

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab – Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie des Populations et Organismes
Mémoire de fin d'Etude en vue de l'Obtention du Diplôme
Master en Biologie
Option : Génomique et Biotechnologie Végétale

Thème :

**Etablissement de la relation génétique entre
trois espèces du genre *Thymus* : *Thymus
fontanesii* Boiss et Reut, *Thymus algériensis*
et *Thymus lanceolatus*, par utilisation d'un
marqueur moléculaire RAPD**

Présenté par :

M^{lle} Karaoui Fatma

Soutenu le : 29/10/2015

❖ Devant le jury :

• Mr BESSAAD A	MCB (USDB-1-)	Président
• Mme AMEDJKOUH H	MAA (USDB-1-)	Examinatrice
• Mme CHERIF H S	MCB (USDB-1-)	Promotrice
• M ^{lle} . LAALA S	MCB(CNCC)	Co-promotrice

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
01	Aspects morphologique de la plante du <i>Thymus</i>	03
02	Distribution du genre <i>Thymus</i> dans le monde	05
03	Chromosome de l'espèce <i>Thymus algériensis</i> 2n= 30	07
04	<i>Thymus fontanesii</i> Boiss. et Reut.	08
05	<i>Thymus fontanesii</i> Boiss. et Reut.	08
06	<i>Thymus algériensis</i> .	09
07	<i>Thymus algériensis</i> .	09
08	<i>Thymus lanceolatus</i> Desf.	10
09	<i>Thymus lanceolatus</i> Desf.	10
10	Polymorphisme détecté par les marqueurs RAPD	17
11	Carte géographique de Médéa se présentant les lieux de récolte de deux espèces <i>Thymus fontanesii</i> Bois et Reut et <i>Thymus lanceolatus</i> Desf.	19
12	Carte géographique de Tipaza se présentant le lieu de récolte de l'espèce <i>Thymus algériensis</i> .	19
13	Diagramme d'ordination des variables dérivées de l'ACP dans le plan de projection de des axes 1et 2.	33
14	Analyses des composantes principales (ACP) des huit écotypes selon les axes 1 et 2.	34
15	Analyses des coordonnées principales (ACoP) des huit écotypes générées à partir l'indice de Gower tracées selon les axes 1 et 2.	36
16	Dendrogramme UPGMA des marqueurs RAPD basé sur l'indice de similarité de Gower des huit écotypes de trois espèces du genre <i>Thymus</i> .	39

Liste des abréviations

ACP : Analyse des Composantes Principales

ACoP : Analyse des Coordonnées Principales

AFLP: Amplified Fragment length Polymorphism

Csa: Climat tempéré chaud avec été Sec (méditerranéen) de classe a.

CTAB: Cétyl Triméthyl Ammonium Bromure

OGM: Organismes Génétiquement Modifiés

PCR: Polymerase Chain Réaction

RAPD: Random Amplified Polymorphie DNA

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

SNP: Single Nucleotide Polymorphisme

SSR : Simple Sequence Repeat ou micro-satellites

TBE: Tampon Tris Borate

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
I	Composés chimiques du genre <i>Thymus</i>	04
II	Localisation des principales espèces du genre <i>Thymus</i> en Algérie	05
III	Propriété thérapeutique du genre <i>Thymus</i>	06
IV	Caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires	18
V	Région de récolte des différentes espèces du genre <i>Thymus</i> .	20
VI	Description géographique et climatique de région de récolte	20
VII	Composition du mélange réactionnel pour PCR/RAPD	24
VIII	Listes des amorces RAPD (DIAG-GENE)	24
IX	Les étapes de cycle d'amplification PCR/RAPD	25
X	Concentration d'ADN extrait par CTAB et le rapport 260/280	27
XI	Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPAG-02	28
XII	Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPAN-08	29
XIII	Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPD-19	30
XIV	Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPJ-08	31
XV	Bandes produites par les quatre amorces RAPD	32
XVI	Variance totale expliquée par les axes de l'ACP (Pourcentage expliqué par les axes principaux) des valeurs propres	32
XVII	Contribution des variables sur les axes principaux	33
XVIII	Valeurs propres des coordonnées sur les axes principaux	34
XIX	Valeurs propres expliquées par les axes d'ACoP	35
XX	Valeurs propres des variables sur les quatre axes	36
XXI	Indices de diversité de huit écotypes du genre <i>Thymus</i> .	37
XXII	Indice de diversité de trois espèces du genre <i>Thymus</i>	38
XXIII	Matrice de similarité des huit écotypes	39

Sommaire

Introduction	01
Partie Bibliographique	
Chapitre I : Généralités	
I. 1. Généralité sur le genre <i>Thymus</i>	03
I. 1. 1. Description botanique	03
I. 1. 2. Composition chimique	04
I. 1. 3. Distribution géographique	05
I. 1. 4. Propriétés thérapeutiques des espèces du genre <i>Thymus</i>	06
I. 1. 5. Caractéristique génétique du <i>Thymus</i>	07
I. 2. Description des espèces étudiées	08
I. 2. 1. <i>Thymus fontanesii</i> Boiss et Reut	08
I. 2. 2. <i>Thymus algériensis</i>	09
I. 2. 3. <i>Thymus lanceolatus</i> Desf.	10
Chapitre II : Diversité génétique	
II. 1. Diversité biologique	12
II. 2. Diversité génétique	12
II. 3. Analyse de la variabilité génétique	12
II. 4. Estimation de la variabilité génétique par l'utilisation des marqueurs moléculaires	12
II. 5. Mesure de la diversité génétique	13
II. 5. 1. Mesure indirecte	13
II. 5. 2. Mesure directe (diversité génétique basée sur les marqueurs à ADN)	13
II. 6. Similarité et distance génétique	14
Chapitre III : Marqueurs de biologie moléculaire	
III. 1. Marqueurs morphologiques.....	15
III. 2. Marqueurs biochimiques	15
III. 3. Marqueurs génétiques moléculaires	15
III. 4. Différents types des marqueurs moléculaires	16
III. 4. 1. Marqueurs co-dominants révélés individuellement	16
III. 4. 1. 1. Marqueur RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	16
III. 4. 1. 2. Marqueurs Microsatellites ou SSR (short Sequence Repeats).....	16
III. 4. 1. 3. Marqueurs SNP (Single Nucléotide Polymorphism)	16
III. 4. 2. Marqueurs dominants révélés en masse (marqueurs anonymes)	16

III. 4. 2. 1. Marqueurs AFLP (Amplified Fragment length Polymorphism)	16
III. 4. 2. 2. Marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphie DNA)	17
III. 5. Caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires	18

Partie Expérimentale

Chapitre I : Matériel et méthode

I. 1. Matériel	19
I. 1. 1. Matériel végétal	19
I. 2. Méthode	21
I. 2. 1. Extraction et purification de l'ADN.....	21
I. 2. 2. Quantification de l'ADN	22
I. 2. 3. Qualité d'ADN	23
I. 2. 4. Amplification d'ADN.....	23
I. 2. 5. Analyse de l'ADN amplifié.....	25
I. 2. 6. Analyse des données RAPD	25
I. 2. 7. Analyse statistiques	25

Chapitr II : Résultats et discussion

II. 1. Résultats de l'extraction de l'ADN par la méthode CTAB	27
II. 2. Résultats de la qualité de l'ADN	27
II. 3. Résultats de l'amplification de l'ADN	27
II. 3. 1. Analyse des RAPD	28
II. 3. 2. Comparaison des différents produits RAPD	32
II. 4. Analyse multi variables	32
II. 4. 1. Analyse des composantes principales ACP	32
II. 5. Analyses des coordonnées principales ACop	35
II. 6. Indices de diversité et similarité	37
II. 6. 1. Indice de diversité de huit écotypes	37
II. 6. 2. Indice de diversité de trois espèces étudiée	38
II. 6. 3. Matrice de similarité (Indice de Gower)	38
Discussion générale	41
Conclusion	44
Liste des références.....	46
Annexe 1.....	55
Annexe 2.....	57

Résumé

Le genre *Thymus* de la famille des Lamiacées est un genre qui comprend une grande variété d'espèces dont le déterminisme génétique reste difficile, en raison de l'hybridation interspécifique entre elles, la polyploïdie et les similitudes morphologiques.

L'objectif de ce travail est d'évaluer la diversité génétique entre huit écotypes appartenant aux trois espèces du genre *Thymus* (*Thymus fontanesii* Boiss et Reut, *Thymus algériensis* et *Thymus lanceolatus* Desf), par l'utilisation des marqueurs d'ADN amplifiés aléatoire « RAPD ».

L'ADN génomique a été extrait par la méthode CTAB (Cétyl Triméthyl Ammonium Bromure) et fragmenté par électrophorèse sur gel d'agarose, quatre amorces (OPJ-08, OPD-19, OPAG-02 et OPAN-08) sont utilisées pour l'amplification par la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Ces dernières ont générées 39 bandes dont 38 bandes polymorphes avec un pourcentage de 96.43% et une bande monomorphe. L'analyse de la similarité entre les huit écotypes basée sur l'indice de Gower, démontre que la distance entre ces derniers est située entre 0.066 - 0.785.

De même, les indices de diversité (indice de dominance D, indice de Simpson et indice de Shannon) et de similitude (Indice de Gower) nous ont amené à démontrer que *Thymus lanceolatus* est l'espèce dominante et que *T.algériensis* est la plus diversifiée. Par ailleurs, l'analyse des composantes principales (ACP) et celle des coordonnées principales (ACoP) ont permis de diviser les huit écotypes en trois groupes bien distincts. En outre, le dendrogramme reconstruit a confirmé les résultats de l'analyse statistique en classant les écotypes analysés en trois groupes avec présence d'un écotype de l'espèce *T. fontanesii* dans le groupe de *T. algériensis*. Les marqueurs RAPD semblent être adaptés pour déterminer le locus polymorphe et estimer la similarité génétique entre les trois espèces du genre *Thymus*.

Mots clés : *Thymus*, déterminisme génétique, RAPD, indices de diversité; indice de similitude, dendrogramme.

Abstract

The Kind *Thymus* of the family Lamiaceae is a kind which includes a wide variety of species whose genetic determinism remains difficult because of interspecific hybridization between them, polyploidy and morphological similarities.

The objective of study is to evaluate the genetic diversity of eight ecotypes belonging to three species of the kind *Thymus* (*Thymus fontanesii* Boiss and Reut, *Thymus algeriensis* and *Thymus lanceolatus* Desf), by using the markers random amplified DNA "RAPD".

The DNA genomic was extracted by the CTAB method (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) and fragmented by electrophoresis on agarose gel, four primers (CPO-08 OPD-19-OPAG 02et OPAN-08) are used for the amplification by polymerase chain reaction (PCR). These have generated 39 bands including 38 bands polymorphic with a percentage of 96.43 and a one band monomorphic. The analysis of the similarity between the eight ecotypes based index of Gower, which demonstrates the distance between them is located between 0,066 - 0,785.

In the same way, the indices of diversity (index of dominance D, index of Simpson and index of Shannon) and of similarity (Index of Gower) led us to demonstrate that *Thymus lanceolatus* is the dominant a value 0.5728 species and that *T.algériensis* is most diversified 0.7347 . In addition, the principal components analysis (PCA) and that of principal coordinates (PCoA) allowed it to divide the eight ecotypes into three groups distinct. Moreover, the reconstructed dendrogram confirmed the results of the statistical analysis by classifying the ecotypes analyzed them into three groups with the presence of an ecotype of the species *T. fontanesii* in the group of *T. algeriensis*. RAPD markers seem to be adapted to determine the polymorphic locus and estimate the similarity genetic among the three species of the kind *Thymus*.

Keywords: *Thymus*, genetic determinism, RAPD, indices of diversity; index of similarity, dendrogram.

ملخص

جنس الغدة الصعترية من العائلة الشفوية هو النوع الذي يشمل مجموعة واسعة من الأنواع التي لا يزال من الصعب تحديد الأنواع بينها بسبب التهجين ، تعدد الصيغ الصبغية والتشابه المورفولوجي الوراثي.

إن الهدف من هذه الدراسة هو تقييم التنوع الجيني للأفراد البيئية الثمانية التي تنتمي إلى ثلاثة أنواع من جنس الغدة الصعترية (الغدة الصعترية فانتانسي بوا و رو) ، (والغدة الصعترية الجريانسيس) و (الغدة الصعترية لانسيولانيس ديس)، باستخدام علامات تشعيل الحمض النووي العشوائية" أ ر أ ب د."

الحمض النووي تم إستخراجه بواسطة طريقة سيتيل ثلاثي ميثيل بروميد الأمونيوم و تم تجزأته من قبل الإلكتريكهربائي على هلام الأغاروز، 4 تشعيلات (OPJ-08 و OPAG-02, OPAN-08, OPD-19) استعملت للتضخيم من اجل تفاعل البلمرة المتسلسل, هذه الأخيرة أنتجت 39 فرق بينهم 38 فرق متعددة الأشكال بنسبة% 96.34 و فرق واحد أحادي الشكل. تحليل التشابه بين الأفراد البيئية الثمانية عن طريق مؤشر جاور أظهرت أن مسافة التشابه بين هذه الأفراد تقع بين 0.0066 – 0.785. وبالمثل، مؤشرات التنوع (مؤشر الهيمنة ه مؤشر سيمبسون و مؤشر شانون) والتشابه (مؤشر جاور) أدى إلى إثبات أن الغدة الصعترية لانسيولانيس هو النوع السائد و الغدة الصعترية الجريانسيس الأكثر تنوع. و بالإضافة إلى ذلك، فإن تحليل المكونات الأساسية و تحليل التنسيقات الأساسية يسمح بتقسيم الأفراد البيئية الثمانية إلى ثلاثة مجموعات واضحة. بالإضافة إلى ذلك، أكد تشكيل الدوندروغرام نتائج التحليل الإحصائي، بتقسيم الأفراد إلى ثلاثة مجموعات مع وجود فرد من عائلة الغدة الصعترية فانتنسي في مجموعة عائلة الغدة الصعترية الجريانسيس.

إن العلامات أ ر أ ب د تسمح بتحديد مكان التعدد الشكلي و تقدير التشابه الجيني بين الأنواع الثلاثة من جنس الغدة الصعترية.

الكلمات المفتاحية : الغدة الصعترية، الحتمية الوراثية، أ ر أ ب د، مؤشرات التنوع، مؤشر التشابه، دوندروغرام.

La diversité de l'Algérie en climats et sols lui donne une place privilégiée pour la culture et l'exploitation des plantes. Un très grand nombre de ces espèces poussent à l'état naturel et endémique, certaines se révèlent d'une grande valeur agronomique, car elles sont utilisées comme fourrage pour bétail et sous forme de plantes alimentaires, d'autres ont une application médicinale (**Amrani et al., 2006**).

Thymus est un grand genre de la famille des Lamiacées comprenant environ 215 espèces, particulièrement répandue dans la Zone méditerranéenne (**Jalas, 1971**). En Algérie, ce genre regroupe 12 espèces qui sont: *Thymus capitatus* (**L.**) **Hoffm.** et **Link.**, *Thymus fontanesii* **Boiss.** et **Reut.**, *Thymus commutatus* (**Bali.**) **Batt.**, *Thymus dreatensis* **Batt.**, *Thymus numidicus* **Poiret.**, *Thymus guyonii* de **Noé**, *Thymus lanceolatus* **Desf.**, *Thymus pallidus* **Coss.**, *Thymus glandulosus* **Lag.**, *Thymus hirtus* **Willd.**, *Thymus algeriensis* **Boiss.** et **Reut.**, *Thymus ciliatus* **Desf.** qui regroupe 3 sous-espèces qui sont: *eu-ciliatus* **Maire**, *coloratus* (**Boiss.** et **Reut.**) **Batt** et *munbyanus* (**Boiss.** et **Reut.**) **Batt.** (**Quezel et Santa, 1963**).

Il est établi que la systématique des espèces du genre *Thymus* reste difficile en raison de l'hybridation interspécifique, la polyploïdie et les similitudes morphologiques parmi les espèces (**Morales, 1996**).

Pour maintenir la diversité génétique, il est nécessaire de décrire la diversité actuelle à l'intérieur et entre les populations des différentes espèces de plantes, mais également la dynamique de cette diversité génétique, afin d'appréhender les mécanismes de son évolution (**Grivet, 2002**).

Les marqueurs moléculaires, directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'amélioration des plantes. La première est constituée par les marqueurs co dominants révélés individuellement dont les plus courants sont les marqueurs RFLP et microsatellites. La seconde famille est constituée par les marqueurs dominants et révélés « en masse ». Ils sont générés par des techniques de type RAPD ou AFLP qui permettent de réaliser facilement des empreintes génétiques. (**Sylvain et al., 2000**).

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail est de rechercher une relation génétique entre trois espèces du genre *Thymus* (*Thymus fontanesii* **Boiss** et **Reut**, *Thymus algérienssi* et *Thymus lanceolatus* **Desf**) par l'utilisation d'un marqueur moléculaire amplifié aléatoire RAPD.

Pour ce faire l'étude comportera les volets suivants :

- Rechercher la relation génétique et le polymorphisme entre les huit écotypes du genre *Thymus*.
- Détermination des groupes par l'analyse des composantes principales ACP et l'analyse des coordonnées principales ACoP de ces écotypes.
- Mettre en évidence l'éventuelle existence d'une diversité entre les espèces par le calcul des indices de diversité et recherche de la similarité.
- Etablir une classification hiérarchique entre les huit écotypes sur le dendrogramme.

I. 1. Généralités sur le genre *Thymus*

Le mot «Thym» provient du terme grec « Thymos » qui signifie « odeur ». Son parfum est agréable, fort, frais et balsamique (Padrini et Lucheroni, 1996).

I. 1. 1. Description botanique

Les thymus (*Thymus*) sont des plantes basse sous-ligneuses, pouvant atteindre 40 cm de hauteur. Ils possèdent de petites feuilles recourbées sur les bords de couleur vert- foncé, et qui sont recouvertes de poils et de glandes (appelés trichomes). Les trichomes contiennent l'huile essentielle majoritairement composée de mono terpènes. Les calices et les jeunes tiges sont aussi couverts des ces structures, bien qu'en plus faible quantité sur les tiges. Ses petites fleurs zygomorphes sont regroupées en glomérules et leur couleur varie du blanc au violet en passant par le rose (Soto *et al.* , 2006)(Fig 01).

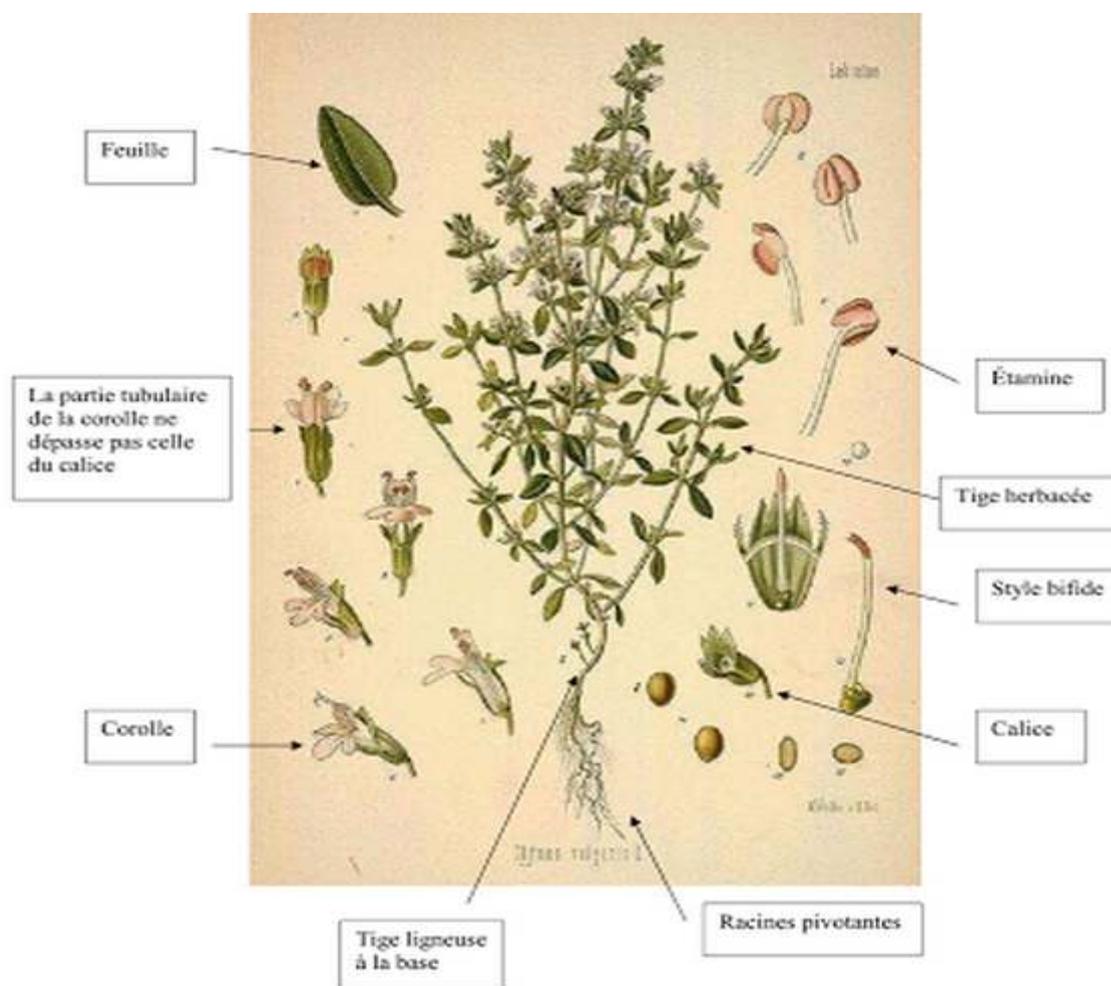


Figure 01 : Aspect morphologique de la plante du *Thymus* (Fordin, 2001)

I. 1. 2. Composition chimique

Pour la même espèce, on pourra observer, une composition chimique en huile essentielle différente, selon l'échantillon sélectionné. Il s'agit de chimiotypes ou de chémotypes ou de races chimiques ou même de variétés différentes (**Tableau I**). La variabilité chimique est d'ordre génétique, mais peut aussi dépendre de la période de récolte, des conditions climatiques, de la localisation géographique, de la nature du sol et des méthodes d'obtention (**Bruneton, 2009**)

Le thym est composé de diverses substances actives. Chaque plante de thym développe un équilibre particulier entre ces substances en fonction de l'endroit où elle pousse : nature de sol, altitude, climat,.... Certains thyms seront ainsi plus riches en thymol, d'autres en linalol, d'autres encore en géraniol...Chacune de ces substances a des propriétés santé particulières (**Alix, 2013**).

Une étude menée par **Dop et al (2006)**, sur les thyms d'Afrique du nord a démontré que le composé majoritaire était le **thymol** chez les espèces d'Algérie et du Maroc et le **carvacrol** chez les espèces de Tunisie.

Tableau I: Composés chimiques du genre *Thymus*

Composés chimiques du genre <i>Thymus</i>	
Huile essentielles	<p>Selon Thompson et Charpentier (2009), les huiles essentielles des différentes espèces du genre <i>Thymus</i> sont caractérisées par six principaux chémotypes sont répartis en 2 catégories :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Les chémotypes phénoliques (P) (structure moléculaire avec un cycle benzénique) : Thymol (T) et Carvacrol (C). - Les chémotypes non phénoliques (NP) (structure moléculaire sans cycle benzénique) : Géraniol (G), Thuyanol (U), Linalool (L) et Alpha-terpineol (A). <p>Les types γ- terpinène et ρ- cymène sont deux précurseurs de la biosynthèse végétale du thymol et du carvacrol (Garnier et al., 1961).</p>
Principes actifs	<p>*Acide phénoliques : acide caféique (Cowan, 1999), acide rosmarinique (Takeuchi et al, 2004).</p> <p>* Les flavonoïdes : hespéridine, eriotrécine, narirutine (Takeuchi et al, 2004), lutéoline (Bazytko et Strzelecka, 2007).</p> <p>* Les polyphénols : tannin (Cowan, 1999).</p>
<p>Le <i>Thym</i> frais est également riche en vitamine C, alors que le thym séché est riche en calcium, manganèse et en vitamine K (Jörg et Christof, 2004).</p>	

I. 1. 3. Distribution géographique

- Dans le monde

Il existe près de 350 espèces de thym réparties entre l'Europe, l'Asie de l'ouest et la méditerranée, c'est un genre très répandu dans le nord ouest africain (Maroc, Algérie, Tunisie et Libye), il pousse également sur les montagnes d'Ethiopie et d'Arabie du sud ouest en passant par la péninsule du Sinaï en Egypte (Mebarki, 2010). On peut le trouver également en Sibérie et même en Himalaya. Selon une étude menée par Nickavar *et al.*, (2005), environ 110 espèces différentes du genre *Thymus* se concentrent dans le bassin méditerranéen (Figure 02).

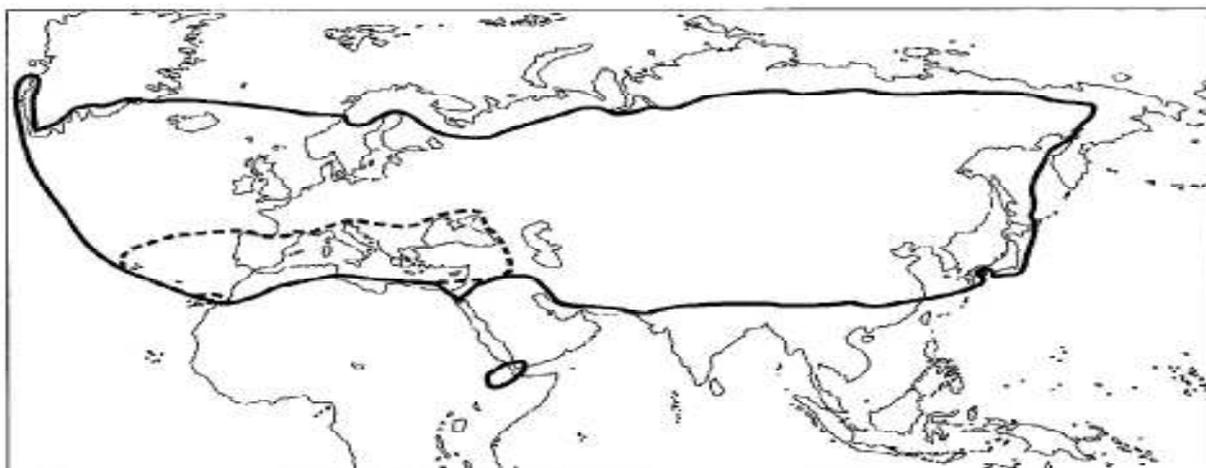


Figure 02 : Distribution du genre *Thymus* dans le monde. La ligne en pointillés représente toutes les sections (cf. classification du genre *Thymus*) excepté la section *Serpyllum* et la section *Hyphodromi* subsect. *Serpyllastrum* (Morales, 2002).

- En Algérie

Le genre *Thymus* comprend plusieurs espèces botaniques réparties sur tout le littoral et même dans les régions internes jusqu'aux zones arides (Mebarki, 2010).

En Algérie, ce genre regroupe 12 espèces qui sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau II : Localisation des principales espèces du genre *Thymus* en Algérie (Saidji, 2006).

Espèces	Découverte par	Localisation
<i>Thymus capitatus</i>	Hoffman et Link	Rare dans la région de Tlemcen
<i>Thymus fontanesii</i>	Boiss et Reuter	Commun dans le Tell Endémique Est Algérie-Tunisie
<i>Thymus commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Assez rare dans : Le sous secteur de l'atlas tellien La grande et la petite Kabylie De Skikda à la frontière tunisienne Tell constantinois

<i>Thymus guyoni</i>	Noé	Rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais et constantinois
<i>Thymus lancéolatus</i>	Desfontaine	Rare dans : le secteur de l'atlas tellien (Terni de Médéa Benchicao) et dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais (Tiaret) et constantinois
<i>Thymus pallidus</i>	Coss	Très rare dans le sous secteur de L'Atlas Saharien et constantinois
<i>Thymus hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral
<i>Thymus glandulosus</i>	Lag	Très rare dans le sous secteur des hauts plateaux algérois
<i>Thymus algériensis</i>	Boiss et Reuter	Très commun dans le sous secteur des hauts plateaux algérois, oranais
<i>Thymus munbyanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique dans le secteur Nord algérois

I. 1. 4. Propriétés thérapeutiques des espèces du genre *Thymus*

Certaines propriétés du genre *Thymus* sont présentées dans le tableau III.

Tableau III: Propriété thérapeutique du genre *Thymus* (Paul et Kamel, 2012)

Propriétés thérapeutique du Thym	
Activité antibactérienne	Des extraits des thymy comme les huiles essentielle et le thymol sont fortement antimicrobiens. Tous les chimiotypes sont actifs, mais l'activité bactéricide est plus marquée pour les types à thymol et à carvacrol.
Activité antifongique	L'huile essentielle de thym inhibe la croissance d'un certain nombre de souche fongiques dont <i>Candida albicans</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i>
Activité antivirale	Les propriétés antivirales in vitro d'un extrait de thym s'exercent à l'encontre de <i>Herpes simplex virus</i> type 1 et type 2.
Propriétés anti-oxydantes	L'acide rosamrinique présent dans des extraits de thym, l'huile essentielle, certains flavonoides(notamment la lutéoline et la 7-o-méthyl lutéoline) présentent des propriétés antioxydantes marquées.
Propriétés anti-mutagènes	Des études récentes ont montré que des extraits de thym sont antimutagènes et que la lutéoline est un antimutagène puissant vis-à-vis du carcinogène alimentaire Trp-P-2.

I. 1. 5. Caractéristique génétique du *Thymus*

• Génétique des populations du *Thymus*

Selon **Couvet *et al.*, (1985)**, Dans la plupart des populations du *Thymus*, on trouve deux types d'individus : des hermaphrodites, et des individus femelles dits " mâle-stériles " parce qu'ils ne portent pas d'étamines et donc pas de pollen. Il existe un déterminisme nucléo-cytoplasmique du sexe : des gènes mitochondriaux, transmis uniquement par les ovules, bloquent la fonction mâle des plantes ; certains gènes nucléaires restaurent la fertilité mâle. On les nomme gènes de restauration de la fertilité mâle et présentent différents allèles. La présence d'individus hermaphrodites, et " mâle-stériles ", révèle la diversité génétique au sein d'une espèce.

Les graines chez le Thym se dispersant peu, on peut s'attendre à observer, dans une population en cours de fécondation, 2 types de situation :

- Des agglomérations de femelles quand l'hermaphrodite voisin pollinisant la fondatrice ne possède pas les gènes de restauration de son cytoplasme.
- Des agglomérations plutôt hermaphrodites, quand le fondateur était un hermaphrodite ou une femelle qui a été fécondée par un hermaphrodite possédant les gènes de restauration de son cytoplasme.

• Chromosomes

Selon **Elisabeth et Francisco (2002)**, les chromosomes du genre *Thymus* sont très petits avec 1-2 μm ils apparaissent comme des points sous le microscope optique (Figure 03). Les nombres chromosomiques connus sont les suivants: $2n = 24, 26, 28, 30, 32, 42, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 84$ et 90 , correspondant au stade diploïde, tétraploïde et hexaploïde. Les numéros les plus fréquents sont $2n = 28, 30, 56$ et 60 .

Les nombres de base secondaires $x = 14$ et $x = 15$ peuvent probablement provenir d'un nombre de base $x = 7$.

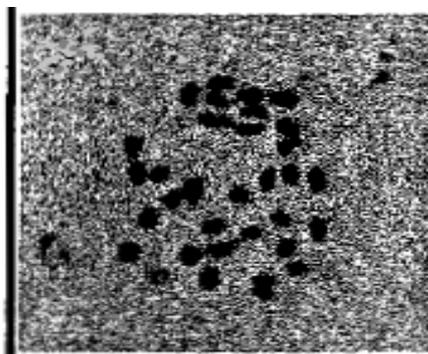


Figure 03 : Chromosome de l'espèce *Thymus algériensis* $2n = 30$ (Elisabeth et Francisco, 2002)

I. 2. Description des espèces étudiées

I. 2. 1. *Thymus fontanesii* Boiss et Reut

Selon **Quezel et Santa (1963)**, l'espèce *Thymus fontanesii* est une plante endémique d'Algérie et de Tunisie, elle se trouve dans le Tell, au niveau des pelouses et des garrigues (**Figure 04 et 05**).



Figure 04: *Thymus fontanesii* Boiss et Reut (Fordin *et al.*, 2001)



Figure 05 : *Thymus fontanesii* Boiss et Reut (Originale 2015)

Cette espèce comprend :

- Un calice à 5 dents
- La lèvre supérieure divisée dans son tiers supérieur ;
- Les tiges sont dressées et robustes ;
- Les feuilles oblongues-lancéolées sont plus ou moins interrompues vers le bas ;
- Les fleurs blanches ou pâles sont à peine plus longues que le calice.

- **Systématique**

Selon **Morales (2002)**, la classification de *Thymus fontanesii* est la suivante :

- **Embranchement** : Spermaphyte (plantes à fleurs et formation d'une graine).
- **Sous-embranchement** : Angiospermes (plantes à ovules cachés dans un ovaire, formation d'un fruit)
- **Classe** : Dicotylédones (deux cotylédons : organes de réserve).
- **Sous classe** : Gamopétales (pétales soudés)
- **Ordre** : Lamiales ou Labiales
- **Famille** : Lamiacées ou Labiées
- **Genre** : *Thymus*

Espèce : *Thymus fontanesii* (**Quezel et Santa, 1963**)

- **Etymologie**

En Français: Thym (**Quezel et Santa, 1963**)

En Algérie : Zateur (**Anonyme I, 2014**)

- **Nom scientifique**: *Thymus fontanesii* Boiss et Reut. (**Quezel et Santa, 1963**).

- **Composition chimique de *Thymus fontanesii***

L'huile essentielle de *Thymus fontanesii* a fait l'objet d'un travail réalisé par **Ghannadi et al., (2004)**. Cette espèce présente un rendement en huile essentielle très faible de l'ordre de 1,9%. L'analyse chimique par CPG-SM de l'huile essentielle de cette plante récoltée à Sétif (Algérie), a révélé l'existence d'un seul composé majoritaire, le thymol. (67,8%) suivi de γ -terpinène (15,9%) et de p-cymène (13,0%). Ces mêmes résultats ont été rapportés par **Kabouche et al., (2005)**, lors de l'étude du pouvoir antimicrobien de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii*.

I. 2. 2. *Thymus algériensis*

Thymus algériensis est une espèce endémique de l'Afrique du Nord. Au Maroc, elle est rencontrée dans le Moyen Atlas (**Benabid, 2000**).

Selon **Quezel et Santa (1963)**, *Thymus algériensis* est un sous arbrisseau d'une odeur forte, aromatisant très agréable (**Figure 06 et 07**).



Figure 06 : *Thymus algériensis*
(**Fordin et al., 2001**)



Figure 07 : *Thymus algériensis* (**Originale, 2015**).

Cette espèce comprend :

- Des feuilles florales peu différentes des feuilles culinaires, peu dilatées,
- Epis florifères courts et étroits ne dépassant guère 15×12 mm,
- Corolle moins de deux fois plus longue que le calice,
- Fleurs de 5 à 6mm.
- Forme grêle à fleurs très petites.
- Feuilles fortement enroulées, les florales plus larges.

- **Systématique**

Selon **Morales (2002)**, *Thymus algériensis* occupe dans la systématique la position suivante :

- **Embranchement** : Spermaphyte
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous classe** : Gamopétales

- **Ordre** : Lamiales ou Labiales
- **Famille** : Lamiacées ou Labiées
- **Genre** : *Thymus*

Espèce : *Thymus algériensis* (Quezel et Santa, 1963)

- **Etymologie**

En Arabe: Z'itra (Anonyme I, 2014)

En algérie : Rebba, Z'itra (Anonyme I, 2014)

- **Nom scientifique**: *Thymus algériensis* (Quezel et Santa, 1963)

- **Composition chimique de *Thymus algériensis***

L'huile essentielle de l'espèce algériensis étudiée par **Dob et al., (2006)**, contient comme principaux constituants le linalol (43,3 %), le thymol (29,2 %) et le ρ -cymène (6,8 %). Les essences de *T. algeriensis* originaires de Khedara et Fatoum Souda (Algérie) présentent les mêmes composés majoritaires, mais elles sont plus riches en α -pinène (27,14-25,52 %) qu'en camphre (8,77-8,45 %), en plus du 1,8-cinéole (7,69-7,68 %), du sabinène (5,25 -5,61 %) et du β -pinène (2,66-3,12 %) (**Giordani et al., 2008**).

I. 2. 3. *Thymus lanceolatus* Desf

Selon **Quezel et Santa (1963)**, *Thymus lanceolatus* Desf est une espèce endémique d'Algérie, elle pousse spontanément (**Figure 08 et 09**).



Figure 08: *Thymus lanceolatus*. Desf (**Fordin et al., 2001**)

Elle est caractérisée par :

- Feuilles longues, large lancéolées
- grandes fleurs rose-violettes
- Corolle blanche glandules plus longue que le calice
- Lèvre inférieure à 3 lobes de point violet
- Calice est tubulé cylindrique à 5 dents, les 2 inférieurs plus longues



Figure 09 : *Thymus lanceolatus*. Desf (**originale, 2015**).

- **Systématique**

Selon Morale (2002), *Thymus lanceolatus* Desf se classe comme suivant :

- **Embranchement** : Spermaphyte
- **Sous-embranchement** : Angiospermes
- **Classe** : Dicotylédones
- **Sous classe** : Gamopétales
- **Ordre** : Lamiales ou Labiales
- **Famille** : Lamiacées ou Labiées
- **Genre** : *Thymus*
- **Espèce** : *Thymus lanceolatus* Desf (**Quezel et Santa, 1963**)

- **Étymologie**

En Arabe: Zaatr (**Anonyme I, 2014**)

En algérie : Zaatel el mediya, zaater el hor. (**Anonyme I, 2014**)

- **Nom scientifique:** *Thymus lanceolatus* Desf (**Quezel et Santa, 1963**)

- **Composition chimique de *Thymus lanceolatus* Desf**

Thymus lanceolatus Desf a fait l'objet d'un seul travail réalisé par **Khadir et al., (2013)**, sur l'étude de l'activité antimicrobienne de l'huile essentielle de cette espèce. L'obtention de l'huile essentielle de *Thymus lanceolatus* a donné une huile jaune peu visqueuse et très aromatique avec un rendement d'extraction de 0,9 ml par 100 g de matière de plante.

La biodiversité, contraction de « diversité biologique », fait référence à la variété du monde vivant. **(Manuelle *et al.*, 2010).**

II. 1. Diversité biologique

La diversité biologique ou biodiversité désigne la variété des formes de vie comprenant les plantes, les animaux et les micro-organismes, les gènes qu'ils contiennent et les écosystèmes qu'ils forment. Elle englobe à la fois la diversité au sein des espèces (diversité génétique), entre les espèces (diversité d'espèces) et entre les écosystèmes (diversité d'écosystèmes) **(Parizeau, 1997).**

II. 2. Diversité génétique

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité. **(Parizeau, 1997).**

II. 3. Analyse de la variabilité génétique

Les valeurs phénotypique d'un caractère observé pour un génotype donné dépend des conditions environnementales, pour la plupart des caractères, le phénotype résulte des effets conjoints de 3 composants : le génotype G, l'environnement E, qui contribue toujours pour une part au phénotype et l'interaction entre le génotype et l'environnement I_{GXE} . La valeur pour un phénotype peut se résumer à la formulation additive : $P = G+E+I_{GXE}$. Cette interaction entre le génotype et l'environnement est très importante car elle signifie que l'expression d'un gène n'est pas indépendante du milieu **(Gallais, 2001).**

II. 4. Estimation de la variabilité génétique par l'utilisation des marqueurs moléculaires

La variabilité génétique ou bien la diversité génétique est le résultat de plusieurs phénomènes dont la sélection, les mutations, la migration et la dérive génétique. Ces forces évolutives ont toutes des effets sur l'importance et l'organisation de la variabilité génétique. Les effets de ces forces portent sur l'ampleur et l'organisation du polymorphisme : la mutation et la migration augmentent la diversité alors que la sélection et la dérive la diminuent. L'utilisation de la diversité génétique dans un programme de sélection passe inévitablement par son estimation et par le choix du type de marqueur susceptible de la traduire le plus fidèlement possible. Les marqueurs génétiques sont des caractéristiques héréditaires qui renseignent sur le génotype qui les porte. **(De Vienne, 1998).**

II. 5. Mesure de la diversité génétique

L'étude de la diversité génétique est une des applications les plus répandues pour les marqueurs moléculaires. Le choix du marqueur approprié dépendra en partie du matériel au sein duquel on cherche à mesurer la diversité génétique (Alline, 2009).

II. 5. 1. Mesure indirectes

a. Base génétique

Les sélectionneurs ont introduit le concept de base génétique, définie comme le jeu complet des ancêtres qui ont contribué à une population améliorée (Elmer, 2008).

Deux composantes dans la description de la base génétique sont le nombre d'ancêtres et le pourcentage de contribution de chaque ancêtre au complément génétique total de la base. Le pourcentage de contribution dérivé de chaque ancêtre donne une évaluation quantitative, tandis que le nombre d'ancêtre donne une évaluation qualitative moins utile de la base génétique (Cui *et al.*, 2001).

b. Coefficient de parenté

Le coefficient de parenté est une autre mesure indirecte s'appuyant sur l'analyse du pedigree des cultivars. Cette analyse fournit un moyen pour estimer la diversité génétique des cultivars basée sur les lignées ancestrales. Dans une telle analyse, deux lignées qui auraient les mêmes parents seraient considérées comme ayant un coefficient de parenté élevé. Au contraire, deux lignées dérivées de croisements entre des parents dont le pedigree ne révèle aucun parent en commun afficheront un coefficient de parenté de 0 (Carter *et al.*, 2004).

II. 5. 2. Mesure directe (diversité génétique basée sur les marqueurs à ADN)

C'est l'une des applications les plus répandues pour les marqueurs moléculaires. Les premières études portant sur la diversité génétique au niveau génomique ont débuté avec l'utilisation des marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphie DNA), les marqueurs AFLP (Amplified Fragment length Polymorphism), Les marqueurs SSR (Simple Sequence repeat ou micro-satellites), SNP (single nucleotide polymorphisme) (Cregan, 2008).

a. Diversité intraspécifique

La diversité intraspécifique est la diversité à l'intérieur d'une même espèce. Cette diversité est à l'origine de la création de nouvelles variétés. Plusieurs marqueurs moléculaires ont été utilisés pour l'évaluation de cette diversité au sein d'un matériel (Alline, 2009).

L'indice de diversité génétique de Nei sert à décrire combien un marqueur moléculaire est informatif au sein d'un matériel génétique (**Mebareki, 2010**).

b. Diversité interspécifique

Pour décrire la diversité génétique des populations, **Wright (1951)** a développé l'indice F_{st} qui est la corrélation entre deux gamètes tirés au hasard et provenant de deux sous-population différentes. Cet indice s'applique aux locus bialléliques et en absence de sélection. Lorsque les locus sont multialléliques, on utilise une généralisation de cet indice dénommé G_{ST} de **Nei (1973)**.

II. 6. Similarité et distance génétique

Le choix d'une mesure appropriée pour évaluer la diversité génétique et déterminer les relations entre les individus dans une population ainsi que l'utilisation d'une méthode statistique appropriée sont aussi importants que le choix du marqueur utilisées. Les mesures de similarité (S) et les distances génétiques (D) sont les plus généralement utilisées. Ces mesures servent à mesurer la ressemblance ou la dissemblance entre deux individus et on peut passer de l'une à l'autre par une simple transformation linéaire ou $D = 1-S$. De très nombreux indices de distance ont été identifiés sur les données bonaires et la plupart varient de 0 à 1. Parmi les plus utilisés, le coefficient de Jaccard (**Jaccard, 1908**), l'indice de **Sokal et Michner (1958)**, la distance corrigée de Rogers (**Wright, 1978**) et la distance de **Nei et Li (1979)**. Ces indices sont choisis en fonction des caractéristiques des marqueurs utilisés.

Les premiers marqueurs disponibles ont été les marqueurs morphologiques, puis les marqueurs biochimiques basés sur les différences de poids moléculaires des protéines ayant une activité enzymatique (**Julier *et al.*, 2003**). Durant les années 80, les marqueurs moléculaires liés à l'ADN ont remplacé progressivement les marqueurs visuels ou enzymatiques (**Vedele *et Loudet*, 2001**).

III.1. Marqueurs morphologiques

Dans les programmes de sélection des plantes, les caractères morphologiques sont les premiers à être observés. Ces caractères intéressent diverses parties de la plante, par exemple longueur des tiges, surface foliaire, initiation de la floraison (**Cui *et al.*, 2001**).

Ces caractères sont utilisés également pour estimer la variation intra et inter-populations. 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**).

III. 2. Marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs à avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (**Harry, 2001**).

Les marqueurs biochimiques dont les allozymes, ont été utilisés pour caractériser la diversité génétique de plusieurs plantes. Les allozymes sont des formes moléculaires distinctes d'une enzyme chez un même organisme et ayant la même activité catalytique. Leur origine est due à une mutation au niveau de l'acide aminé qui affecte la charge totale de la protéine sans affecter le site catalytique. Leur révélation de fait par séparation électrophorétique des protéines et puis une coloration des enzymes (**Abdelkefi *et al.*, 1997**).

III. 3. Marqueurs génétiques moléculaires

Les marqueurs moléculaires correspondent à des différences nucléotidiques existant au niveau de la molécule d'ADN (d'où le terme moléculaire), des techniques de biologie moléculaire permettent de révéler ce polymorphisme de séquences. Ces différences entre allèles peuvent correspondre à des mutations ponctuelles (substitutions, insertion, délétion), des réarrangements chromosomiques, ou des mutations silencieuses (sans effet sur l'expression du locus), comme elles peuvent se trouver dans des régions codantes ou non codantes. Les possibles variations tissulaires temporelles ou environnementales de l'expression des séquences sont sans effet sur leur détectabilité. Elle sont en majorité sans effet phénotypique (**Samoulian *et al.*, 2009**).

III. 4. Différents types des marqueurs moléculaires

Il existe plusieurs types de marqueurs que l'on peut classer en fonction du polymorphisme qu'ils détectent. Certaines techniques ont l'avantage de révéler de nombreux fragments simultanément, ce sont des techniques de révélation en masse. Il existe aussi des stratégies permettant de détecter du polymorphisme de façon individuelle. Les marqueurs moléculaires se divisent en deux catégories, indépendamment de la technique utilisée, les marqueurs dominants et les marqueurs codominants (**Falque et Santoni, 2004**).

III. 4. 1. Marqueurs co-dominants révélés individuellement

III. 4. 1. 1. Marqueur RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Cette technique repose sur la mise en évidence de la variabilité de la séquence nucléotidique de l'ADN génomique après digestion par des enzymes de restriction. Les fragments générés par la digestion enzymatique de l'ADN de deux individus (identifiés A et B dans la figure) sont séparés selon leur taille sur gel d'agarose, dénaturés et transférés par capillarité sur une membrane de nylon. La position relative des fragments d'ADN est conservée durant le transfert. La dernière étape consiste en l'hybridation moléculaire avec une sonde d'ADN marquée préalablement. (**Helentjaris et al., 1985**).

III. 4. 1. 2. Marqueurs Microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats)

Les SSR sont des motifs simples, constitués de quelques paires de bases répétées en tandem, montrant une variation de leur longueur. Ces marqueurs sont dispersés de façon assez dense sur l'ensemble du génome des Procaryotes et Eucaryotes (**Weber et al., 1990**).

III. 4. 1. 3. Marqueurs SNP (Single Nucléotide Polymorphism)

Les SNP sont une forme de polymorphisme engendré par une mutation ponctuelle qui crée différents allèles à un même locus. Ces mutations ponctuelles entraînent une différence dans une séquence d'ADN. Les SNP présentent de 2 à 4 allèles (pour un site donné), mais en général seulement deux bases alternatives sont observées pour un même site (**Rafalski, 2002**).

III. 4. 2. Marqueurs dominants révélés en masse (marqueurs anonymes)

III. 4. 2. 1. Marqueurs AFLP (Amplified Fragment length Polymorphism)

La technique AFLP est une variante de la PCR développé par **Vos et al., (1995)**. Cette technique est basée sur la détection par des amplifications sélectives de fragments d'ADN génomique digérés. Les ADN génomiques sont doublement digérés par des endonucléases et les fragments obtenus sont sujets à une ligation avec des adaptateurs spécifiques. Les produits de la ligation sont ensuite amplifiés sélectivement moyennant des amorces complémentaires aux adaptateurs utilisés. Les produits de la

PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturé et révélés par radiographie ou bien avec le nitrate d'argent

III. 4. 2. 2. Marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

L'amplification des ADN par des marqueurs RAPD ou Random Amplified Polymorphic DNA (**Williams *et al.*, 1990**), constitue l'amplification de séquences sélectionnées au hasard dans le génome par l'utilisation d'amorces non spécifiques. Sa principale variante consiste à utiliser comme amorce un seul oligonucléotide d'une dizaine de base qui permet d'amplifier par PCR un ou plusieurs segments d'ADN de l'échantillon. Chaque bande de l'amplifié correspond à l'existence sur chacun des brins d'ADN d'un motif complémentaire à l'amorce.

Sur le plan génétique, cette technique permet de révéler un polymorphisme de présence/absence. Ainsi pour un locus donné, il y a ou il n'y pas d'amplification du fragment. Dans le domaine végétal la technique RAPD se caractérise par rapport à d'autres techniques (SSR, RFLP, AFLP... etc) par sa grande simplicité, rapidité de manipulation et la nécessité d'une faible quantité d'ADN, néanmoins les RAPD présentent l'inconvénient d'être faiblement reproductibles. Cependant, ils permettent de générer un taux élevés de polymorphisme qui a été largement utilisé chez les populations (**Chalmers *et al.*, 1992**)(Figure 10).

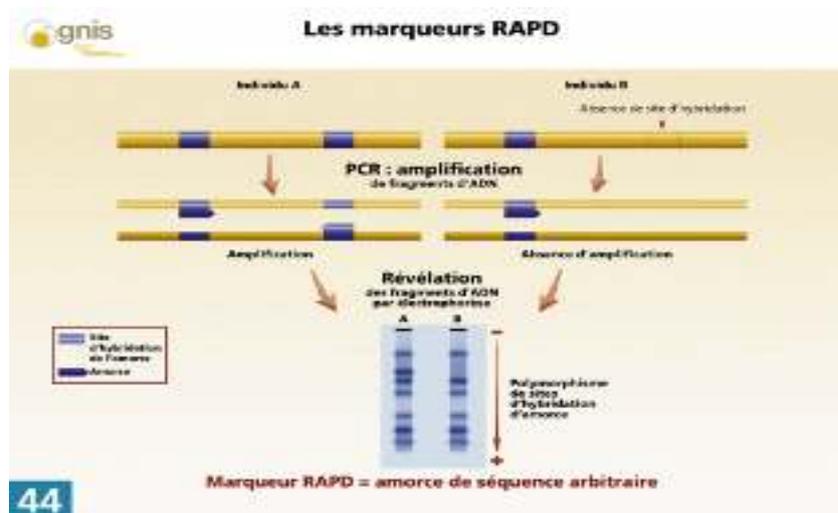


Figure 10 : Polymorphisme détecté par les marqueurs RAPD (Gnis, 1999).

• Technique RAPD-PCR

Selon **Sonnier (1999)**, la RAPD-PCR est une technique extrêmement sensible. Elle est susceptible de détecter de faibles différences entre des génomes d'individus d'une même espèce. Ainsi plusieurs modifications du génome utilisé peuvent entraîner la perte d'une bande :

- Une mutation d'une seule paire de base dans le site d'hybridation
- Une insertion longue séparant les deux sites d'hybridation de l'amorce d'une distance trop importante.

• **Utilisation de la RAPD-PCR**

Selon **Sonnier (1999)**, la technique RAPD-PCR utilisée pour :

a. Caractérisation globale des génomes : typage et relation génétique entre individus

Les RAPD permettent d’obtenir un sondage théoriquement aléatoire du génome et donc de caractériser les individus et d’estimer les relations génétiques globales entre les individus, espèces ou genres.

b. Développement d’outils moléculaires à partir de fragments RAPD

Les fragments sont purifiés du gel, clonés, et utilisés comme sonde par marquage radioactif pour tester leur hybridation sur l’ADN génomique total.

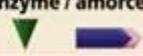
c. Sensibilité de la technique RAPD-PCR

Le problème de la technique RAPD-PCR, vient du fait qu’elle est particulièrement sensible à la concentration initiale d’ADN lors de l’amplification. Ainsi il peut facilement y avoir des variations d’intensité entre bandes même si elles sont présentes chez différents individus.

III. 5. Caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires

Les caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires sont dirigées dans le tableau ci-dessous

Tableau IV : Caractéristiques des principaux marqueurs moléculaires (**Gnis, 1999**).

	RFLP	Microsatellites	RAPD	AFLP
Type de marqueurs	Enzyme / sonde 	Amorces spécifiques bordant le microsatellite 	Amorce de séquences arbitraires 	Enzyme / amorce 
Nombre de marqueurs	Illimité	Quelques milliers	Illimité	Illimité
Polymorphisme mis en évidence	Élevé	Élevé	Très élevé	Très élevé
Type de polymorphisme	Insertion, délétion, substitution	Insertion	Plutôt substitution, quelquefois insertion	Plutôt substitution
Caractérisation génétique	Locus codominants et révélés individuellement		Locus dominants et révélés en masse	
Principales utilisations	Cartographies, génétiques quantitatives (QTL)		Clonage positionnel, rétrocroisements	
Reproductibilité	Parfaite	Parfaite	Faible	Faible

La partie expérimentale a été réalisée au laboratoire de Biologie moléculaire au CNCC (Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants) El Harrach-Alger :

Durant une période d'un mois et vingt jours, allant du 20 juillet jusqu'à 30 août 2015.

I. 1. Matériel

I. 1. 1. Matériel végétal

Le matériel végétal étudié correspond à trois espèces du genre *Thymus* (*Thymus fontanesii* Bois et Reut, *Thymus algériensis*, *Thymus lanceolatus* Desf), chaque espèce renferme un ou plusieurs écotypes (**Tableau V**).

Ces espèces ont été récoltées à partir de deux régions différentes bioclimatiquement et géographiquement (Wilaya de Médéa et Wilaya de Tipaza), durant le mois d'Avril et Mai 2015 (**Tableau V**) (**Figures 14 et 15**).

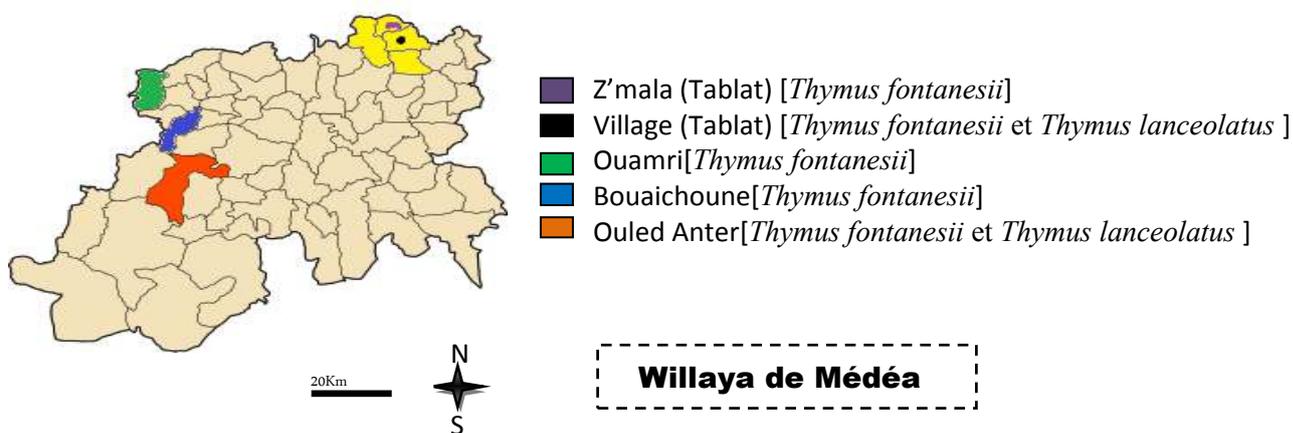


Figure 14: Carte géographique de Médéa se présentant les lieux de récolte de deux espèces *Thymus fontanesii* Boiss et Reut et *Thymus lanceolatus* Desf. (Anonyme IV, 2015).

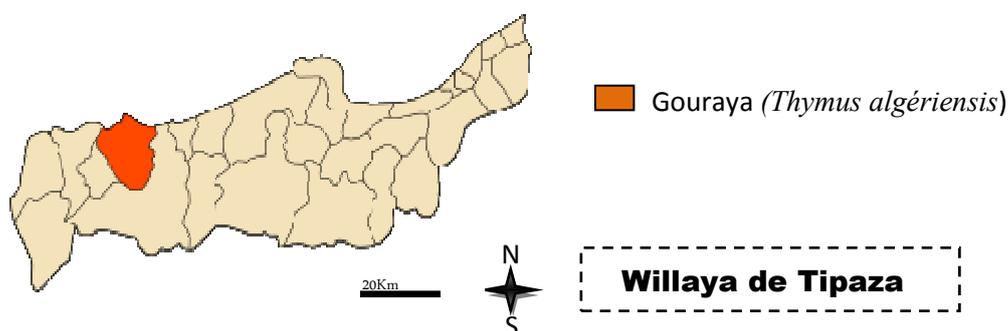


Figure 15: Carte géographique de Tipaza se présentant le lieu de récolte de l'espèce *Thymus algériensis*. (Anonyme IV, 2015).

Les trois espèces du genre *Thymus* sont identifiées au département de botanique à l'École Nationale des Sciences Agronomiques (ENSA), 2015.

Le Tableau V regroupe les régions de récolte des différentes espèces du genre *Thymus*.

Tableau V: Région de récolte des différentes espèces du genre *Thymus*

Espèces	Wilaya	Région de récolte
<i>Thymus fontanesii</i> Boiss et Reut	Médéa	<ul style="list-style-type: none"> • Tablat : - Village - Z'mala • Ouled Antar • Ouamri • Bouaichoune
<i>Thymus lanceolatus</i> Desf		<ul style="list-style-type: none"> • Z'mala • Ouled Anter
<i>Thymus algériensis</i>	Tipaza	<ul style="list-style-type: none"> • Gouray

• **Description climatique et géographique des régions de récolte**

Le tableau suivant rassemble les régions de récolte, leur climat et la description géographique

Tableau VI: Description géographique et climatique des régions de récolte

Régions		Climat (AnonymeII, 2012)	Coordonnées géographiques (AnonymeIII, 2013)
Médéa	Tablat	Le climat y est chaud et tempéré. L'hiver à Tablat se caractérise par des précipitations bien plus importantes qu'en été. D'après Köppen et Geiger, le climat y est classé Csa. La température moyenne annuelle à Tablat est de 16.0 °C. Les précipitations annuelles moyennes sont de 677 mm.	<p>Tablat est une localité de montagne sur le versant Sud de l'atlas tellien.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Latitude: 36.4128, - Longitude: 3.31007 36° 24' 46" Nord, 3° 18' 36" Est - Superficie : 7 750 hectares <p>Village : situé au fond d'une vallée à 446m altitude. Z'mala : chaîne des montagnes proches les unes des autres, peu élevées 1298m altitude.</p>
	Ouled antar	Le climat y est chaud et tempéré. L'hiver à Ouled Antar se caractérise par des précipitations bien plus importantes qu'en été. La carte climatique de Köppen-Geiger y classe le climat comme étant de type Csa. Ouled Antar affiche 13.2 °C de température en moyenne sur toute l'année. La moyenne des précipitations annuelles atteints 598 mm.	<p>Situe dans la région des haut-plateaux à plus de 1100 mètres d'altitude. Une grande partie de son territoire est occupée par le Barrage.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Latitude: 35.9473, - Longitude: 2.60231 35° 56' 50" Nord, 2° 36' 8" Est - Superficie : 22 478 hectares

	Ouamri	Le climat y est chaud et tempéré. En hiver, les pluies sont bien plus importantes à Ouamri qu'elles ne le sont en été. D'après Köppen et Geiger, le climat y est classé Csa. Ouamri affiche 16.0 °C de température en moyenne sur toute l'année. Il tombe en moyenne 684 mm de pluie par an	C'est une région des hauts – plateaux agricole de 740 mètres d'altitude avec d'abondantes sources d'eau naturelle. <ul style="list-style-type: none"> - Latitude: 36.2333, - Longitude: 2.56667 36° 13' 60" Nord, 2° 34' 0" Est - Superficie : 8 800 hectares
	Bouaïchoune	Un climat tempéré chaud est présent à Bouaïchoune. A Bouaïchoune, les précipitations sont plus importantes en hiver qu'en été. La classification de Köppen-Geiger est de type Csa. Bouaïchoune affiche 15.6 °C de température en moyenne sur toute l'année. Les précipitations annuelles moyennes sont de 623 mm.	Situé sur long chaînes montagneuses à plus de 1000m altitude. <ul style="list-style-type: none"> - latitude: 36.5674, - Longitude: 1.90493 36° 34' 3" Nord, 1° 54' 18" Est - Superficie : 7700 hectares
Tipaza	Gouraya	Le climat y est chaud et tempéré. En hiver, les pluies sont bien plus importantes à Gouraya qu'elles ne le sont en été. La carte climatique de Köppen-Geiger y classe le climat comme étant de type Csa. Gouraya affiche 19.6 °C de température en moyenne sur toute l'année. La moyenne des précipitations annuelles atteints 580 mm.	Est une montagne côtière de 37 m d'altitude. Située à l'ouest de la Wilaya de Tipaza à environ 60 km du chef lieu de la Wilaya et à quelque 30 kilomètres de Cherchell. <ul style="list-style-type: none"> - latitude: 36.1624, - Longitude: 2.67586 36° 9' 45" Nord, 2° 40' 33" Est

I. 2. Méthode

L'ADN étudiée à été extrait à partir des jeunes feuilles des huit écotypes.

Après la récolte de la partie aérienne de la plante, les feuilles sont coupées à partir des tiges et pesées immédiatement (Poids frais), puis sont conservées dans du papier aluminium à -80°C jusqu'à leur utilisation.

I. 2. 1. Extraction et purification de l'ADN

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. L'objectif des méthodes d'extraction des acides nucléiques est d'obtenir des acides nucléiques purifiés (**Somma, 2006**).

La qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse de PCR.

- **Méthode d'extraction et de purification au CTAB**

La méthode classique d'extraction au CTAB, a été élaborée pour la première fois par Murray et Thompson en 1980, et le protocole du test a été publié en 1987 par Wagner et ses collègues.

Le protocole de CATB a été largement appliqué en génétique moléculaire des végétaux, et a déjà été testé dans des essais de validation dans le but de détecter les OGM (**Lipp *et al.*, 2001**).

- **Principe de la méthode au CTAB**

Les cellules végétales peuvent être lysées par utilisation du détergent ionique Cétyle Triméthyl Ammonium Bromure (CTAB), qui forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans un environnement à faible teneur en sels. Dans ces conditions, les polysaccharides, les composés phénoliques et les autres contaminants restent dans le liquide surnageant et peuvent être lavés. Le complexe d'ADN est solubilisé en élevant la concentration en sels et précipité avec l'éthanol ou de l'isopropanol. Donc, les trois principales étapes de l'extraction au CTAB sont : - Lyse de la membrane cellulaire, - Extraction de l'ADN génomique et sa précipitation.

- **Procédure**

Le Protocole d'extraction de l'ADN par CTAB est comme suit :

1. Peser 50mg des tissus verts, et garder dans un congélateur à -80°C jusqu'à leur utilisation
2. Préparer le tampon d'extraction CTAB (**Annexe I**)
3. Ajouter 0.4g polyvinylpyrrolidone (PVP) et 50µl β-mercaptoéthanol
4. Retirer les tissus congelés et les broyées dans l'azote liquide
5. Ajouter 500µl de mix (tampon CTAB, PVP, β-mercaptoéthanol) et incubé à 55°C pendant 1h, avec une agitation au bout de 30 min
6. Sous la Hotte, ajouter 500µl de Chloroforme en secouant doucement
7. Centrifuger à 16000 Tpm pendant 7min
8. Ajouter 0.08 volumes acétate d'ammonium froid 7.5M + 0.54 volumes d'isopropanol froid et incubé sur la glace pendant 30min
9. Centrifuger à 16000 Tpm pendant 3min
10. Ajouter 700µl d'éthanol 70% et centrifuger à 16000 Tpm pendant 1min
11. Ajouter 700µl d'éthanol 95% et centrifuger à 16000 Tpm pendant 1min
12. Inverser les tubes sur un papier absorbant propre et laisser sécher pendant 10min
13. Hydraté avec 50µl de TE et laisser remettre en suspension pendant une nuit à température ambiante.

I. 2. 2. Quantification de l'ADN

Les protéines absorbent vers 280nm alors que les acides nucléiques absorbent vers 260nm. La concentration de l'ADN est estimée sur la base qu'une unité de DO correspond le rapport DO260/DO280 dans une solution d'ADN bi caténaire de 50 µg/ml (**Sambrook et Russel, 2001**).

La quantité d'ADN extraite a été évaluée par la mesure de la DO à 260nm. Elle est déterminée selon la formule suivante : **Quantité d'ADN (ng/μl) = valeur d'absorbance à 260nm × 50 × facteur de dilution.**

Pour vérifier la qualité de l'ADN, la DO est prise à 230, 260 et 280 nm. Le rapport DO_{260} / DO_{280} doit être compris entre 1.8 et 2. S'il est inférieur à 1.8, cela signifie que des protéines restent encore dans la solution. S'il est supérieur à 2, alors c'est probablement dû à la présence des traces de phénol (Sambrook et Russel. 2001).

I. 2. 3. Qualité de l'ADN

La qualité de l'ADN extrait a été d'abord vérifiée sur gel d'agarose 1% puis par la mesure de la densité optique (DO) à 260nm. En effet, 10μl d'ADN + 2μl de tampon de charge (Promega) déposé dans les puits du gel, ont migrés dans le tampon TBE (Tampon Tris Borate 0.5%) pendant 1h à 80voltes. Le gel, après sa coloration dans un bain de bromure d'éthidium (0.1%) a été visualisé sous UV.

I. 2. 4. Amplification de l'ADN

Cette technique a été mise du point en **1986 par K. Mullis**, c'est une technique qui permet d'amplifier *in vitro* un segment d'ADN double brin, compris entre deux régions de séquences connues, en des millions de copies. L'amplification est assurée par la polymérase de bactérie thermophile des sources chaudes *Thermus aquaticus* (Taq polymérase).

La technique RAPD-PCR a été mise au point en **1990 par Williams et al.** Elle est basée sur la réaction d'amplification en chaîne, de séquences d'ADN génomique prises au hasard.

a. Mélange réactionnel

Nous nous sommes référées au mélange réactionnel préalablement adapté à l'amplification de l'ADN de certaines espèces du genre *Thymus* (*Thymus Capitatus* et *Thymus algériensis*) par **Ben El Hadj Ali et al (2011)**. Et autres espèces (*T. syriacus* *T. majorana* *T. incanus* *T. fruticosus* *T. capitatus*) par **Esra et Raed (2014)**. Toutefois des modifications indispensables ont été apportées au mélange réactionnel pour son adaptation à nos espèces (*Thymus fontanesii* Boiss et Reut, *Thymus lanceolatus* Desf, *Thymus algériensis*).

La PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 μl (**Tableau VII**).

Tableau VII : Composition du mélange réactionnel pour PCR/RAPD.

Protocol adapté au <i>Thym</i>	
Elément du mélange	Volume de prise
Tampon PCR	5µl
MgCl ₂	2.5µl
Dntp	1µl
Amorce	1.5µl
Taq polymérase (Promega)	0.4µl
ADN	5µl
Eau	9.6µl
Mélange réactionnel	25µl

b. Choix des marqueurs moléculaires

La RAPD utilisé pour amplifier l'ADN génomique via la réaction PCR, est une amorce aléatoire courte d'environ 10 nucléotides, qui peut s'hybrider avec des séquences complémentaires dans toute partie du génome (Williams *et al.*, 1990).

On a choisis 4 amorces RAPD (DIAG-GENE), qui ont déjà été testées sur certaines espèces de *Thym* (Esra`et Raed, 2014 ; Ben El Hadj Ali *et al.*, 2011).

Les 4 amorces RAPD sont présentées dans le tableau VIII.

Tableau VIII: Listes des amorces RAPD (DIAG-GENE).

N°	Nom de l'oligo	Séquence (5'-3')	Qnt [µg]	Qnt [nmol]	Tm [°c]	Taux de GC %	Référence
1	OPJ-08	CAT ACC GTG G	130	43.1	32.0	60%	Ben El Hadj Ali <i>et al</i> (2011).
2	OPD-19	CTG GGG ACT T	134	43.9	32.0	60%	Esra`et Raed (2014).
3	OPAG-02	CTG AGG TCC T	135	44.7	32.0	60%	Esra`et Raed (2014).
4	OPAN-08	AAG GCT GCT G	146	47.7	32.0	60%	Esra`et Raed (2014).

c. Cycle d'amplification

Les étapes de programme d'amplification PCR/RAPD de 45 cycles sont présentées dans le tableau IX.

L'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Bio-RAD, C1000).

Tableau IX : Les étapes de cycle d'amplification PCR/RAPD

Etapes du cycle		Température du thermocycleur en degré	Temps en min
1 ^{ère} étape	Dénaturation initial	94°C	2 min
2 ^{ème} étape	45 cycles comprennent : { Phase de dénaturation : { Phase d'hybridation : { Phase d'élongation :	94°C 36°C 72°C	30 s 1 min 2 min
3 ^{ème} étapes	Elongation final :	72°C	10 min

I. 2. 5. Analyse de l'ADN amplifié

L'analyse du produit d'amplification est effectuée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % (la concentration est par rapport à la taille des fragments d'ADN étudiés).

On dépose dans les puis du gel 15µl d'ADN amplifié, après la migration dans le tampon TBE (Tampon Tris Borate 0.5%) pendant 2h à 80V, le gel est plongé dans un bain de bromure d'éthidium (0.1%), puis visualisé sous UV par Transilluminateur UV (Gel DocTM XR).

I. 2. 6. Analyse des données RAPD

Les bandes observées ont été enregistrées dans une matrice avec signe de présence ou absence. Les bandes visibles à l'œil nu seront notées par le chiffre 1 et l'absence de bandes par 0. Pour cela les marqueurs de taille permettent de déterminer la taille des fragments.

I. 2. 7. Analyse statistiques

a. Analyse des Composantes Principales ACP

L'analyse des composantes principales est une méthode statistique essentiellement descriptive, son objectif est de présenter sous une forme graphique le maximum de l'information contenue dans un tableau de données (Breton *et al.*, 2006).

b. Analyse des Coordonnées Principales ACoP

L'Analyse en Coordonnées Principales (*Principal Coordinates Analysis* ou ACoP en anglais) est une méthode qui permet de représenter sur un graphique à 2 ou 3 dimensions, des objets décrits par une matrice carrée contenant des indices de ressemblance entre ces mêmes objets (Gower, 1966).

c. Indice de diversité

Selon **Dajoz (1975)**, la diversité est la fonction de la probabilité P_i de présence de chaque espèce i par rapport au nombre total d'individus.

- **Indice de Shannon (Shannon, 1949)**

$$H' = -\sum_{i=1}^S P_i \times \log P_i$$

S = nombre total d'espèces

p_i = (n_j/N) , fréquence relative des espèces

n_j = fréquence relative de l'espèce j dans l'unité d'échantillonnage

N = somme des fréquences relatives spécifiques

- Plus la valeur de l'indice H' est élevée, plus la diversité grande.

- **Indice de Simpson (Simpson, 1949)**

$$D = 1 - \sum_{i=1}^S P_i^2$$

L'indice de diversité de Simpson varie de 0 à 1.

- Si D_s tend vers 0, la diversité spécifique est faible.
- Si D_s tend vers 1, la diversité spécifique est forte.

d. Indice de similarité

Indice de similarité est une fonction réelle positive S définie sur l'ensemble $E \times E$ qui se présente sous la forme $(X, Y) \longrightarrow S(X, Y)$ (**Lerman, 1970**).

- **Indice de Gower (Gower, 1966)**

$$S = \frac{a-b-c+d}{n}$$

a, b, c, d : Les nombre des bandes de chaque espèce

n : Nombre des populations.

e. Dendrogramme

Un dendrogramme est un diagramme qui affiche les distances attributaires entre chaque paire de classes combinées séquentiellement. Pour éviter les lignes entrecroisées, le système actualise le diagramme pour que les membres de chaque paire de classes à fusionner soient adjacents dans le diagramme. Seules les bandes polymorphes serviront dans l'analyse à l'aide du logiciel UPGMA et l'index de similarité de Gower, aboutissant à la construction d'un dendrogramme phylogénique. Les bandes monomorphes ne présentent aucune différence entre les individus et ne permettent pas de différencier les espèces.

L'objectif de ce travail est d'étudier la diversité génétique de trois espèces du genre *Thymus* (*Thymus fontanesii* Boiss et Reut, *Thymus algériensis* et *Thymus lanceolatus* Desf) à l'aide d'un marqueur amplifié aléatoire (RAPD).

La méthode d'extraction et de purification de l'ADN par CATB, élaborée pour la première fois par Murray et Thompson en 1980 (Murray et Thompson, 1980), connue sous l'appellation « protocole du test au Cetyl Triméthyl Ammonium Bromure (CTAB) » a été publiée ultérieurement, et plus précisément en 1987, par Wagner et ses collègues (Wagner *et al.*, 1987). Cette procédure a été largement appliquée en génétique moléculaire des végétaux et a déjà été testée dans des essais de validation dans le but de détecter les OGM (Lipp *et al.*, 2001). Plusieurs autres variantes ont été élaborées dans le but d'adapter la méthode à une vaste plage de matrices alimentaires brutes et transformées (Hupfer *et al.*, 1998; Hotzel *et al.*, 1999; Meyer et Jaccaud, 1997; Poms *et al.*, 2001).

Les mesures de quantification de l'ADN par spectrophotométrie de nos échantillons d'ADN obtenus par le protocole de CTAB, montrent que la quantité d'ADN est très importante et leur qualité est très acceptable (Moyenne = 2.1 (Tableau X)).

L'importance de la quantité et la qualité de l'ADN extrait est due au fait que la méthode d'extraction au CTAB (Murray et Thompson, 1980) utilise le chloroforme, l'isopropanol et l'éthanol, lesquels forment des composés très efficaces pour fixer et éliminer les protéines et les lipides présents chez les espèces du genre *Thymus*.

- **Amplification des marqueurs RAPD**

Les 4 amorces RAPD (OPAG-02, OPAN-08, OPD-19, OPJ-08) choisies pour réaliser ce travail ont déjà été testées sur différentes espèces du genre *Thymus* (Ben El Hadj Ali *et al.* (2011); Esra`et Raed (2014)), ces 4 amorces ont générées 38 bandes polymorphes avec un pourcentage de 96.43, ce qui confirme les résultats obtenus et rapportés par des auteurs dans différents pays et ce sur les espèces du genre *Thymus*, avec un pourcentage de polymorphisme variant de 62 à 97% (Bagherzadeh, 2009; Alamadary *et al.*, 2011; Ben el Hadj Ali *et al.*, 2011.; Pluhar *et al.*, 2012; Khalil et Li, 2012; Esra`et Raed (2014)). En Syrie, lors d'une étude concernant la détermination de la génétique du *Thymus vulgaris*, 27 amorces ont été utilisées et ont produits 198 bandes polymorphes (Khalil et Li, 2012).

- **Analyses multi variables**

L'analyse des composantes principales (ACP) a montré que les huit écotypes sont distribués en trois groupes dans lesquels, *Thymus algériensis* de Gouraya est retrouvé parmi les écotypes de l'espèce *Thymus fontanesii*. (Figure 17). Ce qui nous laisse suggérer que *Thymus algériensis* a des ressemblances des composantes principales (les composés de la formulation de la plante) avec les écotypes de l'espèce *Thymus fontanesii*.

Les marqueurs moléculaires RAPD peuvent être utilisés en tant que méthode de choix pour identifier les composants complexes des plantes, car la technique de RAPD avait été utilisée pour la détermination des différents composants présentés dans la formulation des plantes (**Cheng et al, 1987; Cheng et al., 1997**).

En outre, l'analyse des coordonnées principales (ACoP) a classé les huit écotypes en trois groupes selon les taxons, *Thymus fontanesii* du Village (Tabalt) est retrouvé dans le groupe du taxon *Thymus algériensis* (Figure 18) Ce résultat signifie que *Thymus fontanesii* du Village (Tabalt) est proche génétiquement de *Thymus algériensis* de Gouraya.

La matrice des distances entre les écotypes a servi pour la construction de dendrogrammes, ces distances varient de 0.066 à 0.785 (Tableau XXIII) ce qui montre une large variabilité génétique au sein des écotypes et implique que nos résultats sont similaires à ceux rapportés dans les différentes études sur les espèces du genre *Thymus*, avec des distances variant de 0.06 à 0.954, (**Alamadary et al., 2011 ; Ben el Hadj Ali et al, 2011 ; Esra`et Raed (2014)**).

L'analyse de UPGMA a divisé les huit écotypes en trois groupes dans lesquels *Thymus fontanesii* du village (Tablat) est classé dans le groupe du Taxon *Thymus algériensis*, confirmant ainsi les résultats de l'ACoP.

Toutefois l'analyse de l'arbre montre que le regroupement des individus se fait indépendamment de l'origine géographique de l'écotype. Cette répartition sur l'arbre phylogénique peut être expliquée par l'existence d'une large base génétique commune entre les différents écotypes.

Le rapprochement génétique entre l'écotype *Thymus algériensis* de Gouraya et l'écotype *Thymus fontanesii* du Village (Tabalat) est dû probablement aux raisons suivantes :

- La plante a subi des modifications morphologiques pour adaptation au milieu.
- Présence d'hybridations interspécifiques entre les espèces.
- Nature du système de reproduction : *T. fontanesii* est un arbuste hermaphrodite, tandis que *T. algériensis* est un arbuste gynodioïque avec des plantes hermaphrodites (mâles fertiles) et femelles (mâles stériles) survenant dans la même population.

- Dispersion des graines et du pollen.

La dispersion des graines et du pollen entre les populations adjacentes, représentent un facteur déterminant de la structure génétique des populations végétales naturelles (**Brown, 1978**).

La différenciation interspécifique a été également soutenue par la présence des allèles spécifiques (**Ben el Hadj Ali et al., 2011**).

Ce fait confirme à nouveau que les RAPD sont appropriés pour atteindre la classification des espèces et les niveaux intra-espèces.

En effet, les Marqueurs RAPD se sont révélés être un outil utile dans la caractérisation du matériel génétique et analyse de la diversité du Thym, et peuvent- être utilisés comme d'autres marqueurs moléculaires tels que AFLP, ISSR et SSRS (**Ben el Hadj Ali et al., 2011**).

II. 1. Résultats de l'extraction d'ADN par la méthode CTAB

A partir des jeunes feuilles de chacun des huit écotypes, nous avons extrait l'ADN par la méthode de CTAB (Murray et Thompson, 1980). L'ADN extrait est claire.

Après migration de l'ADN extrait sur le gel d'agarose à 1%, on observe des bandes d'intensité moyenne (Annexe II (Figure 1)).

II. 2. Résultats de la qualité de l'ADN

Les quantités d'ADN révélées par spectrophotométrie sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau X: Concentration de l'ADN extrait par CTAB et le rapport 260/280

Individus	Concentration d'ADN extrait par CTAB (ng/μg)	Do260/Do280
Tf1	12.5	2.31
Ta2	107.6	2.02
Tf3	66.2	2.01
Tf4	73	2.02
Tl5	88.3	2.05
Tl6	62.8	2.20
Tf7	57.3	2.11
Tf8	69.8	2.09

Tf1 (*Thymus fontanesii* de village (Tablat)), **Ta2** (*Thymus algériensis* de Gouray), **Tf3** (*Thymus fontanesii* de Ouled anter), **Tf4** (*Thymus fontanesii* de Bouaichoune), **Tl5** (*Thymus lanceolatus* de Z'mala (Tablat)), **Tl6** (*Thymus lanceolatus* de Ouled anter), **Tf7** (*Thymus fontanesii* de Z'mala (Tablat)), **Tf8** (*Thymus fontanesii* de Ouamri).

Selon les résultats consignés dans le tableau X on remarque que :

La qualité d'ADN des huit écotypes a été vérifiée par le rapport DO260/DO280 elle est comprise entre 2.01 et 2.3, dans la quelle la valeur la plus élève de rapport (2.31) est présentée chez l'écotype Tf1 puis Tl6 (2.20) et Tf7 (2.11) ce qui montre que le degré de pureté de l'ADN extrait chez ces écotypes est moyen et probablement dû que l'ADN extrait est contaminée au phénol ou certains impuretés.

Alors que l'écotype Ta2, Tf3, Tf4 et Tl5 possèdent des valeurs proche à 2 ce qui montre que l'ADN extrait de ces écotypes est pure. Ce qui est conforme à la norme de Samrook et Russel. (2001) : qui précise que le rapport DO260/DO280 doit être compris entre 1.8 et 2.

Donc : l'ADN extrait des huit écotypes est pur et de bonne qualité chez les écotypes Ta2, Tf3, Tf4 et Tl5, et moyennement pure chez les écotypes Tf1, Tl6 et Tf7.

II. 3. Résultats de l'amplification de l'ADN

Les tests d'amplifications utilisant les quatre amorces ont été effectués sur l'ADN extrait de huit écotypes du genre *Thymus*.

Les produits des amplifications sont testés sur le gel d'agarose à 2% en présence de deux marqueurs d'ADN : marqueur de taille 1Kb (1Kb DNA Ladder, invitrogen. Cat : 15615-016), pour les deux amorces (OPAG-02, OPAN-08). Et un marqueur de taille 100pb (100pb DAN Ladder, invitrogen. Cat : 15628-019) pour les deux amorces (OPD-19, OPJ-08).

Les quatre RAPD sont amplifiés (AnnexeII). L'intensité des bandes obtenues varie d'une amorce à une autre.

II. 3. 1. Analyse des RAPD

- **Amorce OPAG-02**

Les bandes générées par l'amorce OPAG-02 sont présentées dans le tableau XI:

Tableau XI: Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPAG-02

OPAG-02	N° bandes	PM bandes (pb)	Tf1	Ta2	Tf3	Tf4	Tl5	Tl6	Tf7	Tf8
	1	3500	0	1	0	0	0	0	0	0
	2	3000	0	1	0	0	0	0	0	0
	3	2500	1	0	0	0	0	1	0	0
	4	1700	1	0	1	1	0	0	1	1
	5	1300	1	0	1	1	0	0	1	1
	6	1000	0	1	1	1	0	1	1	1
	7	400	1	1	1	1	1	1	1	1
	Σ des bandes totales =7			4	4	4	4	1	3	4
Σ des bandes polymorphes = 6		P% de Polymorphes = 85.71%								

D'après les résultats du tableau XI on constate que la taille des fragments générés par cette amorce est comprise entre 400 et 3500pb, selon l'échelle du marqueur moléculaire d'ADN 1Kb (1Kb DNA Ladder, invitrogen. Cat : 15615-016), avec un polymorphisme de 85.71%.

Parmi les 7 bandes distinctes révélées, 6 bandes sont polymorphes numérotées de 1 à 6 avec un poids moléculaire de 3500, 3000, 2500, 1700, 1300, et 1000 respectivement. Et une seule bande monomorphe (7) dont la taille est de 400pb.

Les écotypes Tf1 (*Thymus fontanesii* 1), Ta2 (*thymus algériensis* 2), Tf3 (*Thymus fontanesii* 3), Tf4 (*Thymus fontanesii* 4), Tf7 (*Thymus fontanesii* 7) et Tf8 (*Thymus fontanesii* 8) ont 4 bandes dont 3 sont polymorphes, Tl5 (*Thymus lanceolatus* 5) possède une seule bande monomorphes et aucune bande polymorphe, alors que Tl6 (*Thymus lanceolatus* 6) possède 3 bandes dont 2 sont polymorphes.

Pour l'amorce OPAG-02 tous les écotypes de l'espèce *Thymus fontanesii* et l'espèce *Thymus algérisis* possèdent un grand nombre des bandes.

- **OPAN – 08**

Les bandes générées par l'amorce OPAN-08 sont regroupées dans le tableau XII:

Tableau XII: Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPAN-08

OPAN-08	N° Bandes	PM Bandes (pb)	Tf1	Ta2	Tf3	Tf4	Tl5	Tl6	Tf7	Tf8
	1	3000	0	0	1	1	0	1	1	1
	2	1500	0	0	0	1	1	1	1	1
	3	1300	0	0	1	0	0	1	0	0
	4	1100	0	0	0	0	1	1	0	1
	5	1090	0	0	1	0	0	0	1	0
	6	1000	0	1	0	0	1	1	0	0
	7	900	0	0	0	0	1	1	0	0
	8	700	0	1	0	1	1	1	0	0
	9	650	1	1	1	1	0	1	1	1
	10	500	1	0	0	0	1	1	1	1
	Σ bandes totales = 10			2	3	4	4	6	9	5
Σ bandes polymorphe = 10		P% de polymorphe : 100%								

Selon les résultats du tableau XII, il apparait que la taille des fragments générés par l'amorce OPAN-08 est comprise entre 500 et 3000pb, selon l'échelle du marqueur moléculaire d'ADN 1Kb (1 Kb DNA Ladder, invitrogen. Cat : 15615-016), avec un pourcentage de 100% polymorphe.

Les 10 bandes distinctes sont toutes polymorphes, correspondant aux numéros suivants : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Aucune bande monomorphe.

L'écotype Tf1 possède 2 bande polymorphes, Ta2 a 3 bandes polymorphes, Tf3 et Tf4 possèdent 4 bandes polymorphes, Tl5 a 6 bandes polymorphes alors que Tl6 possède 9 bandes polymorphes et Tf7, Tf8 ont 5 bandes polymorphes.

Cette amorce révèle un grand nombre de bandes pour l'écotype TL6.

- **OPD – 19**

Les bandes générées par l'amorce OPD-19 sont présentées dans le tableau XIII:

Tableau XIII: Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPD-19.

	N° Bandes	PM Bandes (pb)	Tf1	Ta2	Tf3	Tf4	Tl5	Tl6	Tf7	Tf8
OPD-19	1	2100	0	0	1	1	0	0	0	1
	2	1500	1	0	0	0	0	0	1	0
	3	800	0	0	1	1	0	0	0	1
	4	600	0	0	1	1	0	0	0	1
	5	500	1	1	1	1	0	1	1	1
	6	370	0	1	0	1	0	0	1	0
	7	320	0	0	0	0	0	0	1	0
	8	280	0	0	0	0	0	0	1	1
	9	230	0	1	0	0	0	0	1	1
	10	200	0	0	0	1	0	0	0	0
	Σ bandes totales = 10			2	3	4	6	0	1	6
Σ bandes polymorphes = 10			P% de polymorphe : 100%							

D'après les résultats du tableau XIII, on remarque que la taille des fragments générés par cette amorce est comprise entre 200 et 2100pb, selon l'échelle du marqueur moléculaire d'ADN 100pb, (100pb DNA Ladder, invitrogen. Cat : 15628-019) avec un polymorphisme de 100%.

Les 10 bandes distinctes sont toutes polymorphes et les numéros des bandes : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10. Toute fois, aucune bande monomorphe n'est révélée.

L'écotype Tf1 (*Thymus fontanesii* 1), possède 2 bandes polymorphes, alors que Ta2 (*Thymus algériensis* 2) a 3 bandes polymorphes. Tf3 (*Thymus fontanesii* 3) possède 4 bandes, les 4 sont polymorphes, Tf4, Tf7 et Tf8 (*Thymus fontanesii* 4, *Thymus fontanesii* 7, *Thymus fontanesii* 8) possèdent 6 bandes polymorphes, alors que Tl6 (*Thymus lanceolatus* 6), a 1 bande polymorphe. Concernant Tl5 (*Thymus lanceolatus* 5), il ne présente aucune bande.

Cette amorce révèle un grand nombre de bandes pour les écotypes Tf4, Tf7 et Tf8.

- **OPJ – 08**

Les bandes générées par l'amorce OPJ-08 sont consignées dans le tableau XIV:

Tableau XIV: Analyse par RAPD des huit écotypes générés par l'amorce OPJ-08.

	N° Bandes	PM Bandes (pb)	Tf1	Ta2	Tf3	Tf4	Tf5	Tf6	Tf7	Tf8
OPJ-08	1	2000	0	0	0	1	0	0	0	0
	2	1800	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	1600	0	1	0	0	0	0	0	1
	4	1000	0	0	0	0	0	1	0	0
	5	700	1	0	0	1	0	0	0	1
	6	500	0	1	0	0	0	0	0	0
	7	400	1	1	0	0	0	1	1	1
	8	380	1	0	0	0	0	0	0	1
	9	300	0	1	0	1	0	0	1	1
	10	260	1	0	1	0	0	0	0	1
	11	200	0	1	1	0	0	1	0	1
	12	150	0	1	0	0	0	0	0	1
	Σ bandes totales =12			4	6	2	3	0	3	2
Σ bandes polymorphes = 12			P % de polymorphe = 100%							

D'après les résultats du tableau XIV on constate que la taille des fragments générés par cette amorce est comprise entre 150 et 2000pb, selon l'échelle de marqueur moléculaire d'ADN 100pb (100pb DNA Ladder, invitrogen. Cat : 15628-019), avec un polymorphisme de 100%.

Les 12 bandes distinctes sont toutes polymorphes, avec les numéros de 1 à 12 bandes. Aucune bande monomorphes n'est révélée.

L'écotype Tf1 possède 4 bandes polymorphes par ailleurs l'écotype Ta2 possède 6 bandes polymorphes. Tf3 et Tf7 possèdent 2 bandes polymorphes. Tf4 et Tf6 ont 3 bandes, les trois sont polymorphes, et Tf8 possède 8 bandes polymorphes. Cependant, pour Tf5 aucune bande n'est distinguée.

L'amorce OPJ- 08 se révèle avoir le nombre le plus élevé de bandes pour l'écotype Tf8.

II. 3. 2. Comparaison des différents produits RAPD

La somme de bandes produites par les quatre amorces RAPD est présentée dans le tableau suivant :

Tableau XV : Bandes produites par les quatre amorces RAPD

Amorces	N° tb	N° t bp	N° bm	P%	PM des fragments
OPAG-02	7	6	1	85.71%	3500-400
OPAN-08	10	10	0	100%	3000-500
OPD-19	10	10	0	100%	2100-200
OPJ-08	12	12	0	100%	2000-150
$\Sigma=$	39	38	1	96.43%	3500-150

Les quatre amorces RAPD utilisées sur les huit écotypes génèrent un totale de 39 bandes révélées avec des fragments allant de 150 à 3500pb. 38 bandes sont polymorphes avec un pourcentage de 96.43% et une seule bande monomorphe distinguée par l'amorce OPAG-02.

Le nombre le plus élevé des bandes (12) est révélé par l'amorce OPJ-08 avec un pourcentage de 100% des bandes polymorphes, et la taille des fragments allant de 150 à 2000pb. Alors que pour les amorces OPAN-08 et OPD-19 révèlent 10 bandes polymorphes avec 100% de polymorphisme. Par ailleurs, l'amorce OPAG-02 révèle le nombre le plus faible de bandes (7) dont 6 bandes sont polymorphes avec un pourcentage 85.71% de polymorphe.

II. 4. Analyse multi variables

II. 4. 1. Analyse des composantes principales ACP

Les analyses des composantes principales (ACP) des écotypes du genre *Thymus* sont déterminées à l'aide d'un logiciel « PAST 3.0 ».

a. Pourcentage de la variance

Le pourcentage de la variance totale expliquée par chaque axe est mentionné dans le tableau XVI.

Tableau XVI : Variance totale expliquée par les axes de l'ACP (Pourcentage expliqué par les axes principaux) des valeurs propres.

Axes	Valeurs propres	Cumul	% Total variance	% Total Cumul
1	2,437954	2,437954	60,94885	60,9489
2	0,752539	3,190494	18,81348	79,7623
3	0,603339	3,793833	15,08348	94,8458

4	0,206167	4,000000	5,15418	100,0000
---	----------	----------	---------	----------

D'après les résultats qui sont mentionnés dans le tableau XVI, on constate que le premier axe révèle 60.94% de la variance totale, suivis par 18.81% pour le 2ème axe. Cette même variance devient décroissante à partir de 15.08% (Axe3) et 5.15% (Axe4).

Le premier axe représente une bonne description de la dispersion des individus, car il présente la majorité de la variance totale.

Cette différenciation des valeurs entre les axes explique qu'il ya une bonne séparation entre ces dernies.

Le cumul atteint jusqu'à 79.76% (axe 2), explique l'importance de la contribution de chaque variable (Amorces).

b. Valeur propre des variables

Les valeurs propres des variables sur les quatre axes sont mentionnées dans le tableau XVII et la figure 16 :

Tableau XVII: Contribution des variables sur les axes principaux

Amorces	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4
OPAG-02	0,351819	0,002631	0,018156	0,627395
OPAN-08	0,164925	0,757515	0,029886	0,047674
OPD-19	0,268271	0,059084	0,409966	0,262678
OPJ-08	0,214985	0,180769	0,541992	0,062253

Selon les résultats de tableau XVII on remarque que :

L'axe 1 représenté par l'amorce OPAG-02 à valeur de 0.351, alors que l'axe 2 est représenté par l'amorce OPAN-08, à valeur de 0.757 concernant l'axe 3 il est représenté par les deux amorces OPD-19 et OPJ-08 dont les valeurs de contribution sont 0.409 et 0.54.

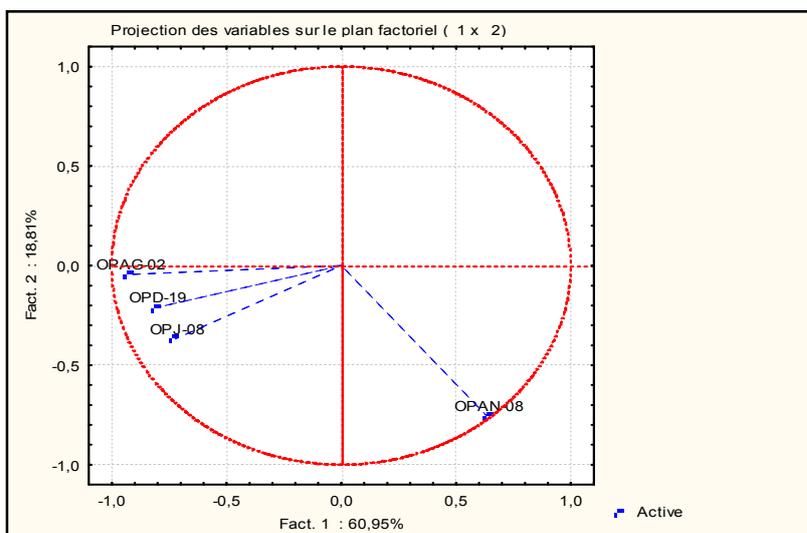


Figure 16: Diagramme d'ordination des variables dérivées de l'ACP dans le plan de projection de des axes 1 et 2.

L'étude de la contribution absolue (somme absolue de la contribution de chaque variable) permet d'hierarchiser les caractères responsables de la formation de chaque axe (Tableau XVII) et (Figure17).

Tableau XVIII: Valeurs propres des coordonnées sur les axes principaux

	Axe 1	Axe 2	Axe 3	Axe 4
Tf1	0.57134	-1.172	-0.70969	0.35926
Ta2	0.96645	-0.3209	-0.94763	0.048744
Tf3	0.25193	-0.48726	0.57629	0.33534
Tf4	0.87021	-0.11431	0.81835	-0.19298
Tl5	-3.032	-0.55653	-0.12296	-0.62493
Tl6	-1.7252	1.3807	-0.23948	0.65275
Tf7	0.49383	0.1264	1.1935	0.0094647
Tf8	1.6035	1.1439	-0.56837	-0.58765

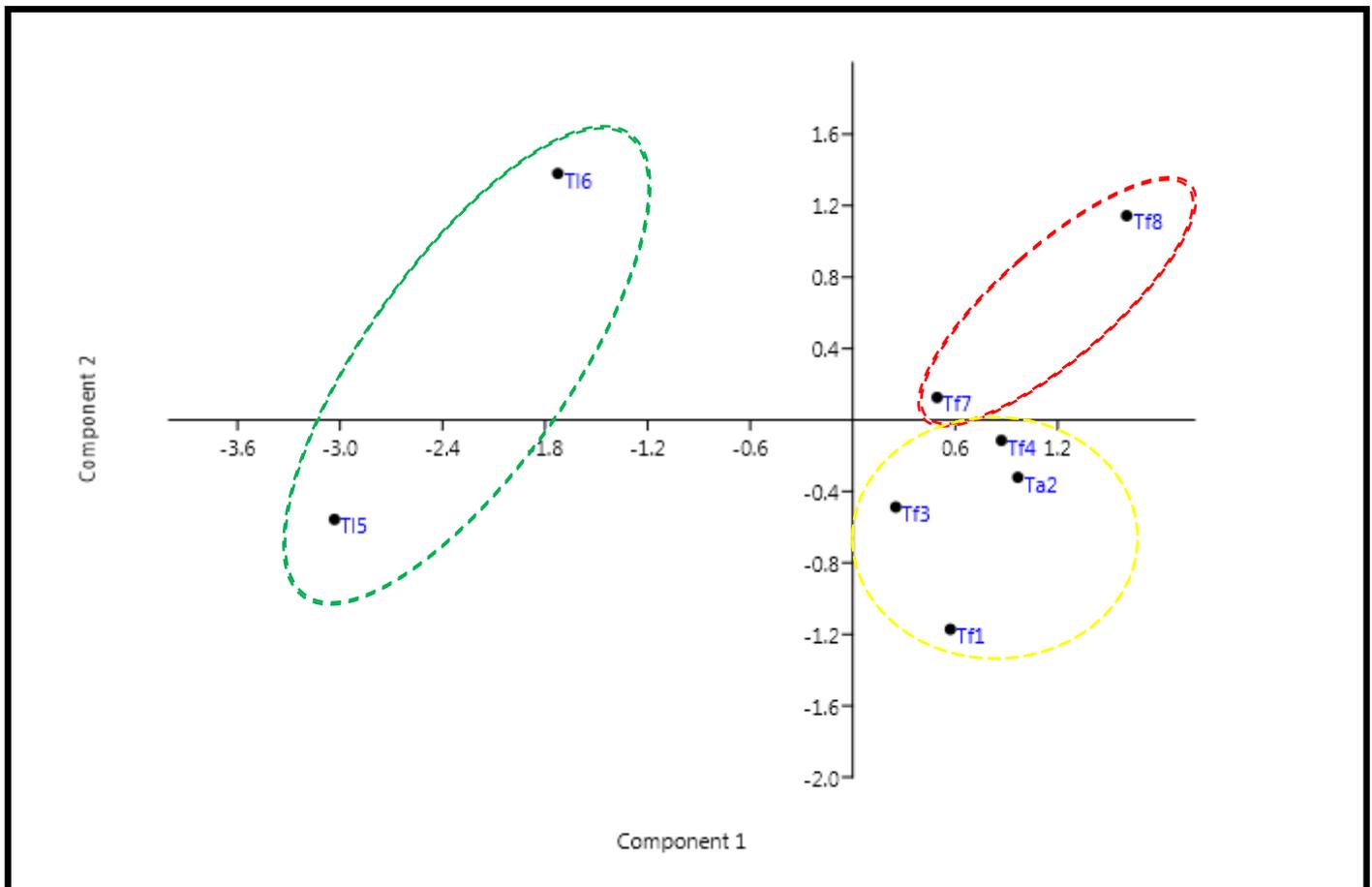


Figure 17: Analyses des composantes principales (ACP) des huit écotypes selon les axes 1 et 2.

Les huit écotypes sont distribués en quatre groupes sur le plan de projection des axes.

- Le premier groupe situé positivement par rapport aux axes des composants 1 et 2 est représenté par les écotypes de *Thymus fontanesii* (Tf7 ; *Thymus fontanesii* de Z'mala et

Tf8 ; *Thymus fontanesii* de Ouamri). Ils ont une ressemblance des composantes principales (les composés de la formulation de la plante).

- Le deuxième groupe situé positivement par rapport à l'axe des composants 1 et négativement par rapport à l'axe des composants 2, qui représenté les écotypes de *Thymus fontanesii* (Tf1 ; *Thymus fontanesii* du village (Tablat), Tf3 ; *Thymus fontanesii* de Ouled anter et Tf4 ; *Thymus fontanesii* de Bouaichoune) et *Thymus algériensis* (Ta2 ; *Thymus algériensis* de Gouraya). Ils ont une similitude des composants principaux (les composés de la formulation de la plante).
- Le troisième groupe situé négativement par rapport à l'axe des composants 1 est représenté par les écotypes de *Thymus lanceolatus* (Tl5 *Thymus lanceolatus* de Z'mala et Tl6 *Thymus lanceolatus* de Ouled anter). Ils ont une ressemblance des composantes principales (les composés de la formulation de la plante).

Ta2 est retrouvé parmi les écotypes de l'espèce *Thymus fontanesii*, cela signifié que *Thymus algériensis* de Gouraya à une ressemblance des composantes principales avec les écotypes de *Thymus fontanesii* (de Village (Tablat), de Ouled anter et de Bouaichoune).

II. 5. Analyses des coordonnées principales ACoP

Les analyses des coordonnées principales ACoP des écotypes du genre *Thymus* sont déterminées à l'aide d'un logiciel PAST 3.0.

a. Pourcentage de la variance

Le pourcentage de la variance totale expliquée par chaque axe est mentionné dans le tableau XVIII

Tableau XIX: Valeurs propres expliquées par les axes d'ACoP

Axes	Valeur propre	% Total variance	Cumul	% Total cumul
1	0.43241	67.044%	0,43241	67,044
2	0.10759	16.681%	0,54	83,725
3	0.053274	8.2599%	0,593274	91,9849
4	0.028158	4.3658%	0,621432	96,3507

D'après les résultats mentionnés dans le tableau XIX, on constate que le premier axe recèle 67.04% de la variance totale suivis par 16.68 pour le 2ème axe et décroissant à partir de 8.25% (Axe 3) et 4.36% (Axe 4).

Le premier axe représente une bonne description de la dispersion des individus, car il présente la majorité de la variance totale.

Cette différenciation des valeurs entre les axes explique qu'il ya une bonne séparation entre ces derniers.

Le cumul atteint jusqu'à 83.72% (axe 2), ce qui explique l'importance de la contribution de chaque variable.

b. Valeur propre des variables

Les valeurs propres des variables sur les quatre axes sont mentionnées dans le tableau suivant :

Tableau XX: Valeurs propres des variables sur les quatre axes

Espèces	Coord 1	Coord 2	Coord 3	Coord 4
Tf1	-0.064	0.631	-0.264	-0.315
Ta2	-0.196	0.402	-0.151	0.545
Tf3	-0.063	-0.0774	-0.295	-0.250
Tf4	-0.225	-0.179	0.085	-0.439
Tl5	0.746	-0.256	-0.354	0.241
Tl6	0.376	0.215	0.802	-0.073
Tf7	-0.146	-0.462	-0.028	-0.201
Tf8	-0.426	-0.273	0.206	0.493

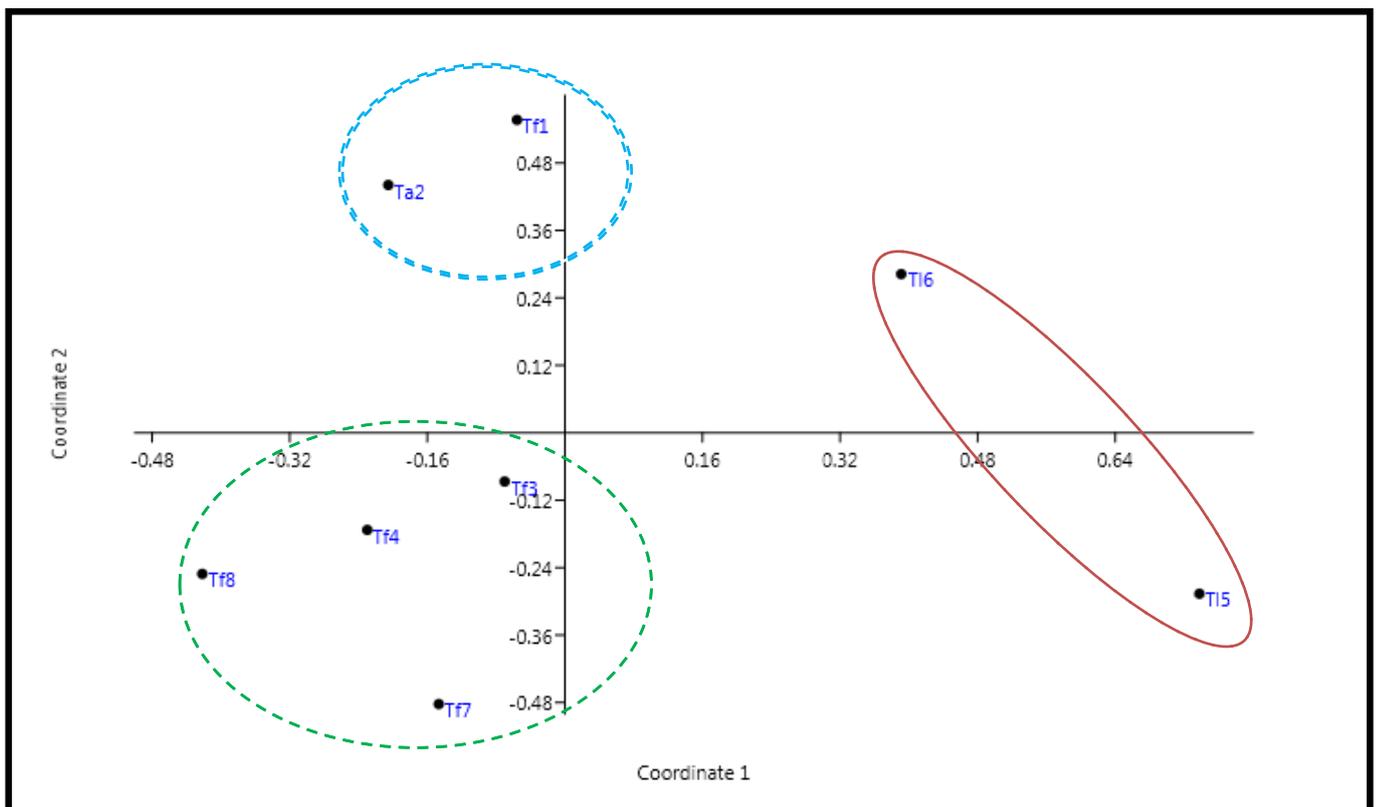


Figure 18 : Analyses des coordonnées principales (ACoP) des huit écotypes générées à partir de l'indice de Gower tracées selon les axes 1 et 2.

Les huit écotypes sont distribués en trois groupes sur le plan de projection des axes.

- Le premier groupe situé positivement par rapport à l'axe des coordonnées 1, représenté par les écotypes de *Thymus lanceolatus* (Tl5 ; *Thymus lanceolatus* de Z'mala et Tl6 ; *Thymus lanceolatus* de Ouled anter) et sont génétiquement liés.
- Le deuxième groupe situé négativement par rapport aux deux axes des coordonnées 1 et 2, est représenté par les écotypes de *Thymus fontanesii* (Tf3 ; *Thymus fontanesii* de Ouled anter, Tf4 ; *Thymus fontanesii* de Bouaichone, Tf7 ; *Thymus fontanesii* de Z'mala et Tf8 ; *Thymus fontanesii* de Ouamri), et sont génétiquement liés entre eux.
- Le troisième groupe situé positivement par rapport à l'axe des coordonnées 2 et négativement par rapport à l'axe des coordonnées 1, est représenté par l'écotype de *Thymus algériensis* (Ta2 ; *Thymus algériensis* de Gouray) et l'écotype de *Thymus fontanesii* (Tf1 ; *Thymus fontanesii* de Village (Tablat)).

Tf1 est un écotype de l'espèce *Thymus fontanesii* mais il est englobé dans le groupe de *Thymus algériensis*, se sont deux individus de deux espèces différentes mais sont génétiquement proche.

II. 6. Indices de diversité et similarité

II. 6. 1. Indice de diversité de huit écotypes

Les indices de diversité (indice de Simpson et indice de Shannon) de huit écotypes du genre *Thymus* sont déterminés à l'aide d'un logiciel "PAST 3.0" et sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau XXI: Indices de diversité de huit écotypes du genre *Thymus*.

Indice de diversité	Tf1	Ta2	Tf3	Tf4	Tl5	Tl6	Tf7	Tf8
Dominances D	0.2776	0.2734	0.2653	0.2664	0.7551	0.3906	0.2803	0.2665
Simpson 1-D	0.7336	0.7347	0.7266	0.7222	0.2449	0.6094	0.7197	0.7335
Shannon H	1.33	1.342	1.352	1.355	0.4101	1.125	1.32	1.354

D'après les résultats de tableau XXI on remarque que :

La valeur la plus élevée de la dominance est celle de l'écotype Tl5 (*Thymus lanceolatus* de Z'mala (Tablat), égale a valeur de 0.755, puis Tl6 (*Thymus lanceolatus* de Ouled anter).

La valeur de Simpson la plus élevée est celle de l'écotype Ta2 (*Thymus algériensis* de Gouraya) avoisinant 0.734, suivis de l'écotype Tf1 (*Thymus fontanesii* du Village (Tablat) à valeur de 0.7336.

Concernant l'indice de Shannon, la valeur la plus élevée est celle de l'écotype Tf4 (*Thymus fontanesii* de Bouaichoune) à valeur de 1.355.

Thymus lanceolatus de Z'mala (Tabalt), est l'écotype le plus dominant par rapport aux autres écotypes. Alors que, l'écotype *Thymus algériensis* de Gouraya a une diversité spécifique plus élevée à la diversité spécifique des autres écotypes. En revanche, l'écotype *Thymus fontanesii* de Bouaichoune à une diversité plus élevée par rapport aux autres écotypes.

II. 6. 2. Indice de diversité de trois espèces étudiée

Les indices de diversité (indice de Dominance D, indice de Simpson et indice de Shannon) de trois espèces étudiées sont déterminés à l'aide d'un logiciel "PAST 3.0" et sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau XXII: Indices de diversité de trois espèces du genre *Thymus*

Indices de similarité	<i>Thymus fontanesii</i>	<i>Thymus algériensis</i>	<i>Thymus lanceolatus</i>
Dominance D	0.2712	0.2734	0.5728
Simpson 1-D	0.7271	0.7347	0.4271
Shannon H	1.342	1.342	0.7675

D'après les résultats de tableau XXII on remarque que :

La valeur la plus élevés de la dominance est celle de *Thymus lanceolatus* égale à 0.572, puis *Thymus algériensis* (0.273) et *Thymus fontanesii* (0,2712).

Alors que la valeur de Simpson la plus élevé est celle de *Thymus algériensis* égale à 0.734, suivis *Thymus fontanesii* (0.727) et *Thymus lanceolatus* (0.427).

Concernant l'indice de Shannon, la valeur la plus élevée est une valeur identique entre *Thymus fontanessii* et *Thymus algériensis* égale à 1.342, et une valeur de 0.767 pour *Thymus lanceolatus*.

Toute fois, *Thymus lanceolatus* présente une dominance plus élevé par rapport au *Thymus fontansii* et *Thymus algériensis*. Par ailleurs, *Thymus fontanesii* et *Thymus algériensis* ont une diversité élevée à la diversité de *Thymus lanceolatus*. En revanche, *Thymus algériensis* a une diversité spécifique et élevé aux diversités de *Thymus fontanesii* et *Thymus lanceolatus*.

Donc *Thymus algériensis* est le plus diversifié par rapport les deux espèces *Thymus fontanesii* et *Thymus lanceolatus*.

II. 6. 3. Matrice de similarité (Indice de Gower)

Les valeurs de similarité entre les huit écotypes selon l'indice de Gower sont présentées dans le tableau XXIII :

Tableau XXIII: Matrice de similarité des huit écotypes

	Tf1	Ta2	Tf3	Tf4	Tl5	Tl6	Tf7
Ta2	0,139	0					
Tf3	0,217	0,202	0				
Tf4	0,269	0,254	0,114	0			
Tl5	0,601	0,669	0,550	0,665	0		
Tl6	0,406	0,474	0,418	0,470	0,409	0	
Tf7	0,336	0,321	0,119	0,066	0,598	0,465	0
Tf8	0,398	0,258	0,306	0,191	0,785	0,590	0,187

Selon la matrice de similarité on remarque que la grande valeur de similarité (0.758) est entre Tl5 (*Thymus lanceolatus* de z'mala) et Tf8 (*Thymus fontanesii* de Ouamri), ce qui démontre que les deux individus sont fortement similaires.

Alors que la valeur la plus faible (0.066) est entre Tf4 (*Thymus fontanesii* de Bouaichoune) et Tf7 (*Thymus fontanesii* de z'mala), ce qui démontre que les deux individus ne sont pas similaires.

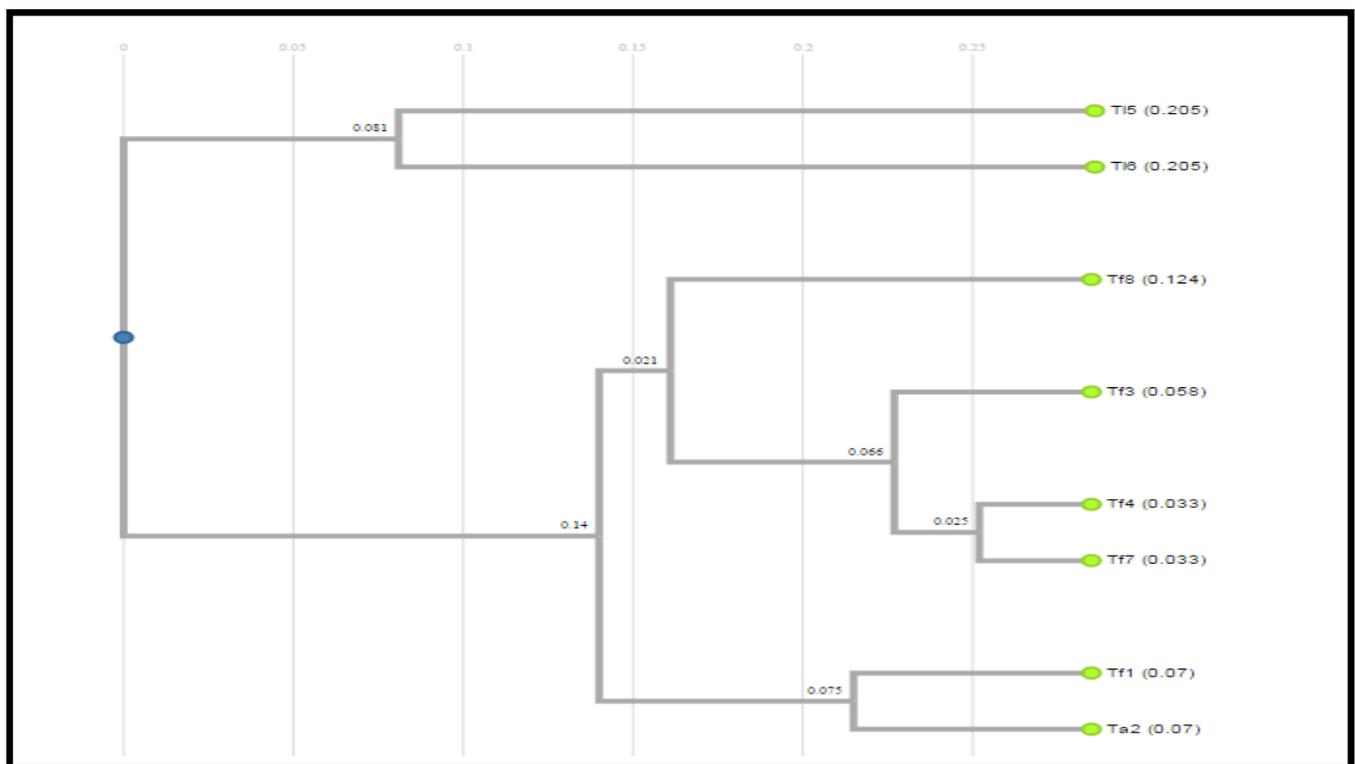


Figure 19: Dendrogramme UPGMA des marqueurs RAPD basé sur l'indice de similarité de Gower des huit écotypes de trois espèces du genre *Thymus*.

La classification hiérarchique représentée par le dendrogramme a démontré que les huit écotypes sont regroupés en deux groupes :

- Un groupe correspondant aux individus de l'espèce *Thymus lanceolatus* (Tl5 et Tl6).
- Un deuxième groupe divisé en deux sous groupes : un sous groupe correspondant aux individus de l'espèce *Thymus fontanesii* (Tf3, Tf4, Tf7, Tf8), et un sous groupe correspondant à l'espèce *Thymus algériensis* (Ta2) et un individu de l'espèce *Thymus fontanesii* (Tf1).

L'analyse UPGMA (dendrogramme) divise les écotypes en deux groupes distincts : un groupe représenté par l'espèce *Thymus lanceolatus* et un groupe divisé en deux branches : une représentant l'espèce *Thymus fontanessi* et une autre représentant *Thymus algériensis* indique une séparation génétique bien distinguée entre les trois taxons, en raison des barrières reproductives interspécifiques.

Ce travail est réalisé au sein de Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants) Alger, L'objectif de cette étude est de rechercher une relation génétique entre trois espèces du genre *Thymus* (*Thymus fontanesii* Boiss et Reut, *Thymus algériensis*, *Thymus lanceolatus* Desf), par utilisation d'un marqueur moléculaire RAPD.

A la lumière des résultats obtenus lors de cette étude, nous pouvons constater que :

L'usage du protocole de Murray et Thompson (1980) a permis d'obtenir, à partir des feuilles vertes des huit écotypes, des extraits d'ADN purs et de bonne qualité chez les écotypes Ta2, Tf3, Tf4 et Tl5, et moyennement purs chez les écotypes Tf1, Tl6 et Tf7.

L'analyse de ces huit écotypes par les marqueurs RAPD a permis de déceler significativement leur différenciation. Les 4 amorces utilisées en PCR pour amplifier l'ADN extrait de chaque écotype ont générés 39 bandes dont 38 polymorphes (96.43%).

Concernant, l'analyse des composantes principales (ACP), elle a organisé les huit écotype en trois groupes, chaque groupe représenté des écotypes ayant une ressemblance des composantes principales et l'analyse des coordonnées principales (ACoP) a montré que l'écotype *Thymus fontanesii* du Village (Tablat) est proche génétiquement à l'écotype *Thymus algériensis* de Gouraya.

Par ailleurs, l'indice de diversité de huit écotypes a montré que l'écotype le plus dominant est l'écotype Tl5 (*Thymus lanceolatus* de Z'mala (Tablat)) et la diversité la plus élevée est celle de l'écotype Tf4 (*Thymus fontanessii* de Bouaichoune) alors que, la diversité spécifique la plus élevée est celle de l'écotype Ta2 (*Thymus algériensis* de Gouraya).

l'indices de diversité de huit écotypes a montré que l'espèce la plus dominante est l'espèce *Thymus lanceolatus*, par contre, l'espèce la plus diversifiée spécifiquement est l'espèce *Thymus algériensis*.

Le dendrogramme construit à l'issue de la combinaison de l'indice de similarité de Gower par logiciel UPGMA a classé les huit écotypes en deux groupes, groupe représentant les écotypes de l'espèce *Thymus lanceolatus* et le deuxième groupes divisé en deux branches, le premier est représenté au les écotypes de l'espèce *Thymus fontanesii* et la deuxième branche est représentée

par l'écotype de l'espèce *Thymus algériensis* et un écotype de l'espèce *Thymus fontensii* du Village (Tablat), ces résultats confirment ceux de l'analyse des coordonnées principales (ACoP).

La recherche de la variation génétique avec le marqueur RAPD a indiqué que ce marqueur est adapté pour déterminer des loci polymorphes chez les différentes populations de trois espèces du genre *Thymus* et d'évaluer leur distance génétique.

Par cette étude, on a pu mettre en évidence un polymorphisme génétique entre les différents écotypes appartenant aux trois espèces du genre *Thymus*, ainsi qu'un polymorphisme inter-spécifique.

Pour pouvoir mettre en évidence un polymorphisme quelconque chez les espèces du genre *Thymus*, il serait préférable d'augmenter le nombre des amorces RAPD, ainsi que l'effectif des échantillons étudiés (écotypes).

Par conséquent, nos résultats fournissent des indications pour l'identification des espèces du genre *Thymus*.

Listes des références

- **Abdelkefi A., Biborchi A., Boussaid M., Marrakchi M., 1997.** Marqueurs isoenzymatiques et structures génotypiques de populations spontanées d'espèces du genre *Medicago*. 6^{ème} journées scientifiques du réseau biotechnologies végétales AUPELF UREF Orsay. P 447.
- **Alamdary S. B. L., Safarnejad A et Rezaee M., 2011.** Evaluation of Genetic Variation between *Thymus* Accessions Using Molecular Markers. J. Basic. Appl. Sci. Res. 1(12) 2552-2556.
- **Alix Lefief-Delcourt., 2013.** Les herbes aromatiques, c'est malin. Edition Quotidien Malin. P 42.
- **Allinne Clémentine., 2009.** Modélisation écophysiological et analyse génétique pour la recherche de génotypes de tournesol adaptés aux basses températures causées par des semis précoces. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. P 35.
- **Amrani Nadia., Matheus Sachs et Allain Jacobson., 2006.** Early nonsense; mRNA decay solves a translational problem. Nature Reviews Molecular Cell Biology 7, P 415.
- **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: P 387-406.
- **Anonyme I., 2014.** Nom Arabe. *Thymus* plante use. Www. Plantnet. Project. org.
- **Anonyme II., 2012.** Les données climatiques pour les villes du monde entier. Www. Climate DATA. org.
- **Anonyme III., 2013.** Cities, Town and villages of the world. en.db-city.com.
- **Anonyme IV., 2015.** /fr.wikipedia.org/wiki/Wilaya_de_Médéa / Wilaya_de_Tipaza.

- **Bagherzadeh F., 2009.** Genetic diversity assessment of thyme and evaluation of relationship using RAPD marker [MSc thesis.]. Iran: Ferdowsy University.
- **Bazylko A et Strzelecka H., 2007.** *Fitoterapia.*, **78** : 391-395.
- **Benabid A., 2000.** Flore et écosystème du Maroc: evaluation et présentation de la biodiversité Ibis Press. Paris. P 357.
- **Ben El Hadj Ali Imen., Arbi Guetat and Mohamed Boussaid., 2011.** Inter-specific relationships among two Tunisian Thymus taxa: *Thymus capitatus Hofm.* And *Thymus algeriensis* Boiss et Reut. Using molecular markers. Tunisia. African Journal of Biotechnology Vol. 11(36), P 8810-8819.
- **Breton C., Tersac M et Bervillé A., 2006.** Genetic and gen flow between the wild olive (oleaster, *Olea europaea* L) and the olive: several Pliocene-pleistocene refuge zones in the Mediterranean basin suggested by simple sequence repeats analysis, *J Biogeogr* 33: 1916-1928.
- **Brostein D., White RL., Skolnick M., Davis RW., 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 32: 314- 331.
- **Brown A.H.D., 1978.** Isozymes, plant populations genetic structures and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52: 145-147.
- **Bruneton Jean., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, monoterpènes et sesquiterpènes; TEC et DOC, 3eme édition, Lavoisier. Paris. P 484-647.
- **Bruneton Jean., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4^e, ed). Lavoisier.P 647.
- **Carter T E., Nelson R L., Sneller C H et Cui Z., 2004.** Soybeans : Improvement, Production and uses. Third edition. Number 16 the series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science Society of America, Inc. Publishers. Madison, Wisconsin, USA, P 303-416.

- **Chalmers, K J., Waugh R., Sprent J I., A J Simons, W Powell., 1992.** Detction of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. maculate* using RAPD markers, *Heredity*, 69: 465.

- **Chao S., Sharp P J., Worland A J., Warham, E J., Koebner, R M D., Gale, M D., 1989.** RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78: 495-504.

- **Cheng K. T., Chang H. C., Su C. H., et Hsu F.L., 1997.** Identification of dried rhizomes of *Coptis* species using random amplified polymorphic DNA. *Bot Bull Acad Sin.*38:241-44.

- **Cheng K. T., Tsay H. S., Chen C. F., et Chou T.W., 1987.** Determination of components in Chinese prescription Yu-Ping-Feng San, by RAPD analysis. *Planta Med.* 64:563-65.

- **Collins F S., Brooks L D et Chakravarti A., 1998.** DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic varaition. *Genome Res.* 12: P 1229-1231.

- **Couvet D., Gouyon P., Kjellberg F., Olivieri I., Pomente D., et Valdeyron G., 1985.** De la métapopulation au voisinage : la génétique des populations en déséquilibre, *Génét. Sél. Evol.*, 3 :407-414.

- **Cowan M M., 1999.** Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, P 564-582.

- **Cregan P., 2008.** Soybean molecular genetic diversity. In *Genetics and genomics of soybean*. G. Stacey (ed).Springer Science.

- **Cui Z., Carter T E., Burton, J W., 2001.** Genetic base of 651 chine soybean cultivars released during 1923 to 1995. *Corp Sci.* 40: P 1470-1481.

- **Dajoz R., 1975.** Précis d'écologie, Ed. Gauthier-Villars, Paris. P 549.

- **De Vienne D., 1998.** Biotechnologies végétales, Les marqueurs moléculaires et leurs applications. CNED. Paris. P 118.

- **Dob T., Dahmane D., Benabdelkader T., Chelghoum C., 2006.** Studies on the essential oil composition and antimicrobial activity of *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. *Int J Aromather* 16: 95–100.
- **Elisabeth Stahl-Biskup et Francisco Saez., 2002.** Thyme. The genus *Thymus*. Taylor et Francis. London and Newyork. P 19-21.
- **Elmer Iquira., 2008.** Evaluation de la diversité génétique chez deux collections de soja à l'aide de marqueurs microsatellite. Département de phytologie, faculté de science de l'agriculture et de l'alimentation. Université de Laval. Québec. P 12.
- **Esra' solyman et Raed Alkowni., 2014.** RAPD for Assessment of Thymes Genetic Diversity in Palestine. Department of Biology and Biotechnology, An-Najah National University, Nablus. *Research Journal*, 2014, 2(2), 01-08.
- **Falque M., et Santoni S., 2004.** Les marqueurs moléculaires, La génomique en biologie végétale, J.F. Morot-Gaudry et J.F. Briat (Eds), INRA Edition, Science update, INRA, Paris, P 349-375.
- **Fordin D. G., 2001.** Guide to standard floras of the world, ed. 2, 1. P 1100.
- **Gallais, A., 2001.** Génétique quantitative. Institut National Agronomique Paris-Grignon. P200.
- **Garnier G., Bezanger-Beauquesne I., Debraux G., 1961.** Ressources médicinales de la flore française. Tome II, *Ed. Vigot Frères*, Paris.
- **Ghannadi A., Sajjadi S. E., Kabouche A., Kabouche Z., 2004.** *Thymus fontanesii* Boiss. & Reut. A potential source of thymol-rich essential oil in North Africa. *Verlag der Zeitschrftflr Naturforschung*, 59: 187 - 189.
- **Giordani R., HadeF Y., Kaloustian J., 2008.** Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. *Fitoterapia* 79: 199-203.

- **Gnis., 1999.** Les biotechnologies de nouveaux horizons pour l'amélioration des plantes. GNIS, Paris. 54fiches. P 98.
- **Gower J.C., 1966.** Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 53: 325–338.
- **Grivet D., 2002.** Phytogéographie et évolution moléculaire comparée d'arbres forestiers à l'aide des marqueurs chloroplastiques. Thèse. Université de Nancy I. France. P29.
- **Haryy M., 2001.** Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine., Paris. P39.
- **Helentjaris T., King G., Slocum M., Sidenstrang C et Wegman S., 1985.** Restriction fragment length polymorphisme as probes for plant diversity and their development as tools for applied plant breeding. *Plant Mol.* 5: P 109-118.
- **Hupfer C., Hotzel H., Sachse K et Engel K.H., 1998.** Detection of the genetic modification in heat treated products of Bt maize by polymerase chain reaction. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A* 206, 203-207.
- **Ingvarssan PK., Garcia M. V., Luquez, V., Hall D., Jansson S., 2008.** Nucleotide polymorphism and phenotypic associations within and around the phytochrome B2 locus in European Aspen (*Populus tremula*, Salicaceae). *Genetics* 178: 2217-2226.
- **Jaccard P., 1908.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Doc. Vaudoise Sci. Nat.* 44 : P 223-270.
- **Jalas J., 1971.** Notes on *Thymus L.* (Labiatae) in Europe. I. Supraspecific classification and nomenclature. *Bot. J. Linn. Soc.* 64 : 199-235.
- **Jorg Grunwald et Christof Jancke., 2004.** Guide de la phytothérapie. Edition Marabout. P 416.

- **Julier B., Flajoulot S., Barre P., Cardinet G., Santoni S., Huguet T., Huyghe, C., 2003.** Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *Bmc Plant Biol*, 3:P 9.
- **Kabouche Z., Boutaghane N., Laggoune S., Kabouche A., Ait-Kaki Z., Benlabed K., 2005.** Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *The international of Aromatherapy*, 15: 129— 133.
- **Khadir A., Bendahou M. F., Benbelaid M. A., Abdoune D.E., Abdelouahid., 2013.** Pouvoir antimicrobien de *Thymus lanceolatus* Desf., récolté en Algérie, Laboratoire de microbiologie appliquée à l'agroalimentaire, au biomédical et à l'environnement, LAMAABE, BP 119, université de Tlemcen, Algérie. P 3.
- **Khalil, R et Li Z., 2012.** Determination of genetic variation and relationship in *Thymus vulgaris* populations in Syria by random RAPD markers. *Plant Biosystems*. 146: 217-225.
- **K. Mullis., F. Faloona., S. Saikir., G. Horn., H. Erlich., 1986.** Specific enzymatic amplification of DNA in Vitro. The polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 24: 17-27.
- **Lipp M., Bluth A., Eyquem F., Kruse L., Schimmel H., Van den Eede G. et Anklam E. (2001).** Validation of a method based on polymerase chain reaction for the detection of genetically modified organisms in various processed foodstuffs. *European Food Research Technology* 212, P 497-504.
- **Manuelle Rovillé., Mustapha wafra., Luis Espinosa., 2010.** LA biodiversité comprendre pou mieux agir. CNRS, Jardins Trocadero-Paris. P5.
- **Mebareki L., 2010.** Analyse comparative de la diversité génétique et de la structure des populations chez l'orge (*Hordeum vulgare* L) à l'aide de marqueurs SSR, DArT et du pedigree.
- **Meyer R et Jaccaud E., 1997.** Detection of genetically modified soya in processed food products: development and validation of PCR assay for the specific detection of glyphosate-tolerant soybeans. 24-26 September 1997. Interlaken **1**, 23-28.

- **Morales R., 1996.** Studies on the genus *Thymus* L. *Lamiales Newsletter*. 4: 6-8.
- **Morales R., 2002.** The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: *Thyme: the genus Thymus*. Ed. *Taylor & Francis, London*. P 1-43.
- **Murray MG et Thompson WF (1980).** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8.
- **Nei M et Li W. H., 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 10: P 5269-5273.
- **Nei M., 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 70: P 3321-3323.
- **Nickavar B., Mojab F., Doulat-Abadi R., 2005.** *Food chemistry* 90(4): 609-611.
- **Padrini F., Lucheroni M. T., 1996.** Le grand livre des huiles essentielles: Guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences et l'aromomassage énergétique avec plus de 100 photographies. Ed. *De Vecchi*, P 15.
- **Parizaeu Marie-hélène., 1997.** La biodiversité. De Boeck et Larcier 1997, Département Boeck et larcier Université Paris Bruxelles. P 121.
- **Paul Goetz., Kamel Chédeia., 2012.** *Phytothérapie, anti-infectieuse*. Springer-Verlag. France. Paris.
- **Pluhár Z., Kocsis M., Kuczmog A., Csete S., Simkó H., Szilvia Sárosi S., Molnár P., et Horváth G., 2012.** Essential oil composition and preliminary molecular study of four Hungarian *Thymus* species. *Acta Biologica Hungarica*. 63: 81-96.
- **Poms R.E., Glössl J et Foissy H., 2001.** Increased sensitivity for detection of specific target DNA in milk by concentration in milk fat. *European Food Research Technology* 213, 361-365.

- **Quezel P et Santa S., 1963.** Nouvelle flore d'Algérie régions désertiques méridionales. CNRS paris. France. P 806.
- **Rafalski A., 2002.** Application of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: P 94-100.
- **Shannon Claude E., 1949.** *Communication Theory of Secrecy Systems*, Bell System Technical Journal, Vol 28, p. 656-715,
- **Saidji F., 2006.** Extraction de l'huile essentielle de thym: *Thymus numidicus Kabylica*- Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimique et pharmaceutiques ; université M'Hamed Bougara-Boumerdes.
- **Sambrook J., and Russel D W., 2001.** Molecular cloning : a laboratory manual. Troisième édition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New york.
- **Simpson EH., 1949.** Measurement of diversity. *Nature*, 163: 688.
- **Sokal R. R et Michener CD., 1958.** A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: P 1409- 1438.
- **Somma M., 2006.** Extraction et purification de l'ADN. Communautés Européennes, Italy. P6.
- **Soto-Mendivil E.A., Moreno-Rodriguez J.F., Estarron-Espinosa M., Garcia-Fajardo J.A et Obledo-Vazquez E.A., 2006.** Chemical composition and fungicidal activity of the essential oil of *Thymus vulgaris* against *Alternaria citri*-E-Gnosis; Vol. 4. N° 16.
- **Sylvain Santoni., Patricia Faivre-Rampant., Emilce Prado., Daniel Prat., 2000.** Génétique et d'amélioration des plantes, Centre INRA de Montpellier, 2, place Viala, 34060 Montpellier cedex 01, France.P 311-27.
- **Takeuchi H., Lu Z. G. et Fujita T., 2004.** *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 68 (5): 1113- 1134.

- **Thompson John., Charpentier Anne., 2009.** Le thym de basin de saint-Martin de Londres : une diversité de chémotypes à préserver et valoriser. Centre d'écologie fonctionnelle et évolutive, Montpellier. P3.
- **Toth G., Gaspari Z et Jurka J., 2000.** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.* (7): 967-81.
- **Vedele Françoise., et Loudet Olivier., 2001.** Ecole Thématique Biologie Végétale- 2001. P6.
- **Vernet PH., Gouyon P. H., 1980.** Etude de la variabilité génétique dans une population de *Thymus vulgaris L.* Observations sur les polymorphismes sexuel et chimique, effets du régime de reproduction, *OEcol. Plant.* Vol. 1 (15), n°2. P165-178.
- **Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Homes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kupier M et Zabeau M., 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: P 4407-4410.
- **Wagner D.B., Furnier G.R., Saghay-Marooif M.A., Williams S.M., Dancik B.P et Allard, R.W., 1987.** Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **84**, 2097–2100.
- **Weber J. L., 1990.** Human DNA polymorphisms and method of analysis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1: 166-171.
- **Williams J.G.K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A et Tingey S. V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 22: P 6531-6535.
- **Wright S., 1978.** Evolution and the genetics of populations. Variability within and among natural populations. Vol. 4. University of Chicago Press.

Annexe I

Appareillage

- Autoclave (Systec).
- Bain marie (Eppendorf).
- Barreau magnétique (Heidolph MR 3002).
- centrifugeuse (Eppendorf 5418).
- congélateur (Liebherir).
- Electrophorèse sur gel agarose (Gel XL ENDURO™ Labnet).
- Micronde (Whirlpool).
- pH mètre (Metter TOLEDO MP 2000).
- Réfrigérateur (Condor).
- Spectrophotomètre (Nano Drop 2000).
- Thermocycleur (PCR) (Bio-RAD, C1000).
- Transilluminateur UV (Gel Doc™ XR).
- Vortex (Fisher Scientific FB 15013).

Solutions

- **Tampon CTAB**
 - 100ml Tris HCl 1M, pH= 8
 - 280ml NaCl 5 M
 - 40ml EDTA 0.5 M, pH=8
 - 20g CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)
 - Complete le volume total à 1L avec dH₂O
- **Tampon TE**
 - 10ml Tris HCl 1M pH= 8
 - 2ml EDTA 0.5 M
 - Complète le volume total à 1L avec dH₂O
- **1M Tris HCl pH= 8**
 - 24.22g Tris
 - 200ml dH₂O
- **0.5 M EDTA**

- 18.61g EDTA
- 100ml dH₂O
- **5 M NaCl**
 - 146.1g NaCl
 - 500ml dH₂O
- **7.5 M Ammonium acétate**
 - 57.81g ammonium acétate
 - 100ml dH₂O
- **Tampon TBE 1X pH= 8**
 - 10.78g Tris
 - 5.50g Acide borique
 - 0.58g Na₂ EDTA
 - 1L dH₂O

Pour une concentration 10x, multiplier les quantités × 10

Verreries et Accessoires

- Bécher
- Entonnoir
- Erlenmeyer (100, 200, 250, 500ml).
- Fioles (50ml)
- MicroPipette graduées (10, 20, 100, 1000µl)
- Pipette jaugées (5, 10, 100ml)
- Eprouvette (50, 100, 1000ml)
- Pissette
- Spatule
- Tubes Eppendorf (0.5, 2ml)

Annexe II

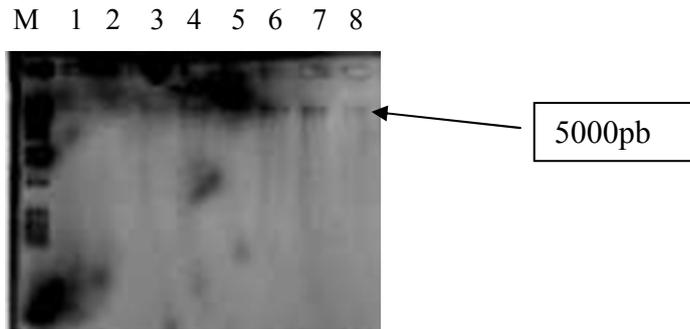


Figure 01 : intensité des bandes d'ADN sur le gel électrophorèse

