <b>P&lt;0.05</b>
Tamantit	<b>0.136</b> <b>P&lt;0.005</b>	0.017 P>0.05	<b>0.188</b> <b>P&lt;0.025</b>	0.167 P>0.05	0.124 P>0.05	<b>0.184</b> <b>P&lt;0.025</b>
Sardi10	0.043 P>0.05	0.033 P>0.05	<b>0.117</b> <b>P&lt;0.025</b>	<b>0.086</b> <b>P&lt;0.05</b>	-0.017 P>0.05	<b>0.103</b> <b>P&lt;0.001</b>
Siriver	0.048 P>0.05	-0.007 P>0.05	0.025 P>0.05	<b>0.084</b> <b>P&lt;0.05</b>	0.028 P>0.05	0.003 P>0.05
African	0.034 P>0.05	0.017 P>0.05	-0.015 P>0.05	<b>-0.05</b> <b>P&lt;0.01</b>	0.122 P>0.05	0.003 P>0.05
Gabes	0.062 P>0.05	<b>0.206</b> <b>P&lt;0.001</b>	-0.021 P>0.05	0.06 P>0.05	0.06 P>0.05	0.045 P>0.05
Magali	0.001 P>0.05	-0.016 P>0.05	-0.018 P>0.05	-0.039 P>0.05	-0.01 P>0.05	0.021 P>0.05
Melissa	0.132 P>0.05	0.019 P>0.05	-0.056 P>0.05	-0.033 P>0.05	<b>0.116</b> <b>P&lt;0.001</b>	0.045 P>0.05
Coussouls	0.089 P>0.05	0.074 P>0.05	0.000 P>0.05	0.098 P>0.05	0.031 P>0.05	0.025 P>0.05
Rich2	-0.008 P>0.05	-0.005 P>0.05	0.072 P>0.05	0.062 P>0.05	-0.008 P>0.05	0.052 P>0.05
Erfoud	0.04 P>0.05	-0.031 P>0.05	0.043 P>0.05	<b>0.187</b> <b>P&lt;0.001</b>	0.095 P>0.05	<b>0.21</b> <b>P&lt;0.001</b>
Demnat203	-0.008 P>0.05	0.066 P>0.05	0.045 P>0.05	0.062 P>0.05	<b>0.238</b> <b>P&lt;0.001</b>	0.055 P>0.05



### III.1.4 STRUCTURATION DES CULTIVARS

Les valeurs de Fst global sont voisines et significatifs pour tous les marqueurs. Elles varient de **0.01** pour **MTIC338** à **0.026** pour **FMT13**. Le Fst global pour l'ensemble des marqueurs est de 0.016. Toutes ces valeurs sont significatives (Tableau XI).

**Tableau XI** : les valeurs de Fst global par marqueur pour l'ensemble des cultivars.

SSRs markers	Fst
FMT13	<b>0.0257*</b>
MTIC343	0.0215*
MTIC451	0.0141*
B14B03	0.0111*
MTIC338	<b>0.0103*</b>
MTIC432	0.0130*
L'ensemble des marqueurs	<b>0.0161*</b>

Niveau de signification : \*  $p < 0.05$  (significatif), \*\*  $p < 0.01$  (très significatif), \*\*\*  $p < 0.001$  (très hautement significatif).

Dans le tableau XII, le Fst entre des couples de cultivars pour l'ensemble des marqueurs à été calculé, ce paramètre varie de **0** pour le couple **Sardi10 et African** à **0.049** pour le couple **ABT805 et Gabes**.

Les valeurs du Fst pour chaque marqueur microsatellite sont représentées en annexe 5.

**Tableau XII :** *Valeurs de  $F_{st}$  par paires de cultivars pour l'ensemble de marqueurs.*

Les différents résultats du Fst par cultivar, ont permis d'établir une classification hiérarchique (dendrogramme) des cultivars selon la méthode Unweighted Pair Group Method using arithmetic average (UPGMA). Cette représentation a pour but d'obtenir une représentation schématique simple qui permet de visualiser des entités en groupes homogènes, chaque groupe étant bien différencié des autres (Figure 15).

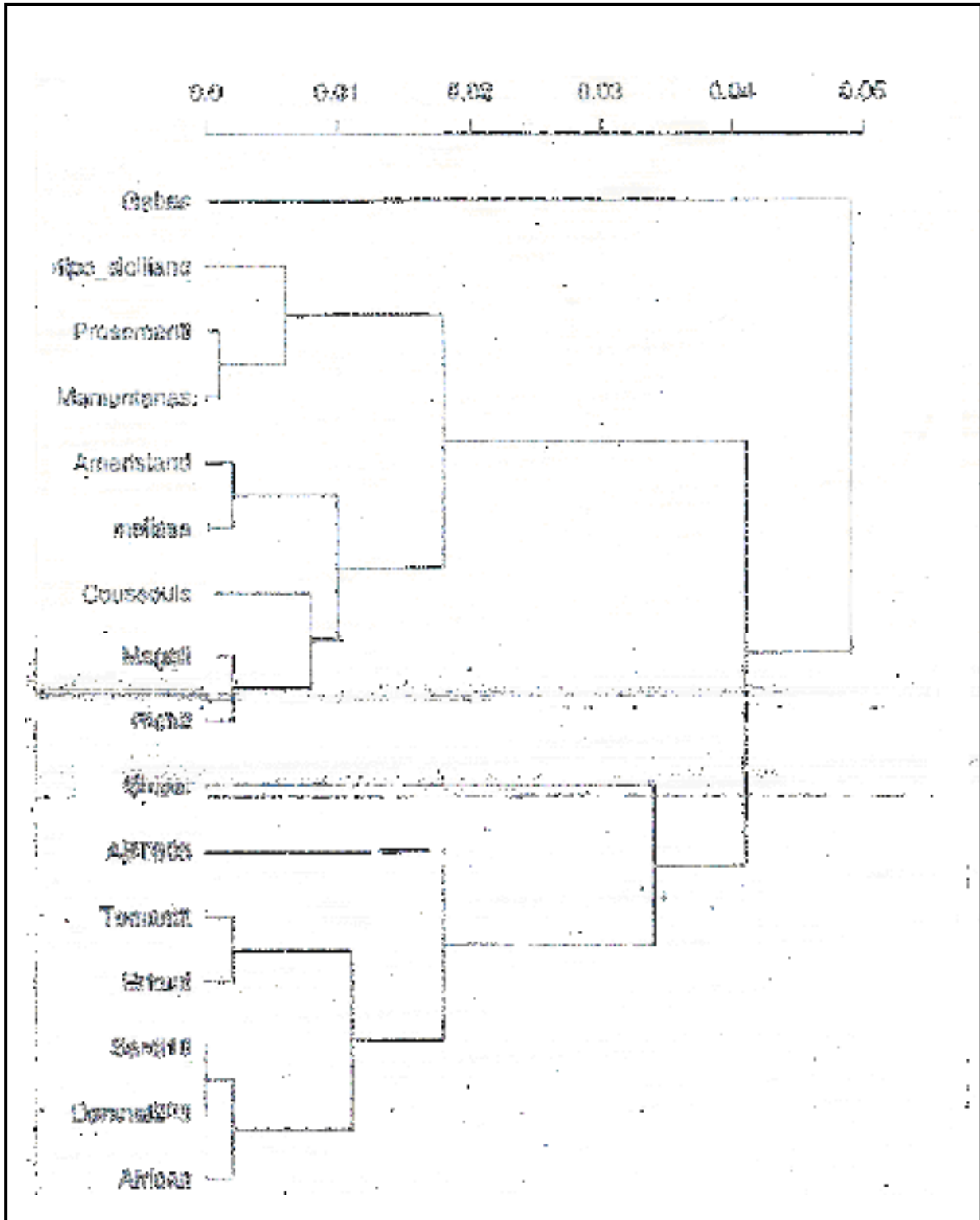


Figure 15 : Classification des cultivars en groupes.

Trois groupes ont été identifiés: un composé uniquement par le cultivar Gabes, le deuxième groupe est composé par les cultivars: Ecotipo Siciliano, Prosementi, Mamuntanas, Ameristand, Melissa, Coussouls, Magali, Rich2 et le troisième groupe est composé des cultivars suivants: Siriver, ABT805, Tamantit, Erfoud, Sardi10, Demnat203 et African.

Le deuxième groupe contient l'ensemble des cultivars du sud de l'Europe mais aussi un cultivar d'origine marocaine et un américaine. Le troisième groupe est représenté par quatre cultivars de l'Afrique du nord, les deux cultivars d'origine australiennes et un cultivar d'origine américaine.

### **III.2 DISCUSSION**

Un grand nombre d'allèles a été révélé (147), comme précédemment observées dans d'autres études sur la luzerne par l'utilisation des marqueurs microsatellites (Diwan et al., 1997 ; Mengoni et al., 2000). Le nombre d'allèles par locus qu'était en moyenne de 2.48, était approximativement le même pour chaque cultivar.

La diversité intra-cultivars est mesurée par le nombre d'allèles moyen par individus ( $A_i$ ) et le taux d'hétérozygotie «He»), il était élevé pour chaque cultivar, ce résultat indique une large diversité génétique à l'intérieur des 16 cultivars étudiés.

Le calcul de la moyenne de la diversité génétique «D» par cultivar pour l'ensemble des marqueurs a montré que la différence entre les cultivars selon leurs origines était limitée. Donc la différence entre les cultivars selon leurs origines géographiques était faible (Afrique du nord, sud Europe, Australie et USA).

Le calcul du paramètre «Fis» a révélé que tous les marqueurs pour l'ensemble des cultivars étaient à l'équilibre de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ) à l'exception de quelques cas.

Les différents résultats du Fst, ont permis d'établir une classification hiérarchique (dendrogramme) des cultivars. Cette représentation a pour but d'obtenir une représentation schématique simple qui permet de visualiser des entités en groupes homogènes, chaque groupe étant bien différencié des autres.

Trois groupes ont été identifiés: un composé uniquement par le cultivar Gabes, le deuxième groupe est composé par les cultivars: Ecotipo Siciliano, Prosementi, Mamuntanas,

Ameristand, Melissa, Coussouls, Magali, Rich2 et le troisième groupe est composé de Siriver, ABT805, Tamantit, Erfoud, Sardi10, Demnat203 et African.

Le deuxième groupe contient l'ensemble des cultivars du sud de l'Europe mais aussi un cultivar d'origine marocaine et un d'origine américaine. Le troisième groupe est représenté par quatre cultivars de l'Afrique du nord, les deux cultivars d'origine australiennes et un cultivar d'origine américaine.

Cette structure ne correspond pas aux groupes formés au début de notre étude selon l'origine géographique des cultivars, des auteurs ont montré que l'origine géographique d'un matériel végétale est suffisant pour donner une structuration en groupes (Barnes *et al.*, 1977 ; Biroul, 1989 et Julier, 1995).

Cependant les cultivars du sud de l'Europe tendent à se séparer de celles de l'Afrique du nord. Parmi les cultivars de l'Afrique du nord, Gabes est la plus différente, elle forme un groupe distinct. Les deux cultivars d'origine australienne (Sardi10 et Siriver) et le cultivar d'origine américaine ABT805 peut être originaire des ressources génétiques de l'Afrique du nord. Contrairement au cultivar d'origine américaine Ameristand qui peut être originaire des ressources génétiques de l'Europe.

On a observé donc une large diversité génétique à l'intérieur des cultivars de luzerne méditerranéenne. Cette situation pourrait être expliquée par l'arrivage de plusieurs gènes appartenant à d'autres variétés (par des échanges de graines ou des flux de pollen). En faite, la biologie reproductrice (allogamie) et la génétique (autotétraploïdie) favorisent l'entretien de la grande diversité à l'intérieur des cultivars. Cependant, les traits agronomiques différencient les cultivars méditerranéennes entre eux (Flajoulot *et al.*, 2008).

On a observé une différenciation entre les cultivars du nord et le sud du bassin méditerranéen avec les marqueurs microsatellites. Ceci pourrait être lié à une légère modification du matériel génétique par l'amélioration traditionnelle et moderne.

## **Conclusion**

Les résultats de notre étude ont montré une grande diversité génétique à l'intérieur des différents cultivars (African, Demnat203, Erfoud, Gabes, Rich2, Tamantit, Ecotipo siciliano, coussouls, mamuntanas, magali, melissa, prosementi, ABT805, Ameristand, Sardi10 et siriver) étudiés, issues de diverses origines (France, Italie, Tunisie, Algérie, Maroc, Australie et USA). Elles confirment aussi, dans ce cadre-là, le grand intérêt des marqueurs moléculaires microsatellites SSRs dans l'analyse de la diversité génétique. En effet, cette technique a permis un bon regroupement des accessions étudiées. L'utilisation de cette technologie sur un large éventail de populations de Luzerne algériennes présente un intérêt certain dans l'orientation ultérieure des prospections et collectes du matériel génétique local, également dans le but d'accélérer le processus de son amélioration génétique. Enfin l'exploitation de la diversité génétique chez nos ressources végétales d'une manière générale est primordiale à faire pour assuré la sécurité alimentaire de notre payé.

## **I. 1. LES CULTURES FOURRAGERES EN ALGERIE : SITUATION ACTUELLE ET PERSPECTIVES**

En Algérie, la surface agricole utile (SAU) est de 8.414.670 ha (MADR-DSASI, 2007), soit 3,5% de la superficie totale du pays, ce qui constitue une part très faible devant une démographie sans cesse croissante, le déficit fourrager est par conséquent chronique et l'alimentation du cheptel repose essentiellement sur les ressources fourragères et pastorales provenant des milieux naturels (parcours, maquis, jachères). Les cultures fourragères semées occupent une superficie très réduite et les espèces comme la fétuque, le dactyle et le ray-grass sont presque inexistantes (Abdelguerfi et Laouar, 2009), ce déficit s'aggrave progressivement, passant de 24% à 38% des besoins (Chehat, 2001), il est encore plus important en années sèches et impose le recours aux importations aussi bien d'aliments concentrés que de produits d'origine animale.

Le potentiel fourrager existant est structuré autour de quatre ensembles, d'inégale importance, les parcours, les jachères, les prairies naturelles et les fourrages cultivés. Selon Issolah 2008, Les superficies réservées aux pacages et parcours sont les plus importantes. De plus, elles ont augmenté de 1.185.225 ha en 10 ans. En effet, elles sont passées de 31.652.000 ha en 1998 à 32.837.225 ha en 2007 (Tableau 1), soit 97,8% de la surface agricole utile du pays. Les superficies réservées aux fourrages naturels composés de prairies naturelles et de jachères fauchées sont passées de 163.000 ha en 1998 à 227.761 ha en 2007 (0,67% de la SAU, dont 11,2% de prairies naturelles), avec des productions respectives de 2.411.440 Qx et 4.992.330 Qx.

Par contre, les superficies réservées aux cultures fourragères (sec + vert) ont nettement régressé. Elles sont passées de 42.060 ha en 1998 à 25.462 ha en 2007, pour ne représenter que 1,46 % de la SAU, sachant que Les superficies réservées aux fourrages artificiels en sec (1,19% de la SAU) sont environ quatre fois plus importantes que celles consacrées aux fourrages artificiels en vert (0,07% de la SAU). Pour sa part, la production a chuté de 30.295 Qx en passant de 635.860 Qx en 1998 à 605.565 Qx en 2007.

L'évolution des superficies est irrégulière, toutefois, la production a pratiquement doublé entre 1998 et 2007.

D'une manière générale, les cultures fourragères classiques ont augmenté en même temps que l'accroissement du cheptel, mais d'une façon moins rapide. La vesce-avoine, l'avoine et l'orge sont cultivées, récoltées et conservées de façon telle qu'il s'agit le plus

souvent de fourrages grossiers. Ils constituent des ressources très importantes utilisées en vert (pâturages et/ou fauche) ou en conserve (foin rarement ensilage), ce sont les cultures fourragères les plus dominantes.

Les légumineuses constituent aussi une ressource assez importante. En hiver comme au printemps, le bersim constitue la seule ressource fourragère verte pour le bovin laitier. Il est relayé en été par la luzerne pérenne et le sorgho ou le sudan-grass dans certaines régions (Abdelguerfi et *al.*, 2008). Le maïs fourrager est rarement utilisé, sauf dans les rares endroits où l'eau ne constitue pas un facteur limitant. Le sorgho fourrager est la culture estivale la plus pratiquée compte tenu de sa résistance à la sécheresse. La luzerne joue aussi un rôle non négligeable particulièrement dans les oasis (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laouar, 1999).

Les méthodes de conservation restent très limitées. Actuellement rares sont les agriculteurs qui pratiquent l'ensilage, l'unique méthode de conservation reste le fanage. Cette technique est très mal menée, donnant généralement un foin de mauvaise qualité, faute de synchronisation des espèces en association, des problèmes liés aux techniques de cultures surtout lors de la mise en place et de la mauvaise organisation du chantier de fanage.

Concernant le bilan fourrager national, il enregistre un déficit de 4 milliards d'unités fourragères (UF). Au niveau des différentes zones agro-écologiques, le déficit fourrager est plus apparent au niveau de la zone montagneuse (37%) et celle du Tell (25%). Ceci s'explique par le fait que la plupart des superficies agricoles au niveau de ces deux zones sont utiles, les surfaces consacrées aux fourrages demeurent faibles (concurrence de cultures plus lucratives) par rapport à l'importance de l'élevage notamment le bovin. L'utilisation des concentrés règle en partie le déficit fourrager (Si Ziani et Boulberhane, 2001).

Une analyse de la balance fourragère pour l'année 2001 a permis de mettre en exergue la persistance d'un déficit fourrager estimé à 22 %. Mais cette moyenne recèle des disparités régionales importantes. En effet, l'analyse selon les diverses zones agro écologiques montre que les déficits sont beaucoup plus prononcés dans les zones littorales, steppiques et sahariennes pour des taux respectifs de 58 %, 32 % et 29 %.

Cette situation découle de ce que la production et la culture des fourrages en Algérie reste, à bien des égards, une activité marginale des exploitations agricoles. En effet, la



proportion des terres réservées aux cultures fourragères, exploitées de manière extensive au demeurant, reste faible puisqu'elle ne représentait en 2001 que 1% des superficies fourragères globales. Le caractère extensif de la production fourragère est attesté par la prépondérance de la vesce avoine utilisée dans la majorité des cas en tant que foin dans l'alimentation du bétail notamment dans les zones à pluviométrie réduite.

**Tableau I:** Evolution des superficies des pacages et parcours sur dix ans (1998-2007) en Algérie (MADR - DSASI, 1998 - 2007).

Années	Superficies (ha)
1998	31652000
1999	31503820
2000	31794320
2001	31914760
2002	31624770
2003	31635240
2004	32824410
2005	32821550
2006	32776670
2007	32837225

## I.2. PRESENTATION DES LEGUMINEUSES

Les légumineuses occupent une place très importante parmi les espèces spontanées fourragères composant la flore algérienne. Cette famille est très diverse avec 3 sous familles: Mimosoideae, Caesalpinioideae et Papilionoideae et compte environ 20.000 espèces (Sachidanandam *et al.*, 2001). La sous famille des Papilionoideae regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement: le soja (*Glycine max*,  $2n = 4x = 40$ ), le haricot (*Phaseolus vulgaris*,  $2n = 2x = 22$ ), le pois (*Pisum sativum*,  $2n = 2x = 14$ ), la luzerne (*Medicago sativa*,  $2n = 4x = 32$ ), l'arachide (*Arachis hypogaea*,  $2n = 4x = 40$ ), le pois chiche (*Cicer arietinum*,  $2n = 2x = 16$ ), et la fève (*Vicia faba*,  $2n = 2x = 16$ ). Ces légumineuses

cultivées forment deux groupes appelés Galegoïdes et Phaseoloïdes, à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Meuriot, 2004).

Les légumineuses sont cultivées principalement comme source de protéines pour la consommation humaine (haricot, pois, fève,...) ou l'alimentation animale (soja, luzerne,...) grâce à la fixation symbiotique de l'azote. Elles sont aussi une source importante d'huiles végétales (arachide) et de bois de qualité (bois de rose, ébène).

Les légumineuses occupent la deuxième place, après les céréales, pour les terres cultivées et la production. En 2004, plus de 300 millions de tonnes de légumineuses à graines ont été produites sur une superficie de 190 millions d'hectares, soit 13% des terres cultivées.

Les légumineuses à graines constituent toujours une part importante de l'alimentation du monde, particulièrement dans les pays en développement où elles sont la principale source de protéines pour l'homme. Citons le Haricot (*Phaseolus vulgaris*) en Amérique Latine, le Pois Chiche (*Cicer arietinum*), la lentille (*Lens culinaris*) et la Fève (*Vicia faba*) dans le bassin méditerranéen, le Soja (*Glycine max*) en Asie sans oublier l'Arachide (*Arachis hypogea*) et le Pois (*Pisum sativum*) dans le monde entier (Lazrek-Ben friha, 2008).

### **I.3. PRESENTATION DE LA LUZERNE CULTIVÉE *Medicago sativa***

#### **I.3.1. Définition**

La luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.), légumineuse vivace, est une plante fourragère, herbacée qualifiée de reine des plantes fourragères. C'est une espèce cultivée, allogame, tétraploïde et pérenne. Elle fournit un fourrage riche en protéines, en éléments nutritifs, en matière azotée digestible et en vitamines (Janati, 1990 ; Chaïbi, 1995).

Selon Mauriès (1994), la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L.) est considérée comme étant l'une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde et sa culture remonterait à plus de 9000 ans sur les hauts plateaux du Caucase, en Iran et en Turquie d'où elle se serait répandue dans le monde entier. Elle est caractérisée par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, grâce à une symbiose existante entre la plante et une bactérie qui se développe dans son système racinaire.

On la cultive à peu près sous toutes les latitudes. Depuis les régions équatoriales jusqu'aux abords du cercle arctique. Elle trouve cependant son plus grand développement dans les zones tempérées chaudes: Etats-Unis, Europe, Amérique du Sud, Asie, Japon, Australie, Nouvelle-zélande, Afrique du Nord et Argentine (Mauriés, 1993).

On croit qu'elle a évolué à l'état sauvage, dans une zone ayant un climat fortement continental caractérisé par des hivers froids, des étés brefs, secs et chauds, des printemps tardifs ; quant aux sols, leur  $p^H$  est presque neutre ; ils sont bien drainés et les sous-sols ont une teneur élevée en calcium (Mauriés, 1993). Il est admis dans le monde que la luzerne possède la capacité de fournir de 100 à 200 kg/ha d'azote utilisables par les cultures de rente qui lui succèdent, comme le coton, le maïs et le blé. En Californie, elle est capable de subvenir entièrement aux besoins en fertilisants de la plupart des sols plantés ensuite en coton et d'en améliorer la structure, si bien que le rendement en fibres de coton s'accroît de 10 à 15% (Marble, 1993).

On notera, parmi les nombreuses qualités de la luzerne, celles les plus importantes, à savoir :

- Son potentiel de production de matière fraîche et sèche élevé,
- Son potentiel de production en protéines (1500 à plus de 2000kg de protéines /ha),
- Sa résistance à la sécheresse,
- Sa résistance aux fortes chaleurs,
- Sa pérennité (elle peut occuper le sol de 3 à 8 années) (Bouaboub-Mossab, 2001),
- Elle n'exige pas de fertilisation azotée,
- Elle enrichie le sol en azote.

### I.3.2. *Systématique*

La Luzerne pérenne, légumineuse fourragère appartenant à la famille des Fabacées, souvent appelée Papilionacées, au genre *Medicago*, et à l'espèce *sativa* (Chaabena, 2001).

- **Règne:** *Plantae*.
- **Sous Règne:** *Tracheobionta*.
- **Division:** *Magnoliophyta*.

- **Classe:** *Magnoliopsida*.
- **Sous classe:** *Rosidae*.
- **Ordre:** *Fabales*.
- **Famille:** *Fabacées*.
- **Sous-Famille:** *Papilionacées*.
- **Tribu:** *Trifoliées*.
- **Genre:** *Medicago*.
- **Espèce:** *Medicago sativa* L.

Sous l'appellation luzerne, on classe deux espèces botaniques et leurs hybrides. Ces deux espèces, la luzerne commune (*Medicago sativa* L.) et *Medicago falcata* L., sont adaptées à des conditions écologiques différentes. Elles sont interfertiles et leurs croisements ont donné naissance à une très large gamme d'hybrides (Mauriés, 1993).

Plus on s'éloigne des régions chaudes en se rapprochant des régions tempérées plus froides, plus les caractères *falcata* prennent le dessus sur les caractères *sativa* dans les populations de luzerne (Mauriés, 1993).

### **I.3.3. Situation de la luzerne en Algérie**

En Algérie, La luzerne occupe une superficie très réduite au niveau des cultures fourragères. Par contre, dans les régions sahariennes, elle constitue la première culture fourragère et occupe la place la plus importante (Chaabena *et al.*, 2006). Cette espèce est très utilisée dans l'alimentation du cheptel du Sahara. Un travail sur le comportement et la caractérisation de quelques populations de luzerne (*Medicago sativa* L.) dans la région de Ouargla (le sud de l'Algérie) a été réalisé par Chaabena (2001).

Pour la période entre 1995 et 1997, la superficie consacrée à la luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.), représente entre 0,37 et 0,71% de la superficie réservée aux cultures fourragères ; par rapport aux cultures herbacées sa superficie représente entre 1,86 et 3,03% pour la même période.

#### I.3.4. *Origine et dispersion:*

Selon les travaux de Nikolay Ivanovitch VAVILOV (1887-1943), un botaniste et agronome Russe, nous pouvons dire que la luzerne est originaire d'une zone délimitée par l'Asie Mineure, la Transcaucasie, l'Iran et les hauts plateaux du Turkménistan. Aujourd'hui, ce vaste territoire est partagé entre la Turquie, la Syrie, l'Irak, l'Iran, l'Afghanistan, le Pakistan et le Cachemire (Demol *et al.*, 2002).

Dans la région du Proche-Orient et dans tout le nord-ouest de la Perse (Médie), la culture de la luzerne est plus que millénaire. Elle fut cultivée de bonne heure dans ces pays. La luzerne était utilisée comme fourrage en Turquie, il y a plus de 3000 ans (Bolton *et al.*, 1972).

Au IV<sup>e</sup> siècle avant J.-C., plusieurs philosophes grecs décrivaient comment la luzerne avait été introduite en Grèce par les armées mèdes (Perses), qui en nourrissaient les chevaux de trait de leurs chariots et les autres animaux. La luzerne se tailla ainsi rapidement une place importante dans l'agriculture grecque. Au II<sup>e</sup> siècle avant J.-C., les Romains héritèrent de la luzerne; la nouvelle culture prospéra et s'étendit rapidement dans toute l'Italie d'où elle gagna par la suite le reste de l'Europe (Bolton, 1962).

Au même moment où elle atteignait l'Italie, la luzerne entamait sa marche vers l'est. Il faut dire aussi que les Chinois recueillaient au II<sup>e</sup> siècle avant J.-C. des semences de luzerne iranienne, qui constituait le principal fourrage dont se nourrissaient leurs chevaux (Bolton *et al.*, 1972). La luzerne a également atteint les oasis d'Afrique du Nord (Figure 01). Les Arabes ont donc introduit la luzerne en Afrique du Nord et de là, elle est passée à la Péninsule Ibérique (Bolton *et al.*, 1972).

D'autre part, les Arabes désignèrent la luzerne sous le nom d'*alfalfa* (*alfalfa* est le superlatif d'*alfa*, qui signifie « fourrage »). Les espagnols de leur côté continuent d'appliquer à la luzerne ce nom d'*alfalfa* emprunté aux Maures.

En France, la luzerne, apparue vers 1550, fut d'abord appelée *sainfoin*. Ce nom a été transposé depuis à une autre légumineuse fourragère. Soudainement se manifestent *luyserne* en 1581 et *luzerne* en 1600; sans aucun doute, ces termes sont en rapport avec le provençal

*luzerno* et le patois méridional *laouzerdo*, probablement aussi avec le catalan *userdas* (Guyot et Gibassier, 1967).

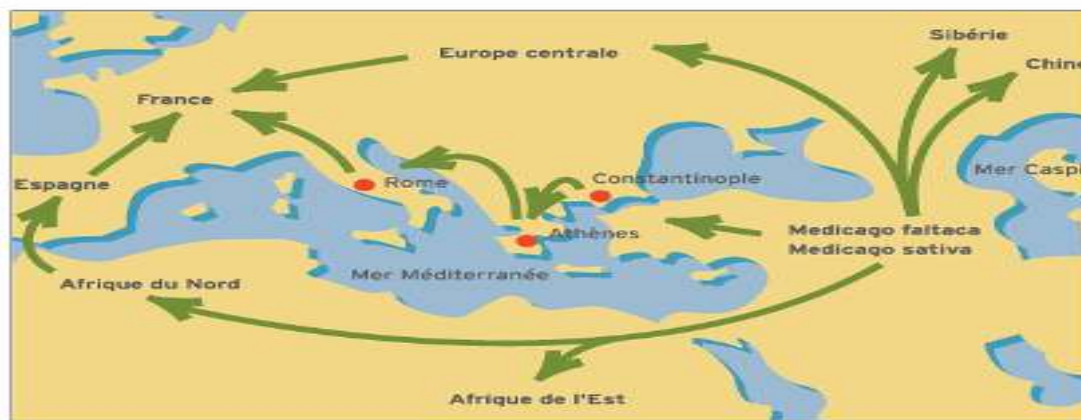


Figure 01: *Dissémination de la luzerne dans le monde.*

### 1.3.5. Développement et croissance de la luzerne

En bonnes conditions, la luzerne germe et se lève parfaitement en 8 à 12 jours. Sa germination est épigée; la première feuille n'est pas composée (feuille cotylédonaire). On distingue plusieurs stades successifs chez une plante telle que la luzerne:

**Le stade végétatif** ; quand la luzerne n'a que des tiges et des feuilles.

**Le stade bouton** ; quand les boutons floraux apparaissent.

**Le stade floraison**; quand les boutons s'ouvrent ; ultérieurement, viennent

**Les stades de formation et le stade maturation des graines** (Villax, 1963).

La figure 02 montre en détail les phases de croissance de la luzerne.

Par ailleurs, le développement des parties aériennes de la plante est plus important que celui des racines pendant la période qui suit la germination, puis la croissance s'équilibre à l'époque de la floraison tandis qu'à la maturité, se sont les racines qui l'emportent (Bouaboub-Mossab, 2001).

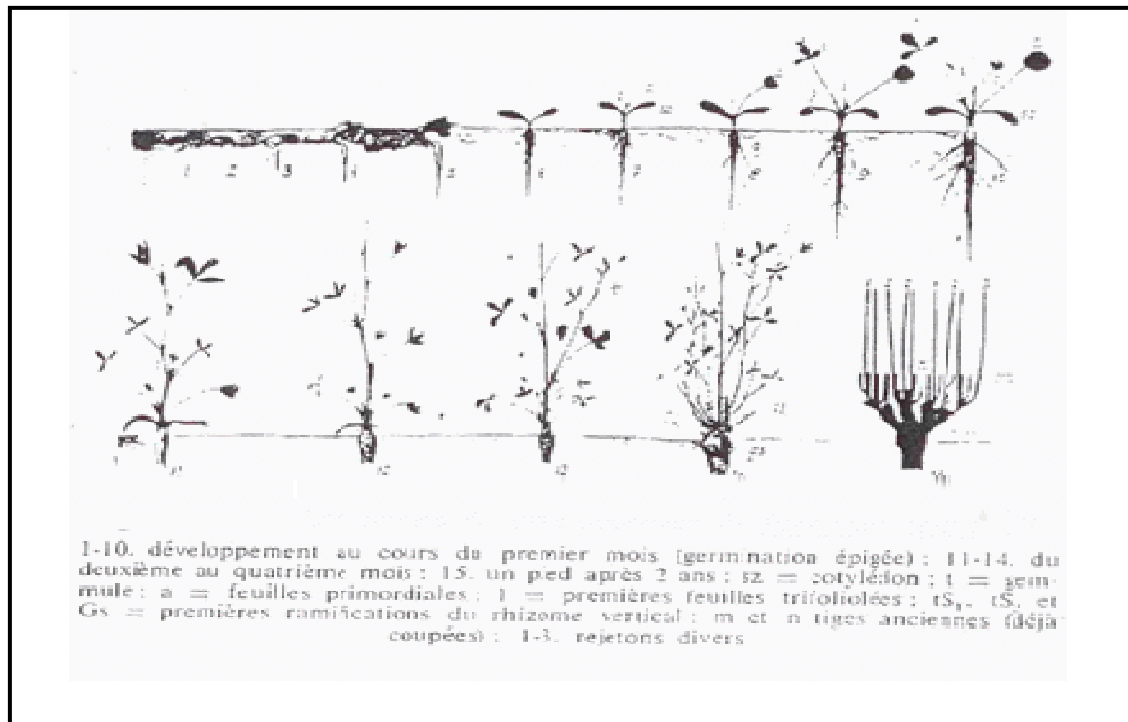


Figure 2: Les phases du développement de *Medicago sativa* L.

(Bouaboub-Mossab, 2001).

### I.3.6. Caractéristiques de la luzerne

#### I.3.6.1. Caractéristiques morphologiques:

Il existe une très grande variabilité génétique dans la morphologie et l'anatomie des différentes populations de luzerne (Tableau II).

Tableau II: la morphologie de deux variétés de Luzerne : *Medicago sativa* et *Medicago fatcata*.

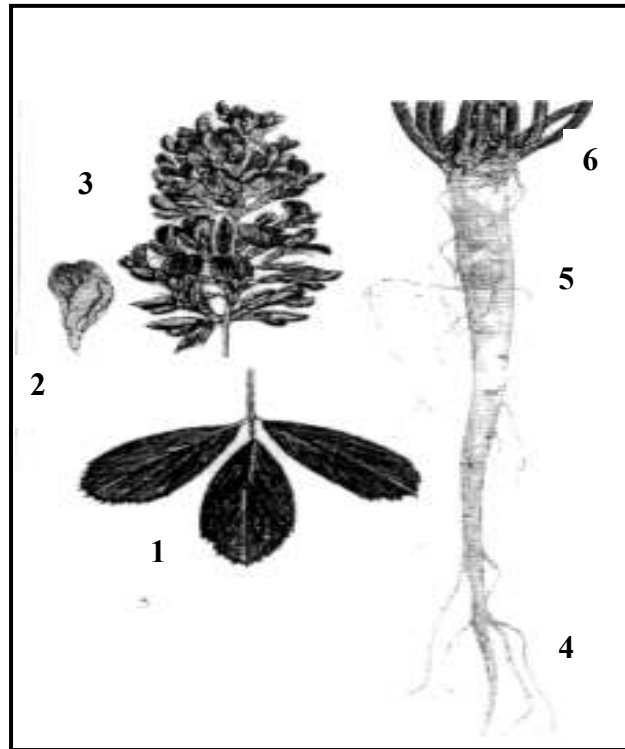
Espèces	Racines	Ports	Tiges	Folioles	Fleurs	gousses	Graines
<i>M.sativa</i>	pivotantes	Dressé	Fortes	Ovoïdes	violettes	Spiralés	Reiniformes
<i>M.fatcata</i>	fasciculés	Etalé	Fines	Etroites	Jaunes	Incurvées ou en faucilles	Arrondies

La luzerne cultivée est une plante à tiges dressées et ascendantes, très ramifiées, pouvant atteindre plus de 90 cm de haut. Le développement des tiges suit un ordre précis, on distingue des tiges primaires, secondaires et tertiaires. La structure et la composition des tiges sont modifiées par la température. Les feuilles sont trifoliées, pétiolées, dentées, et mucronnées au sommet.

La racine pivotante, en sol profond et bien drainé, descend habituellement à 2 m de profondeur. On voit nettement la partie supérieure de la racine de la luzerne, son fort pivot et les grosses racines secondaires. On note aussi, partant de la partie souterraine du collet, de nombreuses tiges de remplacement encore sans feuilles, cette particularité lui permet d'atteindre et d'utiliser sans concurrences, les éléments nutritifs et l'eau situés dans les couches profondes du sol (figure 03). Ces racines portent de petites excroissances isolées ou en grappes, se sont des nodosités ovoïdes ou d'aspect globuleux, dont la taille ne dépasse pas 2 ou 3 mm (figure 04).

La fécondation est allogame. Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en forme de faucille pour *Medicago falcata*, soit spiralée (1 à 4 spires) pour *Medicago sativa*, la graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 2.5 mm.





**Figure 03. Morphologie de la Luzerne; 1: feuilles trifoliés, 2: fleurs, 3: inflorescence, 4: racines latérales, 5: pivot, 6: collet (Whyte et al., 1953).**



**Figure 04 : Racine de luzerne avec chapelet particulièrement dense de nodules (Meuriot, 2004).**

#### **I.3.6.2. Caractéristiques physiologiques:**

La germination de la luzerne dépend de plusieurs facteurs: la disponibilité en eau, la température et la lumière. La présence de sel diminue la germination des graines de luzerne. La germination se produit entre 2 et 40°C, avec un optimum situé entre 19 et 25°C. L'année

du semis, le nombre de tiges passe en moyenne de 2-4 à 6-6,5 avec quatre cycles de récolte. L'année suivante, 5 à 8 tiges sont produites par chaque pied. Le nombre de tiges par pied augmente lorsque la population diminue. Le nombre de bourgeons et de tiges est réduit par le stress hydrique (Mauriés, 1993).

La luzerne possède une bonne aptitude à résister à des conditions sèches ou froides. Cette résistance nécessite néanmoins que la plante puisse reconstituer régulièrement ses réserves racinaires. Les températures élevées peuvent réduire la croissance, le rendement et la pérennité. Le froid limite son adaptation à cause de la destruction des plantes pendant l'hiver. La dormance est l'état de plante pendant lequel les activités physiologiques associées à la croissance sont stoppées. Mais de façon réversible. Une meilleure résistance au stress est associée aux phénomènes de dormance, les plantes étant moins riches en eau avec une activité respiratoire limitée (Sfarni, 2005).

### **I.3.7. Intérêt de la Luzerne**

En général, il ne faut pas évaluer la luzerne uniquement sur la production de fourrage mais intégrer également ses apports positifs pour le sol et les cultures suivantes.

#### **I.3.7.1. Intérêt agronomique:**

La luzerne pérenne a un effet positif sur la structure du sol, par un système racinaire très développé et un pivot qui peut descendre très profondément, favorisant ainsi l'alimentation en eau de la plante. Les racines améliorent aussi la structure du sol, notamment en profondeur. La décomposition de ces racines porteuses de nodosités, riches en protéines, permet de fournir un reliquat d'azote susceptible d'être utilisé pour la culture suivante (100 Unités par hectare pour une luzerne de 03 ans).

#### **I.3.7.2. Intérêts zootechniques:**

La luzerne se caractérise par une teneur protéique élevée et une teneur énergétique moyenne. Elle fournit des quantités de matières azotées élevées par hectare (en moyenne 10 tonnes de matière sèche donnent 02 tonnes de protéines). En fait, tout agriculteur-éleveur doit avoir le souci de produire une grande quantité de fourrage de qualité. En moyenne sur 3 ou 4 ans, une luzernière bien installée est capable de donner 70 à 120 tonnes de fourrage vert, ou encore 12 à 18 tonnes de foin par hectare. Cette capacité élevée de production, se double d'une richesse en protéines supérieure à celle des autres fourrages, un bon foin de luzerne

contient 120 à 180 g de matière azotée digestible par kilogramme de matière sèche (Bouchetata, 1969).

### **I.3.7.3. Intérêts économiques:**

L'introduction de la luzerne dans une exploitation influence l'ensemble du système et c'est à cette échelle du système qu'il faut raisonner son intérêt économique. Les écarts qui peuvent être observés sur les coûts de culture et de récolte sont à relativiser en fonction de la part occupée par la luzerne dans le système fourrager et des rendements obtenus pour les différents fourrages. C'est donc plutôt le niveau et la régularité de son rendement qui conditionnent son intérêt économique, d'après différentes études on estime que le rendement de la luzerne doit être supérieur de 2 à 3 tonnes (en moyenne par année) à celui du maïs (Anonyme, 1991).

## **I.4. LA GENOMIQUE VEGETALE**

Le terme «génomique» a été créé en 1986 par Thomas Roderick. C'est une discipline scientifique récente. La génomique s'attache à l'étude simultanée de l'ensemble des gènes d'un organisme vivant pour comprendre le fonctionnement des plantes et l'évolution des espèces. Elle contribue à mieux évaluer la diversité génétique et donc à mieux la gérer (Anonyme 2001).

La génomique est divisée en deux grands domaines: la génomique structurale, qui concerne la nature physique du génome entier jusqu'à son séquençage complet et la génomique fonctionnelle qui caractérise le transcriptome (l'ensemble des transcrits produits par un organisme donné) et le protéome (l'ensemble des protéines codées par le génome) (Griffiths *et al.*, 2006).

### **I.4.1. Notion d'allèle et de gène**

Chaque molécule d'ADN correspond à une succession linéaire de gènes codant la synthèse des protéines enzymatiques ou de structure, des régions contrôlant l'activité de ces gènes et d'autres régions dont on ne connaît pas exactement le rôle. Un gène correspond à une succession de quelques centaines ou quelques milliers de paires de bases appariées. 1500 à 2500 pb (Figure 05) constituent une taille moyenne d'un gène chez un végétal comme *Arabidopsis thaliana* (Tourte, 2002).

Chaque gène comprend fondamentalement quatre régions: un promoteur, une séquence codante, un terminateur, des séquences de régulation (Tourte, 2002).

Si le gène gouverne la réalisation d'un caractère, on sait depuis Mendel qu'un même gène peut exister sous plusieurs formes appelées allèles ; ainsi, dans une cellule diploïde, les deux chromosomes homologues contiennent au même emplacement (locus) deux allèles homologues qui assurent la même fonction (Rossignol *et al.*, 2000). Dans notre étude sur la luzerne cultivée (*Medicago sativa*), on parle d'une plante Tétraploïde ( $2n = 4x = 32$ ), les quatre chromosomes homologues contiennent pour un locus donnée (un gène ou un marqueur moléculaire) à quatre allèles (Figure 06).

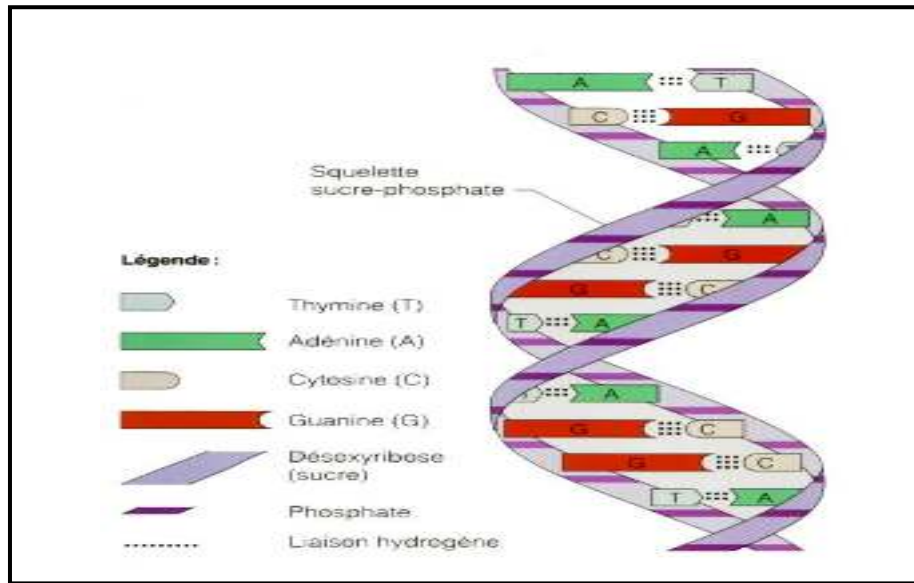


Figure 05 : Représentation de l'acide désoxyribonucléique ADN.

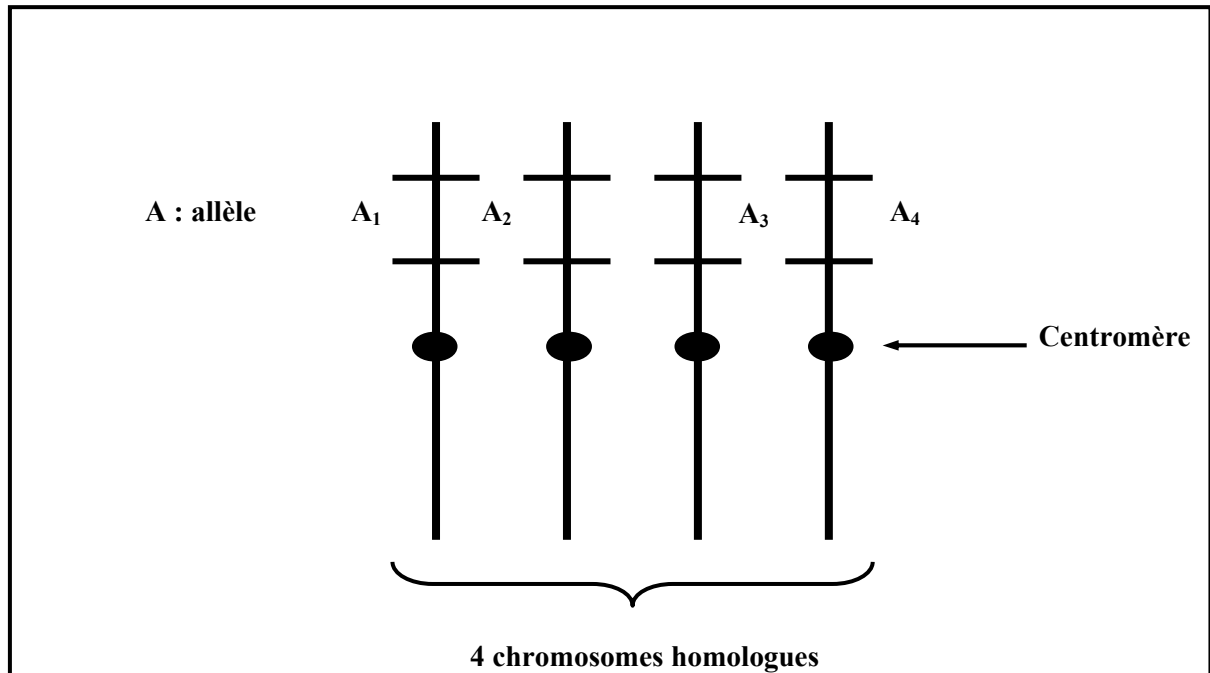


Figure 06 : Situation de quatre allèles d'un gène sur une plante tétraploïde (Tourte, 2002).

## I.5. LE POLYMORPHISME GENETIQUE

Le polymorphisme génétique naturel résulte de l'accumulation des mutations qui se sont produites au cours des générations. Il s'agit souvent de mutations silencieuses qui ne modifient pas l'expression (Falque et Santoni, 2004).

Il existe d'un individu à l'autre dans une population, des variations au niveau des séquences de l'ADN, ces variations nucléotidiques peuvent être dans les régions codantes conduisant à une variation au niveau du phénotype, et elles peuvent survenir dans des régions non codantes de l'ADN (régions intergéniques ou introns). Le polymorphisme de l'ADN codant présente un très grand intérêt en génétique, et son étude trouve des applications dans les domaines fondamentaux (par exemple, la Cartographie du génome) et les programmes de sélection assistées par les marqueurs moléculaires (Falque et Santoni, 2004).

Les polymorphismes représentent aujourd'hui l'intérêt de plusieurs sujets de recherche, car ils présentent une très grande source de marqueurs moléculaires (Griffiths *et al.*, 2006).

## I.6. LES MARQUEURS GENETIQUES

### I.6.1. Définition:

Tout caractère qui distingue deux individus, deux races ou deux variétés est un marqueur. L'important est que ce marqueur révèle une différence que l'on puisse suivre la trace chez les descendants (Moinet, 1990).

Un marqueur génétique ou un locus marqueur est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Ceci permet une utilisation en génétique des populations (De Vienne et Santoni, 1998). Se sont des caractéristiques de l'organisme (physiologiques, morphologiques, et moléculaires) héréditaires, transmissibles d'une génération à une autre et qui montre une ségrégation mendélienne (Casasoli, 2004).

Un bon marqueur génétique «idéal» est:

- Polymorphe: possédant de nombreux allèles permettant de caractériser les différents individus;
- Multiallélique;
- Codominant: l'hétérozygote présente simultanément les caractères de deux parents homozygotes; il peut donc être distingué de chacun des homozygotes parentaux.

- Non épistasique: son génotype peut être lu à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus;
- Neutre: ses différents allèles ne doivent pas avoir d'effet sur l'individu;
- Insensible au milieu: le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu (De Vienne et Santoni, 1998).

### **I.6.2. Classification:**

Les marqueurs génétiques sont divisés essentiellement en trois catégories, ils sont apparus successivement comme suit (Rossignol *et al.*, 2000):

- Les marqueurs morphologiques (ou phénotypiques);
- Les marqueurs biochimiques;
- Les marqueurs moléculaires, directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN.

Les marqueurs morphologiques sont peu polymorphes, en général dominants, ils interfèrent avec d'autres caractères et peuvent être influencés par le milieu. (De Vienne et Santoni, 1998). En revanche, les marqueurs biochimiques et moléculaires ont, pour la plus part, tous les critères d'un bon locus marqueur.

Dans le domaine de la génomique et en biotechnologies, les marqueurs génétiques les plus utilisés sont les marqueurs moléculaires et qui feront l'objet de notre étude.

#### ***I.6.2.1. Les marqueurs morphologiques (ou phénotypiques)***

Les marqueurs phénotypiques ont été les premiers marqueurs utilisés. Ils correspondent au caractère morphologique de la plante, par exemple: longueur des tiges, surface foliaire, initiation de la floraison (Cui *et al.*, 2001; Gomez *et al.*, 2004).

Ces caractères sont utilisés de même pour estimer la variation intra- et interpopulations. Ils sont généralement limités en nombre de caractères relevés et directement influencés par l'environnement. Néanmoins, ils fournissent des informations utiles pour décrire et identifier le matériel biologique (Andersson *et al.*, 2006).

L'observation de ces marqueurs se fait à tous les stades de croissance de la plante, et généralement sur un grand nombre d'individus. Mais la plupart des marqueurs phénotypiques présentent un bon nombre d'inconvénients et deviennent difficiles à utiliser. Le phénotype peut varier suivant le stade physiologique de la plante et il est peu informatif dans le cas d'une sélection précoce (Adam et Dron, 1993). Leur inconvénient le plus désagréable, c'est qu'ils sont influencés par des facteurs environnementaux.

#### ***1.6.2.2. Les marqueurs biochimiques***

Les marqueurs biochimiques correspondent à des différences décelables au niveau des protéines qui sont décelées par des différences de leur vitesse de migration électrophorétique. Ils résultent de mutations qui touchent la phase codante d'un gène et entraînent un changement de la séquence d'acides aminés de la protéine codée par celui-ci (Rossignol *et al.*, 2000). Cependant, le nombre de systèmes isoenzymatiques capables d'être analysés est faible. L'activité enzymatique est dans certains cas liée aux conditions environnementales, au phénotype ou au stade de développement de la plante.

Les marqueurs biochimiques ont l'inconvénient d'être lourds et difficiles à manipuler, de même qu'ils présentent une reproductibilité assez faible. Comme les marqueurs morphologiques, ils sont très sensibles à l'environnement (*Lazrek-ben friha, 2008*).

#### ***1.6.2.3. Les marqueurs moléculaires***

Un marqueur moléculaire est un fragment d'ADN dans le génome de l'organisme, correspondant à un locus, pour le quelle il existe du polymorphisme. Ces variations permettent d'identifier et de suivre les différentes formes alléliques de ce marqueur au cours des générations (Rossignol *et al.*, 2000).

Les marqueurs d'ADN sont utiles pour la recherche de base (par exemple, l'analyse phylogénétique et la recherche de gènes utiles) et pour la recherche appliquée (par exemple, la sélection assistée par marqueurs, les tests de paternité et la traçabilité alimentaire).

Contrairement aux marqueurs associés à des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou biochimiques, les marqueurs moléculaires révèlent directement les modifications du patrimoine génétique qu'ils se traduisent ou non par une modification phénotypique, physiologique ou biochimique. Ces marqueurs moléculaires sont donc des indicateurs neutres de variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre



famille, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus. (Mhiri et Grandbastien, 2004).

La majorité des stratégies de marquage moléculaire détecte des mutations ponctuelles de la séquence d'ADN (comme par exemple les techniques AFLP «Amplified fragment length polymorphism», RFLP: «Restriction fragment length polymorphism» ou SNP «Single nucleotide polymorphism», ou bien des modifications du nombre de copies de motifs répétés très courts de type microsatellites. Une troisième catégorie de modifications du patrimoine génétique est liée à la présence et à l'activité des éléments transposables (Mhiri et Grandbastien, 2004).

Selon Falque et Santoni (2004), les marqueurs moléculaires sont classés à l'aide de critères techniques fondés sur les méthodes analytiques utilisées, ou de critères génétiques fondés sur la qualité de l'information générée par ces marqueurs. Les deux aspects sont importants pour choisir la technique la mieux adaptée à un programme de génomique donné, compte tenu de l'information recherchée et des contraintes techniques ou budgétaires du laboratoire.

D'un point de vue génétique, nous considérerons que le terme de marqueurs est synonyme de «locus marqueur», c'est-à-dire qui renseigne sur une position unique du génome, on parle alors de marqueurs dominant ou de marqueurs codominant.

D'un point de vue technique (pratique), du fait de l'importance du nombre d'échantillons généralement analysés dans les programmes de génomique (par exemple : la cartographie génétique), le débit d'analyse (nombre d'analyses réalisées par unité de temps) est un facteur capital. Ainsi recherche-t-on de plus en plus fréquemment des techniques de génotypage à haut débit, pour lesquelles la rapidité de l'analyse, les possibilités d'automatisation et le coût en consommables sont des éléments déterminants.

De nombreuses techniques de marquage moléculaire sont aujourd'hui disponibles, et de nouvelles sont régulièrement publiées (Gupta *et al.*, 2001). Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories :

**a) Les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism):**

La technique RFLP développée par Botstein *et al.*(1980) repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Une multitude de fragments d'ADN de tailles variables est générée par digestion enzymatique, puis séparée sur gel d'agarose et transférée par capillarité sous forme dénaturée sur une membrane de nylon. Cette membrane est mise en contact avec une solution contenant un fragment d'ADN ou sonde qui permet de repérer, par hybridation moléculaire, des fragments d'ADN génomique qui lui sont homologues. La différence entre deux génotypes est révélée par autoradiographie si la sonde est marquée par le phosphore radioactif ou par réaction colorée si elle est associée à un conjugué enzymatique. Le polymorphisme détecté est dû à des mutations au niveau des sites de restriction de l'enzyme (polymorphisme de site de restriction) et/ou à des délétions/insertions d'un fragment d'ADN au voisinage de la zone génomique reconnue par la sonde. C'est le couple enzyme/sonde qui constitue le marqueur.

Bien que cette technique soit co-dominante et permette une analyse génétique complète, elle est lente et laborieuse. Les étapes de transfert et d'hybridation empêchent une automatisation du travail.

**b) Les marqueurs moléculaires basés sur l'utilisation de la méthode PCR****(Polymerase Chain Reaction) :**

Le développement de la technique 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, iso-enzymatiques et RFLP) et deviennent très nombreux. Les plus largement utilisés sont les microsatellites ou **SSR** (Simple Sequence Repeat); l'**AFLP** (Amplified Fragment Length Polymorphism) et la **RAPD** (Randomly Amplified Polymorphic DNA).

### **Principe de la PCR**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification de l'ADN en plusieurs milliers d'exemplaire. Elle consiste en la répétition (en général de 20 à 45 fois) d'un cycle PCR, dans un appareil appelé «thermocycleur» dont les montées et descentes en température sont programmables, ainsi que le nombre de cycle (Bertheau *et al.*, 1993).

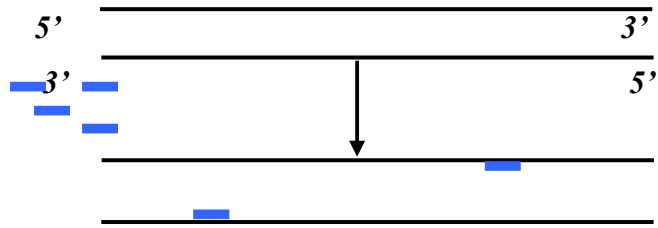
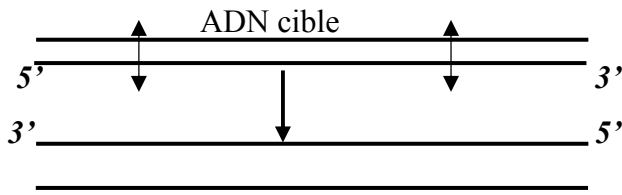
Un cycle d'amplification ou (cycle PCR) comprend trois étapes (Figure 07):

- Une étape de dénaturation thermique de l'ADN double brin à 95°C qui sépare les deux chaînes complémentaires pour l'obtention de deux brins d'ADN monocaténaire;
- Une étape d'appariement ou d'hybridation de ces brins d'ADN monocaténaire avec les deux oligonucléotides (amorces), dont la séquence nucléotidique est complémentaire des extrémités de la cible. Cette étape s'effectue à une température spécifique pour chaque réaction PCR, elle a une relation directe avec les deux oligonucléotides utilisés, elle varie de 50 à 60°C.
- Une étape d'élongation par l'ADN polymérase ou (la Taq polymérase). L'ADN est une enzyme thermostable ou thermorésistante (résiste à de très grande température) d'origine bactérienne, elle provient d'une bactérie appelée *Thermus aquaticus* vivant dans des milieux chauds. Sa température optimale d'action est de 72°C. Elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C. Cette enzyme utilise pour la synthèse d'un nouveau brin complémentaire de l'ADN monocaténaire et des désoxyribonucléotides Triphosphate (dNTP) qui sont les éléments de base utilisés par la Taq polymérase et elle nécessite pour cela quatre dNTP qui sont comme suit ; dATP (désoxyribose adénine triphosphate), dTTP (désoxyribose thymine triphosphate), dGTP (désoxyribose guanine triphosphate), dCTP (désoxyribose cytosine triphosphate) (Bertheau *et al.*, 1993).

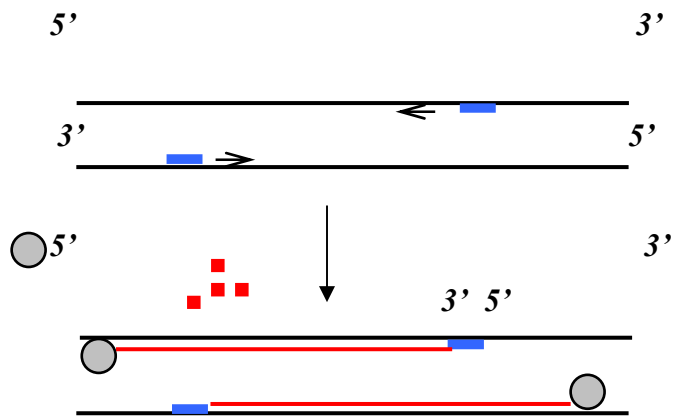
Le mélange réactionnel est ensuite chauffé de nouveau pour séparer les brins originaux des brins nouvellement synthétisés. Tous sont en suite disponibles pour un nouveau cycle d'hybridation des amorces de synthèse d'ADN, puis de séparation des brins.

Chaque cycle aboutit théoriquement au doublement de la quantité d'ADN cible initialement présente dans la solution.

Dénaturation 95°C



Etape 2: Hybridation 55°C



Etape 3: Elongation 72°C

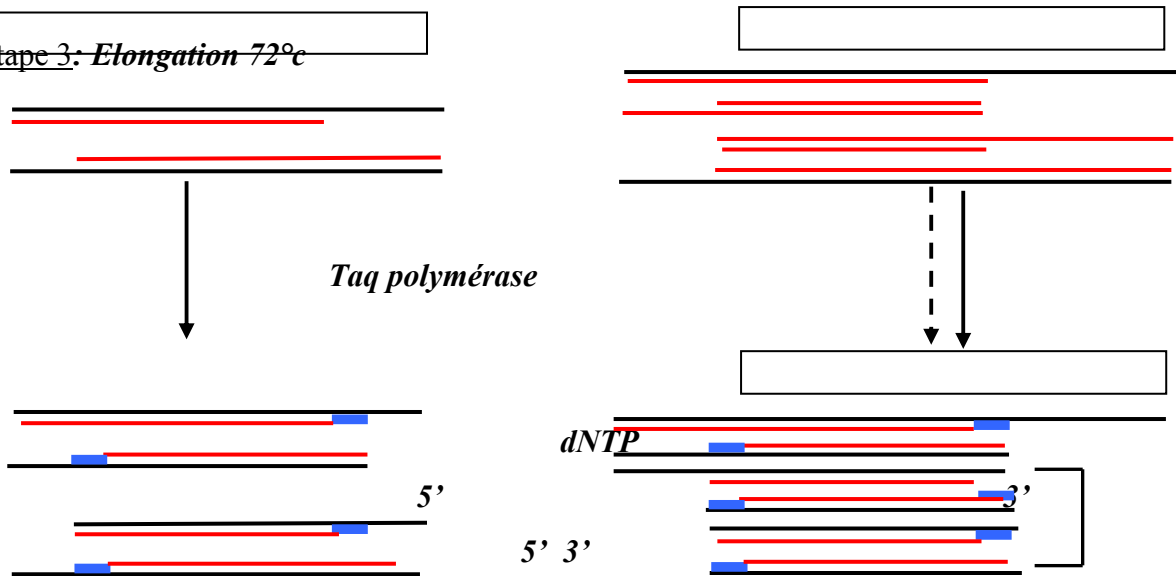


Figure 07 : Principe de la PCR « Polymerase Chain Reaction » ( Marty, 2001).

**b1) Les marqueurs RAPD**

La technique RAPD consiste en l'amplification par PCR de fragments de l'ADN génomique en utilisant des amorces arbitraires de taille courte (10 pb). Les produits d'amplification sont généralement visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (Williams *et al.*, 1990).

**b2) Les marqueurs AFLP**

La technique AFLP est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de sites de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires. Cette technique utilise à la fois les enzymes de restriction et l'amplification PCR (Vos *et al.*, 1995).

**b3) Les marqueurs microsatellites (SSR)**

Dans les études sur la diversité génétique, les marqueurs les plus fréquemment utilisés sont les microsatellites. Les microsatellites ou SSR (répétitions de séquences simples) ou STR (séquences répétées en tandem) sont des séquences d'ADN constitués de mono, di, tri ou tétranucléotides répétées en tandem (par ex. CACACACACA), Les plus courants sont (A)<sub>n</sub> (TC)<sub>n</sub> (TAT)<sub>n</sub> (GATA)<sub>n</sub>. La valeur de n peut aller de quelques unités à plusieurs dizaines (Figure 08).

Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce. Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt des microsatellites en génétique, réside dans leur taux de polymorphisme extrêmement élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. En effet, si un motif microsatellite donné n'est pas spécifique d'un locus, les régions flanquantes, par contre, le sont. Une paire d'amorces spécifiques de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul locus microsatellite (Figure 09).

Les marqueurs microsatellites fournissent des marqueurs de choix par leur abondance, leur reproductibilité élevée et la détection à un niveau multiallèlique de loci (Toshihiko et Momotaz, 2004).

Chez les végétaux supérieurs, on estime qu'il y aurait en moyenne un microsatellite tous les 30 à 100 kb.

Les principales contraintes des SSRs, en tant que marqueurs moléculaires, sont l'effort et le coût exigé pour leur développement. Pour cette raison leur utilisation a été limitée à quelques espèces importantes sur le plan agricole. Mais leurs développements à partir de banques génomiques, d'EST (Expressed sequence tag) et d'autres séquences d'ADN, ainsi que l'évolution de la bioinformatique ont considérablement réduit les coûts de développement de ces marqueurs SSRs.

En résumé, les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus, co-dominants et sont utilisés généralement pour la cartographie, la détection de QTL (Quantitative Trait Loci) et les études de diversité tandis que les marqueurs RAPD et AFLP sont dominants, non spécifiques de locus et servent essentiellement à la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène d'intérêt en vue de son clonage (Tableau III) (Devienne *et al.*, 1998).

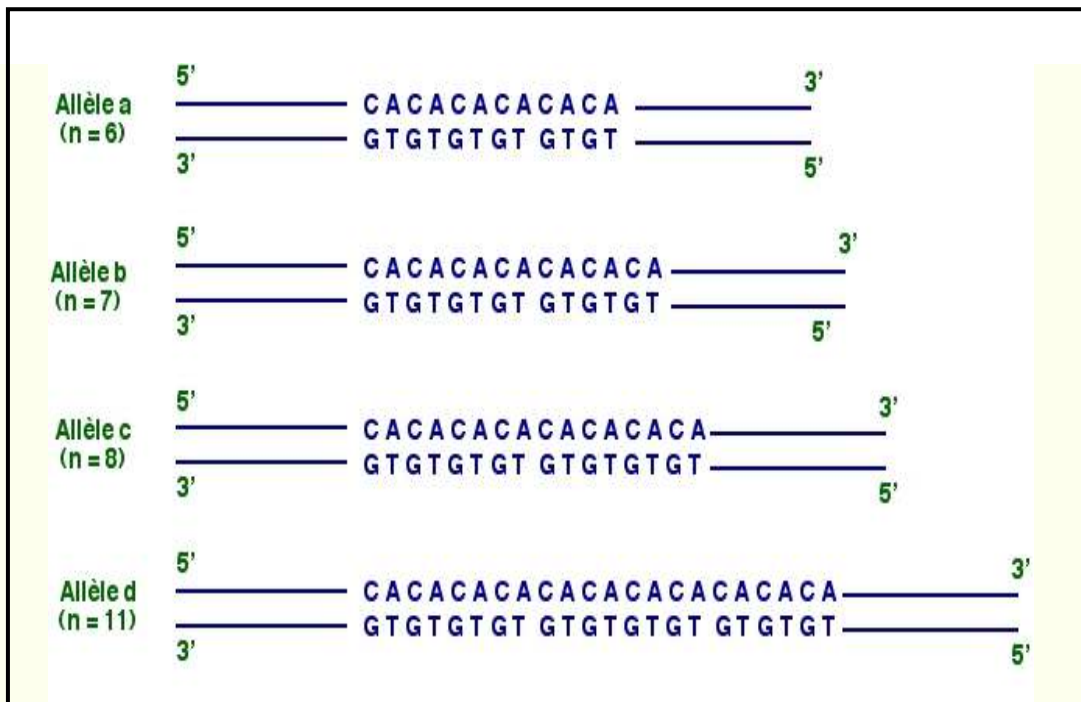


Figure 08: Séquence microsatellite avec répétition du motif (CA).

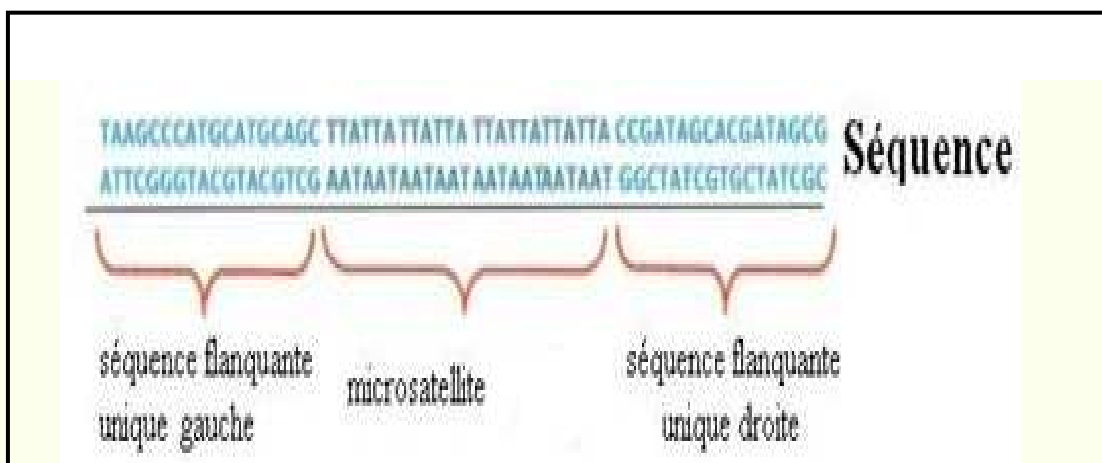


Figure 09 : Un marqueur microsatellite de motif (TA) avec les régions flanquantes.

**Tableau III:** les caractéristiques des principaux marqueurs.

Marqueurs	Neutralité	Nombre	Codominance	Spécificité de locus <sup>(1)</sup>	Polymorphisme	Stade Organe <sup>(2)</sup>	Technicité	Séquence codante
<b>Morphologique</b>	Non	Limité	Rare	Oui	Faible	Oui	Faible	-
<b>Isozymes (Biochimique)</b>	Oui	≤30	Oui	Oui	Faible	Oui	Faible	oui
<b>Protéines (2D) (Biochimique)</b>	Oui	≤100	Oui	Oui	Faible	Oui	Moyenne	Oui
<b>RFLP</b>	Oui	Illimité	Oui	Oui	Elevé	Non	Elevé	Oui ou non
<b>Microsatellites</b>	Oui	Quelques milliers	Oui	Oui	Très élevé	Non	Elevé <sup>(3)</sup>	non
<b>MAAP</b>	Oui	Illimité	Non	Non	Très élevé	Non	Faible	non
<b>ISSR</b>	Oui	Illimité	Non évalué	Non	Très élevé	Non	Faible	Non
<b>AFLP</b>	Oui	Illimité	Non	Non	Très élevé	Non	Moyenne	Oui ou non
<b>STS</b>	Oui	Limité	Oui	Oui	Modéré	Non	Elevée <sup>(1)</sup>	Oui

(Source: **De vienne et al.,1998**).

- (1) Dans cette colonne, on distingue les techniques qui révèlent les locus marqueurs individuellement (ou en très petit nombre) de celles qui les révèlent en masse.
- (2) Marqueurs dont la mise en évidence est attachée à un ou quelques stades-organes.
- (3) Pour les microsatellites et les STS, le développement d'amorces pour de nombreux locus informatifs est très lourd techniquement et financièrement, mais ensuite les analyses de routine se font beaucoup plus rapidement qu'en RFLP.



## I.7 LA DIVERSITE GENETIQUE

La diversité génétique désigne la variation des gènes et des génotypes entre espèces (diversité interspécifique) et au sein de chaque espèce (diversité intraspécifique). La diversité génétique est en réalité une forme de biodiversité. Elle correspond à la totalité de l'information génétique contenue dans les gènes de tous les animaux, végétaux et micro-organismes qui habitent la terre. Au sein d'une espèce, la diversité permet l'adaptation au changement de l'environnement, du climat ou des méthodes de culture ou à la présence de ravageurs et de maladies. La variabilité génétique des populations naturelles est la condition première de leur survie à long terme, puisque elle dépend de leur capacité d'adaptation à des conditions changeantes.

Le maintien de la diversité génétique des plantes est une nécessité pour assurer la sécurité alimentaire. Elle permet aux plantes de s'adapter aux modifications de l'environnement, aux changements climatiques en particulier, de résister aux parasites et aux nouvelles maladies.

Il existe deux types de diversité génétique; la diversité qualitative et la diversité quantitative. Le premier type de diversité est d'origine purement intrinsèque aux organismes, il correspond à des variations phénotypiques discontinues qui ne peuvent être influencées par le milieu : il est à l'origine de la différence qui existe entre les genres et les espèces.

Le second type de diversité est d'origine intrinsèque mais influençable par le milieu. Ce type de diversité correspond à des variations phénotypiques continues. Par exemple au sein de la même espèce, il existe des variations continues entre les individus selon le milieu dans lequel ils vivent. Sur la base de cette définition, la diversité génétique apparaît comme l'élément fondamental de la biodiversité (Abdelguerfi et Abdelguerfi-Laour, 2004).

Les informations obtenues au niveau phénotypique sont souvent difficiles à interpréter, car, il s'agit de variations continues où de nombreux gènes peuvent y être impliqués. Les marqueurs génétiques dont l'expression est indépendante de l'environnement sont utilisés pour caractériser les populations et évaluer leur diversité génétique aux niveaux intra- et inter-populations.

## I.8 ESPECES, CULTIVARS, VARIETTES ET POPULATIONS

*Un cultivar* est un terme générique définissant le matériel végétal issu de sélection (variétés, population, clone,... etc).

*Une espèce* regroupe les plantes ayant de fortes similitudes de formes et de caractères et pouvant se reproduire entre-elles naturellement. *Une espèce* est l'unité fondamentale de la classification, consistant en une population (ou une série de populations) d'organismes étroitement apparentés et similaires. Chez les organismes se reproduisant sexuellement, l'espèce est définie de façon plus rigoureuse par le concept biologique de l'espèce: il s'agit alors d'une population ou d'une série de populations d'organismes qui se croisent entre eux sans difficultés dans les conditions naturelles, mais non avec les membres des autres espèces.

Les espèces cultivées se composent de *variétés* sélectionnées par l'homme, qui sont distinctes, homogènes, stables et reproductibles: lignées pures et hybrides F1. Les variétés hybrides F1 sont obtenues par le croisement de deux lignées pures. Une variété est composée d'un ensemble de populations.

*Une population* est souvent définie comme un ensemble de plantes de la même espèce, de même niveau de ploïdie, de même mode de reproduction et occupant le même habitat. Les populations très étendues géographiquement peuvent être découpées par l'échantillonnage en *sous-populations*. La définition de la population reste complexe. C'est souvent un *échantillon* dont l'expérimentateur définira selon la manière dont il est constitué.

Le polymorphisme génétique d'une population représente la réserve de variabilité nécessaire qui permet à la population de s'adapter à de nouvelles conditions du milieu. La variabilité génétique reste, donc, le garant de la colonisation d'habitats marginaux par les espèces polymorphes.

## GLOSSAIRE

**Accession:** Plante ou graine ou population ou autre type de matériel génétique maintenu au sein d'une banque de gènes ou un programme de sélection pour conservation et/ou utilisation.

**Amorce:** Une séquence courte d'oligonucléotide (simple brin) utilisée dans la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

**ARN:** l'acide ribonucléique est un acide nucléique simple brin qui est composé de trois bases sur les quatre présentes dans l'ADN (A, C et G). T est toutefois remplacée par l'uracile (U).

**ADN :** Le support chimique et la base moléculaire de l'information génétique, il est constitué d'une succession de quatre bases fondamentales appelées nucléotides.

**Allèles:** Version possible d'un locus. Le locus peut être un gène ou une séquence d'ADN non codante. Lorsque, chez différents individus, différentes formes existent à un locus donné, chacune de ces formes est un allèle.

**Allogame:** Plante à fleurs hermaphrodites avec un système d'autoincompatibilité ou à fleurs séparées sur le même individu (monoécie) ou à sexes séparés (dioécie) dont le pollen d'une plante féconde très préférentiellement les ovules d'une autre plante.

**Amplification :** Multiplication d'une portion limitée d'ADN. Cette amplification peut être géométrique c'est à dire doubler le nombre de molécules présentes à chaque cycle si deux amorces sont utilisées, ou arithmétique si une seule amorce est utilisée.

**Chromosome :** Organite de structure complexe, localisé dans le noyau de la cellule. Cet organite a une répllication autonome et renferme la fraction la plus importante du matériel génétique des cellules.

**Diversité :** La diversité génétique désigne la variation des gènes et des génotypes entre espèces (diversité interspécifique) et au sein de chaque espèce (diversité intraspécifique).

**Electrophorèse :** Séparation de molécules (protéines ou acides nucléiques), sous l'effet d'un champ électrique, en fonction de leur poids moléculaire et/ou de leur charge électrique. Dans le cas de l'ADN cette séparation se fait principalement en fonction du poids moléculaire, les molécules les plus petites étant les plus rapides. Deux types de gel sont utilisés pour l'ADN : gel d'agarose qui sépare des fragments dont la taille diffère de quelques centaines de paires de bases et le gel de polyacrylamide qui sépare deux fragments dont la taille diffère d'un seul nucléotide.

**Gène :** Un segment d'ADN situé à un endroit bien précis (locus) sur un chromosome et porteur d'une information génétique. Il peut coder une protéine ou un ARN. Il comprend la séquence codante et des séquences qui en permettent et régulent l'expression.

**Génome :** Le génome représente l'ensemble de l'information génétique présente dans une cellule.

**Génotypage :** Détermination du génotype d'un individu à un ou plusieurs sites présentant du polymorphisme.

**Génotype:** Ensemble des gènes contenus dans les cellules d'un individu.

**Génomique** : Une discipline de la biologie moderne. Elle étudie le fonctionnement d'un organisme à l'échelle du génome. Elle se divise en deux branches :

- La *génomique structurale*, qui se charge du séquençage du génome entier ;
- La *génomique fonctionnelle*, qui vise à déterminer la fonction et l'expression des gènes séquencés en caractérisant le transcriptome et le protéome.

**Locos**: Emplacement occupé par un gène sur un chromosome.

**Marqueur moléculaire** : Un marqueur moléculaire est un fragment d'ADN dans le génome de l'organisme, correspondant à des locus, pour le quelle il existe du polymorphisme.

**Microsatellite** : Courtes séquences d'ADN présentes dans le génome. Formées de la répétition d'un motif constitué de une à quatre bases, par exemple  $(GA)_n$  et utilisées comme marqueurs de fait du polymorphisme important de leur longueur.

**Phénotype** : Ensemble des caractères qu'affiche un individu. Il correspond à la réalisation du génotype (ensemble des gènes) sous l'influence de l'environnement.

**Polymorphisme génétique** : Variation entre individus dans la séquence de gènes. Ces variations qui rendent compte des différents allèles dans une population sont normales et ne sont pas pathogènes.

**Protéome** : Ensemble des protéines exprimées dans une cellule, une partie d'une cellule (membranes, organites) ou un groupe de cellules (organe, organisme, groupe d'organismes) dans des conditions données et à un moment donné.

**PCR « Polymerase Chain Reaction ou Réaction en Chaîne par Polymérase »** : C'est une technique qui permet d'amplifier *in vitro* la séquence d'acide nucléique cible, en plusieurs milliers d'exemplaires.

**Tétraploïde** : Organisme ou tissu dont les cellules contiennent quatre jeux haploïdes de chromosomes.

**Transcriptome** : Ensemble des ARN messenger (molécules servant de matrice pour la synthèse des protéines) issu de l'expression d'une partie du génome d'un tissu cellulaire ou d'un type de cellule.