

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB – BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES BIOTECHNOLOGIES

Spécialité : Biotechnologie végétale



Mémoire de Projet de Fin d'Études

pour l'obtention du Master 2 académique en Biotechnologie Végétale et
Amélioration des Plantes

Thème

La Caractérisation morphologique et moléculaire de 43 génotypes de blé tendre (*Triticum aestivum*)

Présenté par :

BOUDENE Soumia
HAMIDAT Nessrine

Soutenu devant le jury :

Président : Snoussi SA. Pr

Université de saad dahleb

Encadreur : Kebour D. Pr

Université de saad dahleb

Examineur : Benmoussa M. Pr

Université de saad dahleb

Année Académique : 2019/2020

Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents, merci pour votre soutien et votre amour inconditionnel, pour avoir cru en moi et en mes capacités.

À mon frère et ma sœur, qui m'ont toujours encouragé et qui ont cru en moi

Et enfin, à mes amis, pour avoir été à mes côtés et pour m'avoir aidé. Je serais toujours extrêmement reconnaissant pour le soutien que vous m'avez apporté

NESSRINE

Dédicace

Je dédie ce travail

A ma famille, elle qui m'a doté d'une éducation digne, son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Particulièrement à ma raison de vivre ma mère, pour le gout à l'effort qu'elle a suscité en moi, de par sa rigueur.

A mon père, ceci est ma profonde gratitude pour ton éternel amour, que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir.

A ma soeur Amina, son mari Farid et leur petit bijou Amir pour leur soutien

A mes cousines et cousins qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Et le meilleur pour la fin, ma grand-mère que je lui souhaite une longue vie et que je ne cesserai jamais de la remercier pour ces douaa.

SOUMIA.

Remerciement

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma profonde gratitude à notre cher professeur et encadrant Mme Kebour pour son suivi et pour son énorme soutien, qu'elle n'a cessé de nous prodiguer tout au long de la période du projet.

Je tiens à remercier également mon encadrant Mme Djenadi pour le temps qu'elle a consacré et pour les précieuses informations qu'elle m'a prodiguées avec intérêt et compréhension

J'adresse aussi mes vifs remerciements aux membres des jurys pour avoir bien voulu examiner et juger ce travail.

Mes remerciements vont à Ryma en particulier et à tout le personnel que j'ai contacté durant mon stage au sein de l'INRAA, auprès desquelles j'ai trouvé l'accueil chaleureux, l'aide et l'assistance dont j'avais besoin.

SOUMIA.

Remerciement

Au terme de ce travail, le moment est venu de jeter un coup d'œil autour de soi, pour remercier ceux qui m'ont aidé et soutenu dans la réalisation de ce mémoire, dont le travail a été mené conjointement avec l'Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA / Baraki) et le Département des Biotechnologies, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Saad Dahlab de Blida1.

Mes premières pensées vont bien sûr à notre professeur et promoteur Mme Kebour qui a accepté de superviser ce mémoire et de mettre ses connaissances et sa patience à mon service.

Je remercie également Mme Djenadi qui a accepté de nous encadrer et qui n'a ménagé aucun effort pour nous guider et nous aider dans la partie expérimentale au niveau INRAA / Baraki. Egalement, je tiens à remercier tout le personnel que j'ai rencontré lors de mon stage. Ils étaient accueillants et l'ambiance du travail était conviviale et agréable.

Je remercie chaleureusement les membres du jury de ce mémoire. Le professeur S.A Snoussi, président du jury et le professeur M. Benmoussa, examinateur.

NESSRINE

ملخص:

تطوير الزراعت واستقلال الغذاء في الجزائر، مما يعني أنها لا يجب تجاهها لأهمية الثقافة المحلية
الهدمندر استنها هو التوصيف المورفولوجيو الجزيئي لـ 43 من الأنماط الجينية للقمح الشائعة (*Triticum aestivum*
L.)

باستخدام المتفاعلات التي أجرتها واسمات الجزيئية التي تم إجراؤها على الحمض النووي الجيني لمستخلصات الأنماط الجينية
43 المرتبطة بالشخصيات. القمح متقا بلية الإصابة بالأمراض، التقزم، مقاومة الصدأ الأصفر والصدأ البني ... إلخ.

كلمات المفاتيح: قمح، العلامات الجزيئية والجينات والتشكيل والتوصيف، *Triticum aestivum*,

Résumé :

La céréaliculture occupe un poste important dans le développement de l'agriculture et l'indépendance alimentaire en Algérie, ce qui fait que l'importance de la culture locale est à ne pas négligé. Notre étude a pour but, la caractérisation morphologique et moléculaire de 43 génotypes de blé tendre (*Triticumaestivum* L.) à l'aide des réactions faite par les marqueurs moléculaires effectués sur l'ADN génomique des extraits des 43 génotypes, lié aux caractères du blé comme la sensibilité aux maladies, nanisme, résistances aux rouilles jaunes et aux rouilles brunes... etc.

Mot Clés : Blé tendre, Marqueurs moléculaires, Gènes, Morphologie, Caractérisation, *Triticumaestivum*.

Abstract :

Cereal cultivation occupies an important position in the development of agriculture and food independence in Algeria, which means that the importance of local culture is not to be overlooked. The aim of our study is the morphological and molecular characterization of 43 common wheat genotypes (*Triticumaestivum* L.) using the reactions made by the molecular markers carried out on the genomic DNA of the extracts of the 43 genotypes, linked to the characters. Wheat like susceptibility to diseases, dwarfism, resistance to yellow rust and brown rust ... etc.

Keywords: Soft wheat, Molecular markers, Genes, Morphology, Characterization, *Triticumaestivum*.

Listes des acronymes et abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism
ARN	Acide Ribonucléique
AFLP	Amplified fragment length polymorphism.
ARN	Acide Ribonucléique.
BET	Bromure d'éthidium.
C	Degré Celsius
CTAB	Cetyltriméthylammoniumbromide (Bromure de cetyltriméthylammonium).
EDTA	Ethylène-diamine-tétra acétique.
Hab	Habitat
INRAA	Institut National de recherche agronomique d'Algerie
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	Potentiel hydrogène
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphism.
SSR	Single sequence repeat
STR	Single Tandem Repeat
TBE	Tris-HCl, boric acid, EDTA

	Page
Dédicace... ..	ii
Remerciements.....	iv
ملخص	vi
Résumé	vii
Abstract	viii
Liste d'abréviations.....	ix
Sommaire	x
Liste de figures	xii
Liste de tableaux	xiii
Introduction générale.....	01
Chapitre 01 : Synthèse bibliographique.....	03
1.1 Généralités sur le blé.....	04
1.1.1 Origine du blé	04
1.1.2 Domestication	04
1.1.3 Définition du blé tendre.....	06
1.1.4 Morphologie du blé tendre.....	07
1.1.5 Cycle biologique de développement du blé tendre.....	09
1.2 Situation du blé dans le monde	13
1.3 Situation du blé en Algérie.....	13
1.3.1 Production et rendement	14
1.3.2 Importation	14
1.4. Biotechnologie et marqueurs moléculaires.....	15
1.4.1 Définition des Biotechnologies	15
1.4.2 Définition de la Biotechnologie végétale	15
1.4.3. Les marqueurs génétiques	
1.4.4 Définition de la PCR.....	17
1.4.5 Définition des marqueurs moléculaires.....	19
1.4.5.1 Les types des marqueurs moléculaires.....	19

Les Marqueurs PCR.....	20
1.4.6 Les marqueurs et le blé.....	22
Chapitre 2 : Matériels et méthodes.....	23
2.1. Lieu de travail.....	24
2.2. Matériel.....	24
2.3 Mise en place de l'essai.....	24
2.4 Génotype du blé tendre.....	26
2.4.1 Prélèvement des feuilles	26
2.4.2 Broyage des feuilles.....	27
2.4.3 Extraction d'ADN.....	28
2.4.4 Quantification d'ADN par électrophorèse	30
Conclusion générale et perspective	32
Référence.....	34
Annexes.....	36
Annexe 1	36
Annexe 2	37
Annexe 3	38
Annexe 4	39

Liste des Figures

Figure	Titre	Page
Figure 1.1 :	Symbiose et polyploïdie.....	5
Figure 1.2 :	Différentes étapes de la culture du blé.....	12
Figure 1.3 :	Principe d'amplification.....	18
Figure 1.4 :	Comparaison des principales techniques de marquage moléculaire	21
Figure 2.1 :	Préparation des semences.....	25
Figure 2.2 :	Semis en plein champs.....	25
Figure 2.3 :	Test de germination.....	26
Figure 2.4 :	Prélèvement des feuilles.....	27
Figure 2.5 :	Broyage des feuilles.....	28
Figure 2.6 :	Préparation de la solution CTAB.....	29
Figure 2.7 :	Ajout de chloroforme d'isopentol.....	30
Figure 2.8 :	Centrifugation.....	30
Figure 2.9 :	Quantification par électrophorèse.....	31

Liste des tableaux

Tableaux	Titre	Page
Tableau 1	Classification du blé tendre.....	6

Introduction générale

La connaissance de la biologie et de la physiologie du blé et des autres céréales est une condition primordiale pour tirer profit de ces plantes vivrières indispensables à l'homme. Les périodes critiques de la vie du blé vis-à-vis du climat et des conditions générales de nutrition de la plante sont nécessaires à connaître pour la définition et l'adaptation des meilleurs itinéraires techniques pour la conduite rationnelle du blé et tout particulièrement en conditions pluviales, cas en Algérie et en Afrique du nord.

Le céréalier et l'agent de développement (vulgarisateur) doivent raisonner ces interventions techniques en fonction de la biologie et de la physiologie des cultures en relation avec l'environnement physique. Ainsi, le choix de la date de semis, de la période d'application de l'engrais azoté, de la date d'irrigation d'appoint, doivent se baser sur les besoins de la plante qui varient en fonction des stades de développement de la culture (Hamadache, 2001).

Par leur richesse en amidon, les grains des céréales constituent une part énergétique essentielle de l'alimentation. Ils sont également une source de fibres alimentaires et de micronutriments (vitamines, minéraux, etc.), composés intéressants pour la santé et essentiellement concentrés dans les parties périphériques du grain. Malgré ces caractéristiques communes, les céréales présentent des atouts nutritionnels divers, dépendant en partie des espèces végétales (Saulnier, 2012).

La filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole en Algérie. Ce document a pour objectif de mettre en évidence l'examen de l'évolution de la production, des rendements et du taux d'autosuffisance à la lumière des efforts engagés en matière des politiques de développement de ce secteur stratégique. Les tendances de la production et des rendements par espèce expliquent clairement la place accordée aux différentes spéciations dans la stratégie des acteurs et reflètent en conséquence la réponse de ces acteurs aux différentes actions menées depuis la politique d'intensification jusqu'au plan national de développement agricole (Djermoun 2009).

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière.

En relations avec le marché mondial, les produits céréaliers représentent plus de 40% de la valeur des importations des produits alimentaires. Les produits céréaliers occupent le premier rang (39,22 %)

De 1995 à 2005, le marché Algérien a absorbé, en moyenne annuelle, 4244903 tonnes de blés dont 70,44% de blé dur, soit 2990265 tonnes représentant une valeur de 858 millions de dollars, dont 60,36% de blé dur, soit 578 millions (Chehat, 2007).

Cela fait que la production des céréales n'est pas suffisante par rapport à sa consommation, la consommation des produits céréaliers se situe à un niveau d'environ 205 kg /hab. /an.

Pour régler ce déficit les chercheurs ont opté pour une sélection des variétés bien adaptés aux conditions pédoclimatiques, afin de promouvoir une bonne création variétale en se basant sur les sources génétiques, les méthodes classiques et les nouvelles technologie en utilisant les outils de la biotechnologie tel que les marqueurs.

L'objectif de notre travail est de faire une caractérisation morphologique et moléculaire de 43 géotypes de blé tendre (*Triticumaestivum* L.) qui est porté sur le géotypage et le phenotypage de 43 géotypes de blé tendre.

Notre étude est organisée par 3 chapitres : le premier aborde la généralité du blé, sa situation dans le monde et en Algérie, et la biotechnologie, sa génétique et les marqueurs moléculaires utilisés. Le second entame les matériels et les méthodes utilisés. Et le dernier traite les résultats obtenues et discussions, chose qui n'a pas était faite à cause de la pandémie qui a atteint le monde entier.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1 : Synthèse bibliographique

1.1 Généralité sur le blé

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière. (Djermoun A., 2009)

1.1.1 Origine du blé

La plupart des recherches archéologiques ont confirmé que les origines du blé se situent dans les zones du Croissant fertile ; zone couvrant la Palestine, la Jordanie, la Syrie, la Turquie, le Liban, l'Irak et une grande partie de l'Iran (Badr et al. 2000 ; Bonjean., 2001).

A partir du Croissant fertile le blé a été diffusé vers le Nord-Ouest par les plaines côtières du bassin méditerranéen (l'Italie, la France et l'Espagne), et à travers des Balkans (chaîne montagneuse de la Bulgarie), puis en suivant la vallée du Danube (Ukraine, Moldavie, Bulgarie, Roumanie, Serbie, Monténégro, Croatie, Hongrie et Slovaquie) pour arriver à la vallée du Rhin (Suisse, France, Allemagne et Pays-Bas), entre environ 5000 et 6000 ans avant J.-C). (Doussinault et al, 2001)

Dans le même temps, le blé a été introduit vers l'Asie et l'Afrique, mais son introduction en Amérique est très récente, particulièrement le blé tendre (*Triticumaestivum* L.). Elle a été faite en 1529 par les espagnols au Mexique. Alors qu'en Australie, elle a été faite par les anglais seulement en 1788 à partir des pools génétiques européens (Doussinault et al, 2001)

1.1.2 Domestication :

Le blé a d'abord été récolté à l'état sauvage puis cultivé depuis le néolithique dans le « croissant fertile » (actuels Liban, Syrie, Sud de la Turquie) où subsistent à ce jour des blés sauvages.

Les éventuels changements génétiques qui se produisent spontanément (mutations) au lieu de survenir de façon aléatoire, sont maintenus dans le patrimoine des descendants. Les potentialités de sélection par l'homme ont été facilitées par ce mode de transmission stable de génération en génération.

Ajoutons une remarque sur les propriétés génétiques du blé car elles sont une des raisons de l'étonnante progression de ses performances agroalimentaires jusqu'à nos jours.

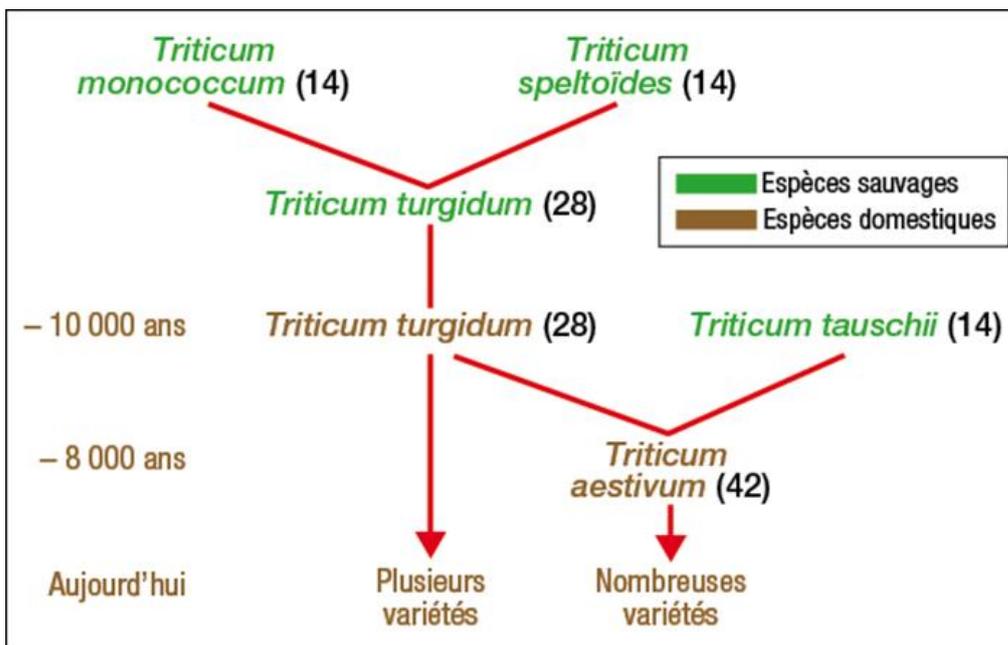


Figure 1.1 : Symbiose et polyploïdie (annabac 2012)

Le stock des entités qui portent le patrimoine héréditaire, les chromosomes, s'est multiplié chez les blés cultivés et s'est hybridé avec celui d'autres graminées. Les blés sauvages sont diploïdes et ont, comme la plupart des espèces, un stock chromosomique double, la moitié d'origine paternelle, l'autre moitié d'origine maternelle. Au cours de l'évolution ce stock chromosomique s'est multiplié par deux produisant des blés tétraploïdes comme l'amidonniér ou le blé dur et même par trois (blés hexaploïdes à 42 chromosomes) dans le cas du froment ou blé tendre. En même temps une partie du patrimoine d'au moins deux autres espèces de graminées sauvages encore mal identifiées s'est métissée de façon fortuite avec celle des blés. Il a été maintenu grâce à l'autofécondation et cette addition a donné

des aptitudes nouvelles. C'est ainsi qu'a été acquise par le froment la capacité de synthèse des éléments du gluten qui rend la farine panifiable.

Au total, on constate ici une étonnante association des potentialités d'une plante et des gestes de l'homme. Retenons surtout que, dès le départ, doué de propriétés culturelles et nutritives remarquables, le genre blé s'est constamment diversifié et amélioré. Ainsi, il est, en particulier, devenu moissonnable et panifiable, ce qu'il n'était pas au départ. Ses rendements ont constamment augmenté ; le nombre des variétés cultivées ou cultivables n'a cessé de s'accroître (plusieurs milliers) permettant une adaptation à des situations de milieu très diverses et une résistance aux parasites. C'est une plante domestique véritablement unique. Michèle (Mosiniak M et al, 2020)

1.1.3 Définition du blé tendre :

Le blé est une espèce annuelle qui fait partie de la classe botanique des Monocotylédones et de la famille des graminées. C'est une espèce autogame de jours longs. C'est les premières céréales cultivée et largement consommée en Algérie et dans le monde. Le tableau si dessous montre la classification botanique du blé tendre (*Triticum Aestivum L.*)

Tableau 1 : Classification de blé tendre

Classification	Blé tendre
Règne	Plantae (règne végétale)
Division	Magnoliophyta (Angiosperme)
Classe	Liliopsida (Monocotyledone)
Sous classe	Commelinidae
Ordre	Poale
Famille	Poaceae (graminée)
Sous famille	Titiceae
Genre	Triticum
Espèce	Triticumaestivum L.,

1.1.4 Morphologie du blé tendre :

Le blé est une espèce annuelle qui fait partie de la classe botanique des monocotylédones et de la famille des graminées. C'est une espèce autogame de jours longs. C'est la première céréale cultivée et largement consommée en Algérie et dans le monde. (Hamadache, 2001)

- **Grain de blé** : le grain du blé est un caryopse. C'est un fruit sec et indéhiscet. Il est de couleur blanchâtre a brunâtre selon l'espèce, blé dur ou tendre, et selon la variété. Le caryopse de blé de compose de deux parties : l'amande et les enveloppes ou l'endosperme. L'amande est formée de l'embryon à la base du grain et d'albumen qui sert de réserves, utilisées au moment de la germination. Les enveloppes sont riches en matières minérales, en azote et en matières grasses. Ces enveloppes donneront, au cours de la mouture, le son.
- **Grain de blé germé** : La germination de la semence de blé est sous l'influence de facteurs internes (dormance primaire) et de facteurs externes. Elle nécessite de l'humidité dans le sol, de l'oxygène et une température suffisante. Lagermination ne commence en fait qu'à partir du moment où la graine a absorbé 30% de son poids.
- **Plant de blé bien développé** : l'unité biologique et morphologique de base chez les céréales est la talle. Chaque talle peut donner naissance à une tige ou chaume et une inflorescence (épi). La tige est cylindrique. Elle se compose de plusieurs entre-nœuds qui sont de plus en plus long de la base au sommet. La tige chez le blé peut être creuse, demi-pleine ou pleine.
- **Plant idéal de blé** : Le plant idéal de blé d'après l'australien Donald (1968) est celui qui possède les caractéristiques suivantes : une paille courte ; une seule tige forte ; un épi long et large, des feuilles petites et peu nombreuses e (t un système racinaire dense.
- **Blé a talles** : Ce sont les 4 talles primaires du blé. Chaque talle primaire émet une talle-fille ou talle secondaire. Au même temps, se développent aussi les racines coronales ou du tallage. En général, chaque talle-fille possède une feuille de moins que la talle mère.

- **Nœuds et tiges** : Les nœuds sont des zones de croissance constituée de tissus méristématique ou méristème intercalaire à partir desquels s'allongent les entre-nœuds. Chaque nœud est le point d'attache d'une feuille.
- **Une feuille** : La feuille du blé est à nervures parallèles et se compose de 2 parties : la gaine et le limbe. La gaine est attachée au niveau des nœuds. Le limbe possède à la base deux prolongements arqués qui embrassent plus ou moins complètement la tige : les oreillettes ou stipules. La première feuille est attachée au premier nœud. Elle donne naissance à un bourgeon à la base qui donnera naissance à la première talle primaire (t1). La seconde feuille est attachée au second nœud et donne naissance à un bourgeon de base qui se transforme en deuxième talle primaire t2. La vitesse d'apparition des feuilles ou le phyllochrone dépend surtout de la température. La somme de température nécessaire à l'apparition d'une feuille varie entre 80 et 100°C. La vitesse d'apparition des feuilles peut être ralentie par l'excès d'eau. Le déficit en azote et l'ombrage (semi dense). Le nombre final de feuilles par plant dépend surtout de la date de semis (température) et de la variété (paille haute, paille courte).
- **Jonction gaine et limbe** : à la soudure du limbe et de la gaine se trouve la ligule, une petite membrane non vasculaire entourant en partie le chaume : la ligule. Les caractères morphologiques de la ligule permettent de distinguer les espèces de céréales (blé, orge, avoine, seigle) au stade herbacé.
- **Plant épié** : L'inflorescence du blé est un épi. L'épi se compose d'un rachis sur lequel sont insérés les épillets chaque porte 5 à 7 petite fleur hermaphrodite. Le nombre potentiel d'épillets par épi est une caractéristique variétale (longueur de l'épi) mais elle dépend aussi des conditions de culture.
- **Epillets** : C'est l'unité morphologique de base de l'inflorescence chez le blé. Les épillets sont fixés sur l'axe ou le rachis et forment l'épi. Ils sont enveloppés par les glumes. Chaque épillet portent 7 à 7 fleurs hermaphrodites dont 3 à 4 seulement arrivent à maturité et donnent, une fois fécondées, des graines.

- **Organes reproducteurs** : Les organes sexuels chez le blé se composent 3 étamines, d'un pistil et de deux lodicules. Ces organes sont situés entre les glumelles supérieures (lemma) et la glumelle inférieure (palea) de l'épillet.
- **Le pistil** : C'est l'organe sexuel femelle. Il se compose de stigmate et de l'ovaire. Le stigmate est plumeux et reçoit le pollen et assure sa germination avant de pénétrer dans l'ovaire et assure la fécondation de l'œuf.
- **Les étamines** : Ce sont les organes reproducteurs mâles ils sont au nombre de 3. Ils se composent d'anthères qui contiennent le pollen (gamètes mâles) et de filets. Le grain de pollen est à la fois sensible aux basses et aux hautes températures.
- **La racine** : Le blé possède deux types de racines : les racines séminales, entre 5 et 7, ou primaire issues de la semence et utilisées pendant les premières phases de la croissance (levée-3-4 feuilles) et les racines adventives ou de tallage ou secondaires. Elles sont émises par des différentes talles. Les racines secondaires assurent dès le second mois, la plus grande partie de la nutrition de la plante (Hamadache, 2001).

1.1.5 Cycle biologique de développement de blé tendre :

Le cycle évolutif du blé se divise en 3 périodes : période végétative, reproductrice et de maturation et dessiccation. Chaque période comporte des stades. Certains sont dits 'critiques' par rapport aux conditions de l'environnement (humidité, température). Des échelles ont été données par certains auteurs (Feekes, Zadocks, Jonard, Baggiolini, Kirby) pour noter ces stades. Nous utiliserons dans ce qui suit l'échelle de Feekes. (Hamadache, 2001).

- ▮ **Levée (stade 1 de feekes)** : C'est le premier stade du cycle de développement du blé et le début de la période végétative. Elle marque le passage à une vie autotrophe grâce à la chlorophylle contenue dans la première feuille. La levée est notée quand 50% des plantes sont sorties de la terre. Le taux de levée et sa vitesse dépendent de la faculté et de l'énergie germinative de la semence, de l'état du lit de semence et le mode de semis. Le jeune plant est à ce stade

sensible au froid. La date de semis donc doit être raisonnée en fonction de la température. La céréale doit être au stade 3-7 feuilles au moment de grand d'hiver (Janvier-février). (2)3-4 feuilles (stade1), c'est le début de tallage de la céréale. L'ébauche de la première talle ou maitre-brin apparait à l'aisselle de la première feuille. A ce stade la céréale représente sa tolérance maximale au froid. Un roulage de la céréale à ce stade peut améliorer le tallage de la culture. La culture se nourrit jusqu'à ce stade à partir des racines séminales (issues de la semence), des réserves de la graine et de la photosynthèse de la première feuille F1.

- ▣ **Début tallage** : C'est la ramification de la tige ou maitre brin. La première talle (T1) apparait à l'aisselle de la première feuille (F1). D'autres talles primaires naissent à l'aisselle de la 2^e, 3^e et 4^e feuille du maitre brin. Cette zone de ramification s'appelle le plateau de tallage. Au même temps, on note l'apparition d'une ou deux racines dites adventives. Ce sont des racines de tallage ou coronales. Le tallage est une caractéristique variétale, il dépend donc de la vitesse de croissance de la variété, qui est elle-même sous le contrôle des facteurs externes : technique de culture et environnement. L'humidité du sol, la température, la photopériode, la fumure azotée, la profondeur, la densité et la date de semis agissent tous sur la durée de tallage, le nombre de talles et le devenir des talles, herbacées ou reproductrices.
- ▣ **Fin tallage (stade 2)** : le fin tallage correspond à la fin de la période végétative et le début de la phase reproductrice du blé. Le nombre final de talle est arrêté, soit 3 à 4 talles en plus du maitre brin. Le tallage cesse dès que la photopériode (longueur du jour) permet l'élongation des premiers entre-nœuds.
- ▣ **Montaison (stade 4-5)** : à ce stade la croissance et le développement de la céréale sont en phase exponentielle. Le jeune épi se trouve à 1 cm du plateau du tallage. Durant ce stade se différencient les ébauches de l'inflorescence (épillet, glumelles, étamines, ovaires) à partir de la zone médiane de l'épi. Les risques de gel ($T^{\circ} < -4^{\circ}\text{C}$) sont à craindre durant cette période. Le gel agit négativement sur la fertilité de l'épi, c'est-à-dire sur le nombre de grains par épi.

- ▣ **Gonflement (stade9)** : La gaine de la dernière feuille se trouve gonflée par l'épi encore dans la tige. A ce stade, le blé a initié une vingtaine d'épillets par épi. Durant ce stade, la méiose pollinique commence et les grains de pollen s'élaborent. La méiose dure en moyenne 1 a 2 jours. C'est un stade critique de la vie du blé vis-à-vis des facteurs de l'environnement (basse température, sécheresse, ombrage). Le froid peut ainsi induire une stérilité des gamètes males et la fertilité de l'épi (grains/épi) sera donc affectée. Une température élevée (>30° c) peut par contre engendrer une stérilité femelle (ovaires peu développés).
- ▣ **Epiaison (stade10)** : Elle correspond à la sortie de l'épi de la gaine de la dernière feuille. Ce stade correspond au moment où 50% des épis sont à moitié sortis des gaines de dernières feuilles. A ce stade, les fleurs les moins développées, soient les fleurs de la base de l'épi, dégénèrent. Une gelée tardive (avril) durant ce stade peut provoquer la stérilité des fleurs chez les variétés précoces semées tôt.
- ▣ **Floraison (stade 10.5)** : Elle correspond à l'apparition des étamines sur l'épi. La fécondation s'est déjà accomplie. Elle marque la fin de l'épiaison et le début de formation du grain. Elle commence dans le tiers moyen de l'épi puis gagne le sommet et la base. La croissance du grain commence avec la fécondation de l'ovule par le pollen. La tige et l'épi ont, à ce stade, achevé leur croissance. La tige possède alors 5 à 6 entre-nœuds, le pédoncule, dernier entre-nœud, est le plus long.
- ▣ **Stade grain laiteux (stade 11.1)** : C'est une phase de multiplication des cellules au niveau du jeune grain encore vert. En l'écrasant, il sort un liquide laiteux. Le teneur en eau du grain est de 66%. Durant ce stade, se mettent en place les enveloppes du futur grain. C'est le début du pallier hydrique.
- ▣ **Stade laiteux-pâteux** : Entre les deux stades, laiteux et pâteux, la quantité d'eau contenu dans le grain est stable : c'est le pallier hydrique. Un coup de chaleur (T° maximale > 28° C) accompagné d'un vent, à ce moment, provoquent l'interruption de la migration des réserves des feuilles et de la tige

vers le grain : c'est l'échaudage du grain. Le rendement peut alors chuter de 50%.

- **Stade pâteux (stade 11.2)** : L'expansion des cellules de l'enveloppe s'accélère ainsi que le remplissage de ces cellules par les sucres (amidon). Le grain devient alors difficilement écrasable entre les doigts. Il est de couleur jaune-vert. Il correspond à un teneur en eau du grain de 44%. C'est la fin du pallier hydrique. Le grain du blé dur est utilisé à ce moment, en Algérie, pour fabriquer du Frik.
- **Maturité physiologique** : Elle aura lieu quand il n'y a plus de migration de matière sèche vers le grain. La teneur moyenne en eau dans le grain est de 40%. Elle se situe 2 jours en moyenne après le stade pâteux. Le poids sec du grain a atteint sa valeur maximum et définitive.
- **Stade grain dur (stade 11.4)** : La dessiccation du grain s'accélère et devient dur et rayable à l'ongle. Le taux d'humidité dans le grain varie entre 15 et 16%, soit la phase de récolte à la moissonneuse-batteuse. (Hamadache, 2001)

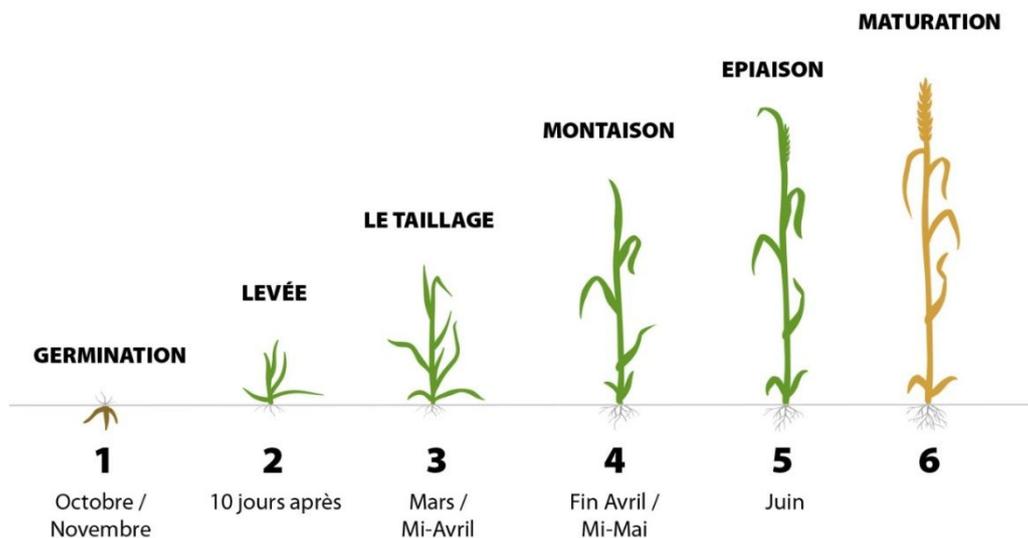


Figure1.2 Les différentes étapes de la culture du blé (EPI,)

1.2 Situation du blé dans le monde

Le blé joue un rôle essentiel dans l'alimentation directe et également indirecte d'une très large fraction de l'humanité.

C'est actuellement la céréale la plus cultivée dans le monde, avec une production annuelle dépassant 350 millions de tonnes.

C'est également la céréale la plus commercialisée sur le marché mondial. Des faits récents ont rappelé avec force la place éminente tenue par le blé dans l'histoire de l'alimentation et dans la politique des états. Dans le contexte économique et politique actuel, le blé retrouve pleinement, au-delà de son rôle purement alimentaire, une fonction stratégique que l'on a parfois tendance à oublier, il apparaît ainsi comme une arme parmi d'autres, et non des moins efficaces, dans les rapports de puissances entre états et finalement dans un certain type d'organisation de l'espèce. (Charvet J, 1977)

1.3 Situation du blé en Algérie

Les céréales et leurs dérivées constituent l'alimentation de base dans beaucoup de pays en développement, particulièrement dans les pays maghrébins.

La filière céréalière constitue une des principales filières de la production agricole en Algérie. Ce document a pour objectif de mettre en évidence l'examen de l'évolution de la production, des rendements et du taux d'autosuffisance à la lumière des efforts engagés en matière des politiques de développement de ce secteur stratégique. Les tendances de la production et des rendements par espèce expliquent clairement la place accordée aux différentes spéciations dans la stratégie des acteurs et reflètent en conséquence la réponse de ces acteurs aux différentes actions menées depuis la politique d'intensification jusqu'au plan national de développement agricole. (Djermoun A, 2009)

La production des céréales en Algérie est toujours très faible. Sur les cinq dernières années, la moyenne n'a pas excédé les 42 millions de quintaux et demeure très insuffisante, puisqu'elle ne couvre que 30% des besoins nationaux.

La facture d'importation des céréales ne cesse d'augmenter. L'importation du blé (dur et tendre) représente 65 % des importations des céréales, dont 70% en blé tendre. (Aissa, 2019).

1.3.1 Production et rendement :

Le blé est un enjeu majeur pour l'Algérie dont la consommation nationale atteint 10 millions de tonnes. Un besoin qui avait longtemps fait les beaux jours des agriculteurs français comptant sur les rapports privilégiés entretenus entre Paris et Alger pour approvisionner ce marché, où la consommation de céréales est très importante et rentre même dans la stratégie gouvernementale de maintien de la paix sociale. Une situation qui place l'Algérie comme troisième plus grand importateur de blé dans le monde et qui fait d'elle un marché appétissant pour les producteurs de céréales.

Le pas vers une autosuffisance en blé dur est presque franchi, mais il reste à développer la production de blé tendre qui continue de peser sur les importations algériennes. L'Algérie a contribué fortement à sauver la campagne céréalière française qui a repris des couleurs grâce à cette transaction plus que bénéfique. La France continue d'être le premier fournisseur de l'Algérie en blé tendre avec 55% de ses approvisionnements. (El watan, 2019).

La filière céréales baigne dans une panoplie de problèmes, avec des rendements très faibles, matériel de récolte vétuste et conditions de stockage pas du tout saines et avec des infrastructures insuffisantes.

La production des céréales en Algérie est toujours très faible. Sur les cinq dernières années, la moyenne n'a pas excédé les 42 millions de quintaux et demeure très insuffisante, puisqu'elle ne couvre que 30% des besoins nationaux. (Aissa, 2019)

1.3.2 Importation :

La filière céréales en Algérie ne connaît que des problèmes. Nous importons plus de 70% de nos besoins en blé (dur et tendre). Une situation qui pèse lourdement sur la balance des paiements du commerce extérieur de notre pays. La facture

d'importation des céréales ne cesse d'augmenter quelle que soit la production réalisée.

On a déclaré pour l'année 2018 une double production par rapport à la saison de 2017. Mais la facture d'importation du blé tendre a connu une augmentation de 16% en quantité et 29 % en valeur. Une situation inédite et incompréhensible, surtout quand les prix mondiaux de ces produits ne connaissent pas une augmentation.

L'Algérie a importé pas moins de 4,6 millions de tonnes de blé depuis les ports français à la fin avril dernier. Un niveau record d'importation en hausse de 34% par rapport à la campagne 2017/2018 et représentant trois fois le niveau d'importation enregistré durant l'exercice 2016/2017. Cette hausse des achats de blé tranche avec la décision de réduction des importations prise suite à l'augmentation des niveaux de la production nationale. L'Algérie a réalisé une récolte record de 3,9 Mt sur la campagne 2018/2019, soit une hausse de 61% de la production dont 3,15 Mt de blé dur. (Aissa, 2019)

1.4 Biotechnologies et marqueurs moléculaire :

1.4.1 Définition des Biotechnologies :

La Biotechnologie regroupe toutes les applications des sciences et technologies associés aux êtres vivants (micro-organismes, animaux, végétaux), qui a des fins industrielles ou agricole subissent des modifications de leur caractéristiques génétiques pour la fabrication industrielle de composés biologiques ou chimiques, ou pour l'amélioration des produits agricole.

1.4.2. Définition de la Biotechnologie végétale :

La Biotechnologie végétale au sens large et traditionnel est l'intervention humaine sur du matériel végétale au moyen d'instruments technologique afin de produire des effets temporaires.

Au sens strict, elle est l'intervention humaine sur le matériel végétal au moyen d'instruments technologiques afin de produire des effets qui seront transmis à la

descendance, incluant le génie génétique ou manipulation génétique pour obtenir des plantes transgéniques (Guettouchi, 2020).

1.4.3. Les marqueurs génétiques :

Un marqueur génétique est un gène ou une séquence d'ADN avec une location connue sur un chromosome, qui est associé avec un gène ou trait particulier. Un marqueur génétique peut-être une séquence d'ADN courte tels que polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP), ou une séquence longue comme les mini, micro-satellites. (Al-Samarai et Al-Kazaz, 2015).

Il existe trois (3) Types de marqueurs Génétiques :

▢ **Les marqueurs morphologiques :**

Ce type de Marqueurs se base sur l'utilisation des phénotypes pour un trait spécifique (ex. Taille de l'épi, nombre de graine par épi), ils dépendent de l'observation visuelle pour identifier, classifier et caractériser l'évolution génétique de différentes espèces. Les marqueurs morphologiques ne sont pas fiables car ils sont basés sur des jugements et descriptions subjectives (Al-Samarai et Al-Kazaz, 2015).

▢ **Les marqueurs protéiques (Biochimiques) :**

Ces marqueurs représentent des traits biochimiques qui peuvent être analysés par électrophorèse des protéines. La différence e la composition des aminoacides des isozymes et des protéines solubles ont été utilisés pour investiguer la variété génétique et les relations phylogéniques entre les espèces L'application de ces marqueurs a été limitée car les protéines et isozymes sont des produits d'expression génétique donc peuvent être affectés par l'environnement (Al-Samarai et Al-Kazaz2015).

▢ **Les marqueurs ADN (Moléculaires) :**

Ce type de Marqueurs se base sur l'utilisation des phénotypes pour un trait spécifique (ex. Taille de l'épi, nombre de graine par épi), ils dépendent de

l'observation visuelle pour identifier, classifier et caractériser l'évolution génétique de différentes espèces. Les marqueurs morphologiques ne sont pas fiables car ils sont basés sur des jugements et descriptions subjectives. (Jan, 2003).

1.4.4 Définition de la PCR :

La PCR aussi appelée « Molecularphotocopying » est une technique qui était envisagée par KaryMullis en 1984, elle est rapide et pas cher et utilisée pour amplifier des petits fragments d'ADN, car un certain nombre d'échantillon d'ADN sont nécessaires pour les analyses moléculaires et génétiques (National human genome research insitut).

L'amplification en chaine par polymérase est utilisée pour amplifier une séquence d'ADN en utilisant une paire d'amorces d'oligonucléotides, chacune complémentaire à une extrémité de la séquence d'ADN cible. Celle-ci subissent une élongation l'une vers l'autre par une ADNpolymérase thermostable, dans un cycle de réaction à trois étapes : dénaturation, Appariement de l'amorce et polymérisation. Une fois amplifier, l'ADN produit par PCR peut être utilisé pour des différents procédures, comme la cartographie génétique, il peut aussi être utilisé pour la détection des virus et les bactéries et les diagnostics pour les désordres génétique (Mullis, 1998).

1.4.4.1 Le protocole principal de la PCR :

L'amplification par PCR comprend les trois (3) étapes suivantes :

▣ **La dénaturation :**

Dénaturation de la matrice d'ADN, les doubles brins se séparent à une température de 90-96°C.

▣ **L'hybridation :**

Le taq Polymérase nécessite une petite pièce d'ARN pour l'initiation de la répllication d'ADN, et des amorces courtes qui débutent la répllication. Ces amorces sont complémentaires aux gènes d'intérêts, deux Amorces sont

utilisées pour chaque brin d'ADN. Pour que la réplication commence la température est abaissée et les amorces se lient avec leurs bases complémentaires du brin d'ADN.

□ **L'élongation :**

La température est élevée à la température optimale pour la polymérase (68°-72°C), cette polymérase va synthétiser le nouveau ADN en commençant par l'amorce, la polymérase va lire une matrice et générer des nucléotides complémentaires rapidement. Le résultat est deux nouvelles Hélices au lieu d'un seul, chacun composé d'un des brins originaux plus le nouveau brin complémentaire assemblé comme le montre la (fig.1.3) [2]

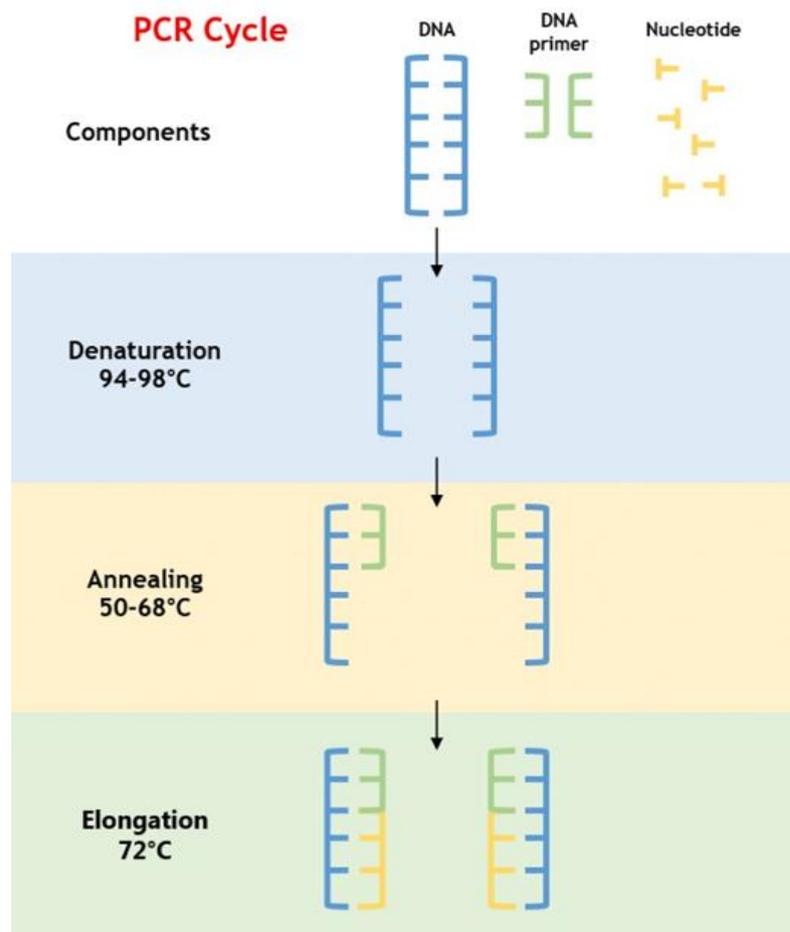


Figure 1.3 Principe d'amplification (Clinisciences)

1.4.5 Définition des marqueurs moléculaires :

Les marqueurs moléculaires sont un type de Marqueurs génétiques, ce sont des fragments d'ADN qui peuvent être facilement localisés et quantifiés dans une population et qui peuvent être associés avec un gène ou trait d'intérêt. (Hayward et al, 2014)

Les marqueurs moléculaires révèlent directement les modifications du patrimoine génétique ; ils se traduisent ou non par une modification phénotypique (phénotype), physiologique ou biochimique (Boichard, 1998).

1.4.5.1 Les types de marqueurs Moléculaires :

Il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires et leurs technologies la plus avancée est probablement le moyen le plus efficace pour comprendre les bases de la diversité génétique, ces marqueurs permettent l'augmentation de l'efficacité et techniques d'amélioration des plantes. Il existe des marqueurs qui se basent sur la PCR (tel que les SSR, AFLP, RAPD), et des marqueurs non PCR (RFLP) (Jan, 2003).

❖ **Les marqueurs Non PCR :**

▯ Les Marqueurs RFLP :

RFLP (restriction fragment length polymorphism), était parmi les premières techniques utilisées pour l'analyse d'ADN en science judiciaire et d'autres domaines. La technique repose sur l'isolation d'ADN génomique et sa digestion par les enzymes de restriction spécifiques, cette digestion va donner une variabilité de fragments d'ADN de tailles différents, puis séparés par gel d'agarose et transférée par capillarité sous forme dénaturée sur une membrane de nylon, cette membrane d'ADN cible va être incubée avec la sonde ADN, puis par hybridation moléculaire les fragments d'ADN génomique qui sont homologues vont être repérer.

La technique RFLP était aussi parmi les premières méthodes utilisées pour l'empreinte génétique mais c'est une technique lente et fatigante par rapport aux

nouvelles techniques d'analyse, comme elle demande des concentrations élevées d'ADN (Al-Samarai et Al-Kazaz, 2015).

❖ **Les Marqueurs PCR :**

Contrairement aux Marqueurs RFLP, Les marqueurs révélés par PCR permettent d'analyser les marqueurs à temps court et concentration d'ADN relativement faible. Il existe Plusieurs marqueurs moléculaires qui sont basés sur la PCR comme les RAPD, AFLP, SSR... ; Et parmi les marqueurs les plus utilisés il y'a Les Microsatellites (SSR) et les marqueurs RAPD (Bazziz, 2017)

▮ Les marqueurs RAPD :

Random Amplification of polymorphic DNA (RAPD) est une technique qui est basée sur la PCR, c'était la technique la plus utilisée durant la dernière décennie, pour le développement des marqueurs ADN, elle n'exige pas une connaissance spécifique de la séquence d'ADN ciblée, elle utilise des amorces courtes d'une dizaine de nucléotides, puis cette amorce va s'hybrider au hasard dans le génome, il y'aura une amplification si les deux sites d'hybridation sont proches et sur les deux brins d'ADN, mais si les sites sont très éloignés y'aura pas d'amplification. C'est une technique qui est très rapide, toutefois, elle présente des désavantages, le fait que les polymorphismes sont seulement détecter par présence ou absence d'une bande d'un certain poids moléculaire, sans aucune information sur l'hétérozygotie appart le fait qu'elle soit dominante, et aussi les résultats sont difficilement reproductibles (Al-Samarai et Al-Kazaz, 2015).

▮ Les marqueurs AFLP :

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), sont les plus utilisés dans l'analyse de la variation génétique, surtout dans l'investigation dans la structure et la différenciation dans une population. La technique est basés sue trois étapes : la première est la restriction de l'ADN et une légation des adaptateurs oligonucleotidique, la deuxième est l'amplification sélective des fragments des sites de restriction et enfin la troisième étape est l'analyse du gel des fragments amplifier (Pieter 'et al, 1995).

▯ Les Microsatellites :

Les microsatellites, appelés également simple sequence repeats (SSR), ou short tandem repeats (STR), sont des séquences constituées d'unités répétées de 1 à 4 nucléotides. Ils sont trouvés dans le génome nucléaire de la plupart des Eucaryotes et moins chez les procaryotes. Ils sont classifiés de un jusqu'à six nucléotides, les répétitions mono-, de-, tri-, tétranucléotides sont les plus communs pour les études en génétique moléculaire. Les microsatellites ont plusieurs avantages, ils sont considérés robustes et plus variables et informatives que d'autres marqueurs tel que les RFLP, RAPD et AFLP, ils n'utilisent que des petites quantités d'ADN, ils sont les meilleurs marqueurs pour la détection de polymorphisme inter-variétale, mais ces marqueurs présentent aussi des inconvénients, ils sont chers et demandent beaucoup de temps (Al-Samarai et Al-Kazaz, 2015).

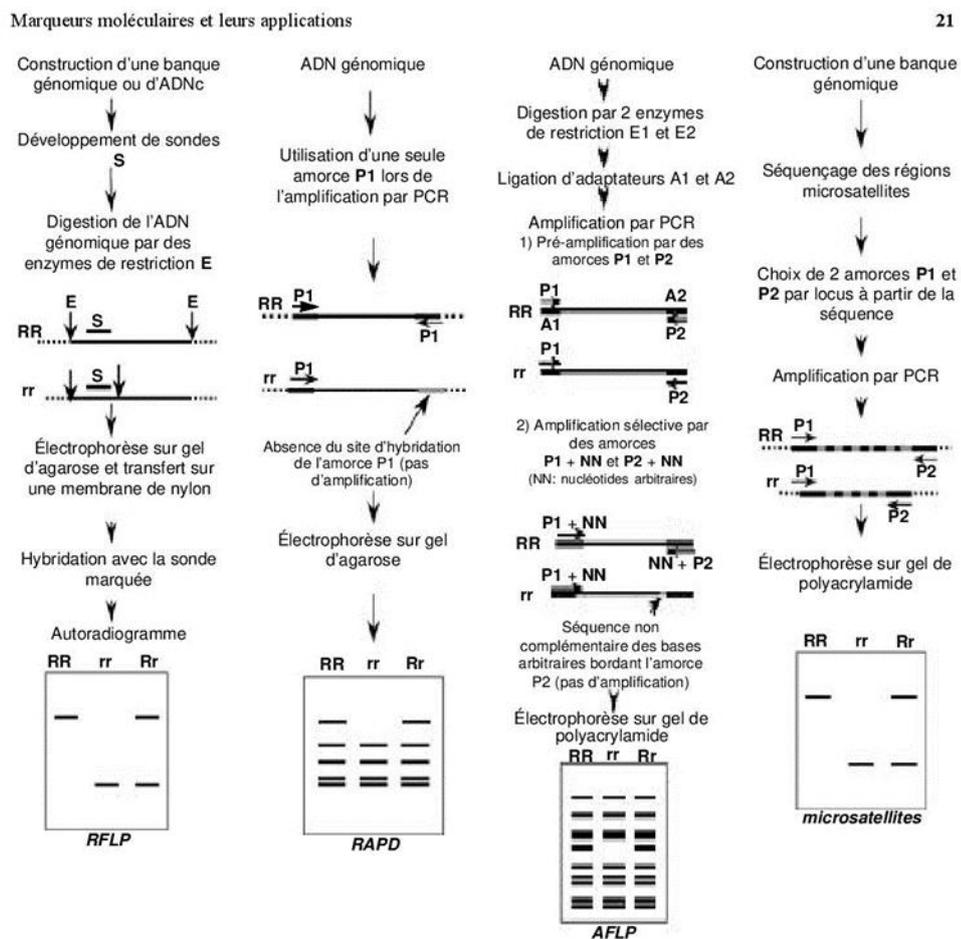


Figure 1.4. Comparaison des principales techniques de marquage moléculaire (Najimi et al, 2003)

1.4.6 Les marqueurs et le blé :

Le développement des marqueurs durant les dernières années offre des possibilités pour faire de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection, ils sont devenus des outils essentiels dans les programmes de sélection du blé tendre (*Triticum aestivum* L.) pour les résistances aux maladies et aux insectes.

La sélection assistée par marqueurs (MAS) est utilisée dans la majorité des programmes pour lutter contre la maladie de la rouille (Najimi et al, 2003).

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1 Lieu de travail :

Le travail décrit dans ce chapitre a été effectué au niveau d'institut national de recherche agronomique d'Algérie (INRAA) à Mahdi Boualem (Baraki, Alger). Pour la partie morphologique, le travail a été mener en plein champ par contre pour les analyses moléculaires ils ont été réalisés au niveau du laboratoire de physiologie végétale et amélioration des plantes dans le cadre du projet national de recherche d'amélioration du blé.

2.2 Matériel :

2.2.1 Matériel Végétale :

Pour La réalisation de ce travail on a utilisés 48 géotypes du blé tendre (*triticumaestivum*), Le choix des variétés était basé sur des caractéristiques intéressants qu'offre ces géotypes (Résistance aux maladies, adaptation aux conditions du milieu...etc.)

2.2.1 Équipement du laboratoire :

Les produits utilisées pour notre essaye ont était disponible au niveau du laboratoire de Physiologie végétale et amélioration des plantes de l'INRAA.

2.3 Mise en place de l'essai :

2.3.1 Préparation de semence :

En Décembre 2019, On a fait la quantification des semences, ou à partir de 450 variétés de blé tendre, on a pris 100 graines de chaque variété et nous les avons mis dans des enveloppes en papier en numérotant chaque enveloppe. Chaque enveloppe a été pesé, après avoir noté la mesure on procède à l'ajout de graines jusqu'à obtention de 10g pour chaque variété (Fig. 2.1).



Figure 2.1 : préparation des semences (Source personnelle, 2020)

2.3.2 Semis :

La parcelle est tracé Pour faire le semis en ligne, et le jour après on a semé nos graines au long de toute la parcelle tracé, dans chaque deux lignes une variété est semer en laissant une ligne vide entre chaque variété (Fig. 2.2).



Figure 2.2 : Le semis en plein champ (Source personnelle, 2020)

2.3.2 Test de germination :

Après nettoyage et séchage des boites de pétri on dépose du papier absorbant sur lequel on met 5 graines en numérotant chaque boîte. On arrose les graines à l'aide

d'une pissette régulièrement et on les place à l'obscurité, à température de laboratoire pour réalisation de la germination (Fig. 2.3).



Figure 2.3 : Test de Germination (Source Personnelle, 2020)

2.4 Génotypage du blé tendre :

2.4.1 Prélèvement des feuilles :

Les feuilles sont prélevées au 3ème stade (stade Juvénile), coupées à l'aide d'une paire de ciseaux stérilisées et mis dans de tubes Eppendorff. Les tubes sont numérotés selon l'emplacement de chaque échantillon et mis dans l'étuve à 50°-60°C pendant 48h pour sécher (Fig. 2.4)



Figure 2.4: Prélèvement des feuilles (Source personnelle, 2020)

2.4.2. Broyage des feuilles :

Une fois les feuilles sécher, elles sont broyer à l'aide d'un broyeur, pour cela des billes sont placés dans les micro-tubes, l'ensemble est chargé sur le support universel et solidement fixé grâce à des cales intermédiaires un couvercle de sécurité est rabattu, lors du fonctionnement, des rapides mouvements horizontaux permettent aux billes d'impacter les échantillons (Fig. 2.5).



Figure 2.5 : Broyage des feuilles (Source Personnelle, 2020)

2.4.3 Extraction d'ADN :

L'ADN génomique de 48 génotypes de blé tendre ont été extraits à partir des feuilles fraîches qui ont été d'abord séchés et broyer, puis pour l'extraction on utilise la méthode de CTAB (Bromure de Céthylméthyl Ammonium), Ce protocole nous permet d'obtenir Une grande quantité d'ADN et de qualité satisfaisante.

Le travail est fait sous la Haute, et pour chaque 100ml de CTAB on ajoute 0.2% de b-mercaptoéthanol, (Voir Fig. 2.6)

L'ADN génomique de 48 génotypes de blé tendre ont été extraits a partir des feuilles fraîches qui ont été d'abord séchés et broyer, puis pour l'extraction on utilise la méthode de CTAB (Bromure de Céthylméthyl Ammonium), Ce protocole nous permet d'obtenir Une grande quantité d'ADN et de qualité satisfaisante.

Le travail est fait sous la Haute, et pour chaque 100ml de CTAB on ajoute 0.2% de b-mercaptoéthanol, (Voir Fig. 2.6) Les étapes pour ce travail sont comme suit :

- La solution est chauffée dans un bain marie à 65°C pendant 10mins.
- A l'aide d'une micropipette on prend 700µl de la même solution et on la met dans les micro-tubes contenant les feuilles broyé et on agite.

- On rajoute encore 700µl de la même solution, on agite encore et on les mets dans le bain marie pendant 1h (en agitant chaque 15mins)
- Les tubes sont sortis du bain et on ajoute 600µl de chloroforme isopentol (Fig. 2.7) et on agite les tubes manuellement pendant 15minutes.
- Après ces 15minutes on va mettre les tubes dans la centrifugeuse pendant 15minutes
- On obtient une phase aqueuse et une phase liquide (Fig. 2.8), la phase liquide est extraite et mit dans des tubes remplis avec 600µl d'isopropanol et on les met dans un congélateur pendant 1h (-4°C) puis le réfrigérateur à 4°C pendant 10minutes.
- Les tubes sont mis dans la centrifugeuse pendant 10minutes, Après centrifugation on va pouvoir voir l'ADN.
- Les tubes sont vidés et on ajoute 1000µl d'éthanol dans chaque tube et on centrifuge pendant 5minutes.
- On vide les tubes en laissant que l'ADN, et on les mets sous la hotte pour sécher (environ 20 minutes).
- Enfin en ajoute de l'eau pure (100µL) dans chaque tube et on conserve dans le congélateur jusqu'à utilisation.



Figure 2.6: Préparation de la solution CTAB (source personnelle, 2020)

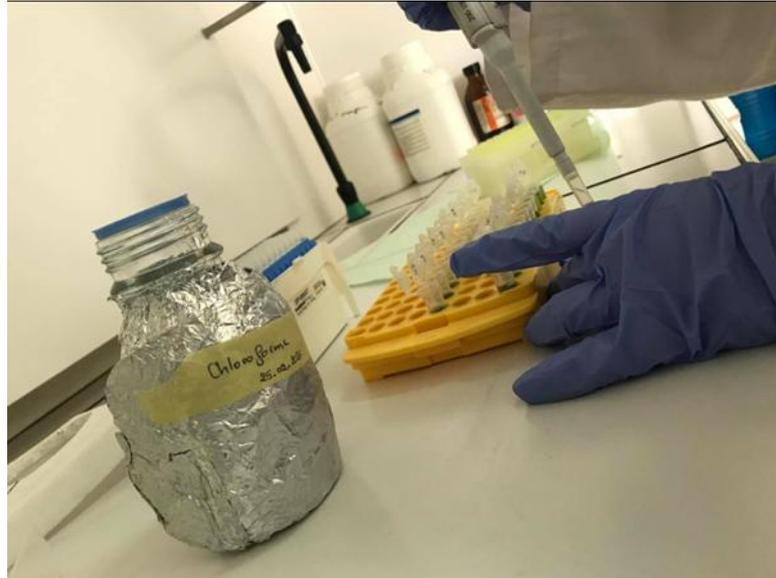


Figure 2.7 : Ajout du chloroforme d'isopentol (Source personnelle, 2020)

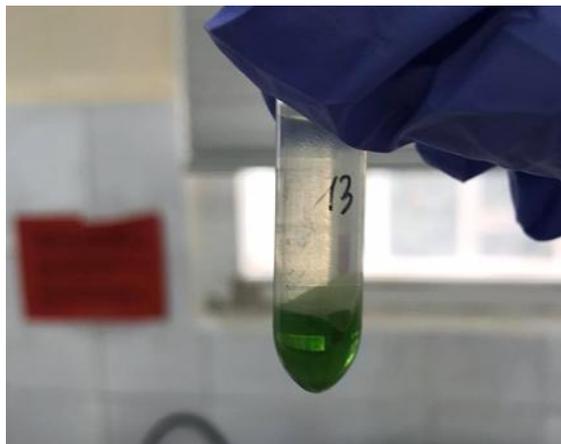


Figure 2.8 : Centrifugation (Source personnelle, 2020)

2.4.4. Quantification d'ADN Par électrophorèse :

L'électrophorèse est réalisée sur gel d'agarose 1%, Le gel est coulé dans la cuve et laissé pour refroidir. Une fois le refroidi il est placé dans une cuve pleine de tampon de migration TBE recouvreront légèrement le gel.

Pour le Mix de dépôt (mix d'ADN), il contient 3 μ l d'ADN, 3 μ l de bleu d'agarose et 4 μ l d'H₂O ultra pure. Le mix est déposé dans les puits (7 μ l) et la migration est effectuée en 2 étapes, d'abord à 80V puis à 120V.

La révélation des bandes a été réalisée par BET, pour cela on retire délicatement le gel et on le place dans un récipient, on rince à l'eau distillée et recouvre le gel

de solution BET, et on le laisse pendant 30 minutes. Placer sur un agitateur balance afin d'homogénéiser la coloration, Puis décolorer le gel.

Le gel est rincé avec de l'eau et on fait la lecture. (Fig. 2.9)

La révélation des bandes a été réalisée avec BET puis observée sur une lampe UV, elle a aussi été faite en utilisant le Nano Drop.

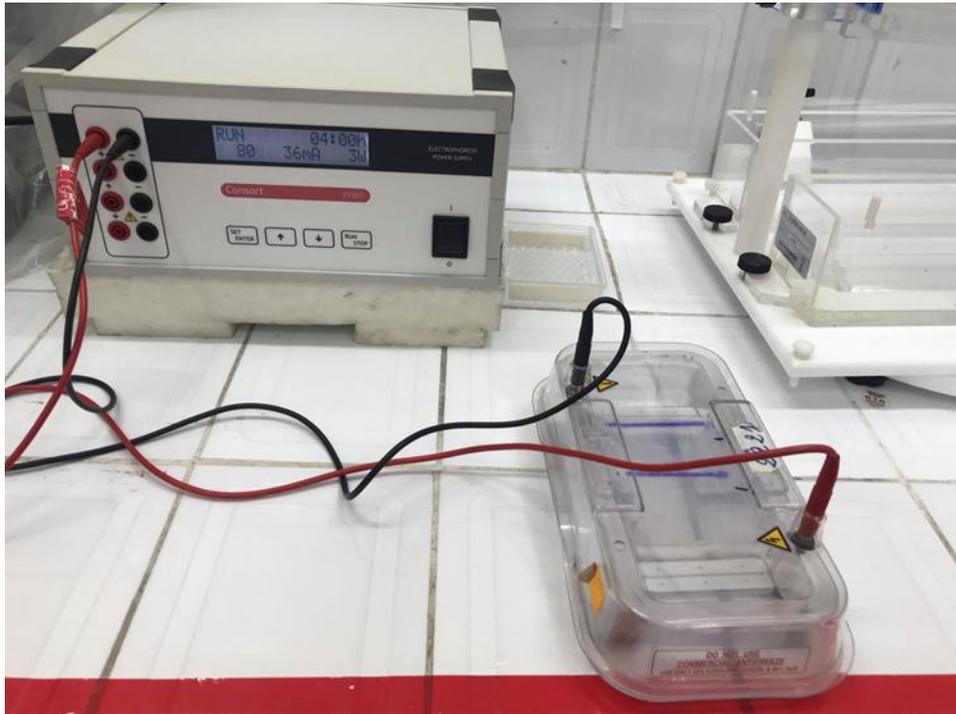


Figure 2.9: Quantification par électrophorèse (Source personnelle, 2020)

Conclusion générale et perspective

Conclusion :

En Algérie, le blé occupe une place importante dans l'alimentation, malheureusement son rendement reste faible, d'où l'importance du sélectionneur à choisir une stratégie d'action qui peut maximiser ses chances de création des variétés performantes, adaptées aux conditions du milieu et de bonne qualité technologique. (Ouakkal., 2016)

Les efforts de la recherche sur le blé tendre sont à la mesure de l'importance économique de cette culture. Cependant, les variétés traditionnelles du blé nécessitent actuellement de très nombreux traitements phytosanitaires pour lutter contre les maladies cryptogamiques, comme les rouilles.

La création de nouvelles variétés, portant des facteurs de résistance à ces maladies issue de variétés résistantes cultivées ou apparentées au blé, présente une alternative prometteuse pour limiter les intrants à la culture du blé.

L'objectif de notre travail est de faire une caractérisation morphologique et moléculaire de 43 génotypes de blé tendre (*Triticum aestivum* L.) et porté sur le génotypage et le phénotypage de 43 génotypes de blé tendre.

Notre étude a pour but, de tester des marqueurs moléculaires déjà publiés, liés à des caractères d'intérêt pour le blé tendre (résistance à la rouille brune et noire, de nanisme) pour analyser le génotypage du blé tendre .et de découvrir le phénotypage des génotypes testés par les marqueurs.

Perspectives :

Tout en continuant d'étudier les caractères morphologiques et moléculaires qui restent importants dans la caractérisation des variétés de blé, il est important également d'utiliser l'analyse moléculaire pour une meilleure connaissance génétique des espèces, afin de mieux les discriminer.

Dans le cadre d'un travail futur, il serait souhaitable de porter intérêt sur les points suivants :

- Approfondir l'étude sur les populations qui présentent des caractéristiques intéressantes et qui peuvent être introduit dans des programmes de sélections
- Etablir une stratégie de sélection des variétés reproductives et résistantes aux multiples conditions climatiques.
- Porter plus d'intérêt à ce travail en considérant plus des populations pour évaluer la variabilité inter et intra –variétés.
- Utiliser des outils moléculaires pour une meilleure évaluation de la diversité génétique des populations afin de mieux les discriminer.

Partant du fait que l'Algérie dispose d'un capital inestimable en ressources phylogénétiques qui posent problème à l'agriculture et l'économie algérienne il serait donc également important de collecter, évaluer, et intégrer aux nouvelles variétés pouvant être utiles à l'amélioration de la culture.

Références Bibliographiques

- [1].Aissa, M. (2019).Politique de développement des céréales en Algérie. Une fonte totale est nécessaire.
- [2].Alvaro.S, Biotechnologie végétale et éthique, Département des sciences de l'agriculture et de l'environnement Faculté d'agriculture. Université de Perugia.
- [3].Al-Samarai, F et Al. (2015) Molecular markers: An introduction an applications, Vol (9), pp: 118-119.
- [4].BOICHARD, D et al.Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale. 1998, INRA Prod. Anim., 11, 67-80.
- [5].Bonjean, A. (2001).Histoire de la culture des céréales et en particulier de celle de blé tendre (*Triticumaestivum* L.). Dossier de l'environnement de l'INRA, 29-37.
- [6].Carmen D.V, et Theresa F., 2003 - Utilisation des marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité génétique végétale [en ligne]. Disponible sur : https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular Markers Volume 1 fr. pdf
- [7].Charvet, J.ND (1977).Le blé dans le monde. Évolution récente de la consommation de la commercialisation de la production, 68-72.
- [8].Doussinault,G et al (2001) - Evolution de la variabilité génétique chez le blé. Dossier de l'environnement de l'INRA, N° 21. Station d'amélioration des plantes, 91-103.
- [9].Djermoun, A. (2009).La production céréalière en Algérie: les principales caractéristiques. chlef Algérie: université de hassiba ben bouali.
- [10].Elwattan. (2019, mars 12).L'Algérie a remporté 4.6 millions de tonnes de blé français. Retrieved from une commande qui sauve la campagne agricole dans l'hexagone: <https://www.elwatan.com/edition/economie/lalgerie-a-importé-46-millions-de-tonnes-de-blé-français-30-05-2019>
- [11].GuettouchiAhlem, Biotechnologie végétal et amélioration des plantes- Université Mohamed Boudiaf, M'Sila. P : 29.
- [12].Hamadache, A. (2001).Stade et variétés de blé. Algérie: institut technique des grandes cultures.

- [13].Hans Ellegren, 2004- Microsatellites : Simple sequences with complex evolution, Nature Reviews, Volume 5, p : 435.
- [14].Marqueurs Moléculaires basés sur la PCR. Takween.com, disponible sur « http://www.takween.com/techniques/11_RAPD.pdf » (consulté le 14 avril 2020).
- [15].Mosiniak, M. (2020, mars 2). Retrieved from biology et multimedia: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/blepain/12prig/origine.htm>
- [16].Najimi B, 2003- application des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. Biotechnol. Agro. Soc. Environ. 7 (1) ; PP : 17-35.
- [17].P.C. Turner., 2002- « Analyse et emplois de l'ADN cloné » (Chapitre J) Dans L'essentiel en Biologie moléculaire. Berti editions, PP. ou : 192-197.
- [18].Pieter Vos et al, 1995- AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 1995, Vol. 23, NO. 21 4407-4414.
- [19].Saulnier, L. (2012).Les graines de cereales diversité et compositions nutritionalcereals grains. diversity ans nutritional composition, 4-15.
- [20].Sadoun-coussin, C et al. (2002). allergie au blé. Enfants malade, 59.
- [21].Saintot et al, m. (2017). Manifestations digestives des intolerances au blé. Allergologie, 317-326. Doucement et mettre dans le congélateur.
- [22].Site web [En ligne], Disponible sur : <http://www.peyrehorade.fr/var/peyrehorade/storage/original/application/16b518d4ec8c4a419a1ed67eb633114c>
- [23].Site web [en ligne]. Disponible sur : « <https://www.gnis-pedagogie.org/sujet/marqueurs-moleculaires/> » (Consulté le 8/04/2020)
- [24].Site web [en ligne]. Disponible sur : « <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet> » [1]
- [25].Site web [en ligne]. Disponible sur : <http://www.biotech-ecolo.net/diversite-genetique-mesures/marqueurs-moleculaires-PCR.html>
- [26]. "La génomique en biologie végétale", chapitre 19.C. MHIRI, M.-A. GRANDBASTIEN. Éléments transposables et analyse de la biodiversité végétale. Editeurs JF Morot-Gaudry et JF Briat. Editions INRA, Paris, 2004, pp 377-401.

Annexes

Annexe 1

- **Tableau des variétés utilisées**

Ordre	Nom de la variété
1	Sahl
2	Dahrawir
3	Pavontall
4	Yv8 /6
5	58
6	Dharwar dry/nesser
7	Florencexaurore
8	Arz
9	Var anza
10	Ain abid
11	Bthidhab
12	Randa
13	Boumerzoug
14	Yoko
15	Parula
16	Massine
17	Styler
18	Phaurerbt
19	Cbt 91
20	Cbt 83
21	Cbt 94
22	Cbt 84
23	Annuela
24	Pastor
25	Wl 711
26	Pavon 76
27	Tchatcher
28	Buck buck
29	Cbt 93
30	Tc 6*/ (exchange)
31	Tetratchach 76
32	Nesser
33	78

34	83
35	Rhamour
36	80
37	Mexipak
38	Irena
39	Super koul
40	Ziad
41	90
42	Morocco
43	Demias

Annexe 2

• Produits et équipements utilisés

Verrerie et outils	Appareil	Produit/solution
- Becher	- Bain marie	- Eau distillée stérilisée
- Boite pétri	- Centrifugeuse	- CTAB
- Tube Eppandof	- Congélateur	- NaCl
- Eprouvette graduée.	- La hotte	- EDTA
- Entonnoir verre	- Agitateur	- TRIS
- Micropipette	- ph mètre	- β -mercaptoéthanol
- Papier absorbant	- Balance	- Chloroforme
- papier filtre	- Electrophorèse	- Isopropanol
- Papier aluminium	- Etuve	- Ethanol 70%
- Ciseau	- Autoclave	- Eau ultra pure
- Pince	- Appareil à glace	- TBE
- Barreaux magnétiques.	- Etalonnage (pH) basique	- Naoh
- Icones	- Agitateur balance	- Marqueur
- Plaque PCR	- Réfrigérateur	- BET
- Pot	- Lampe ultra-violet	- Acrylamide
		- Alcool

Annexe 3 :

- **Dispositif expérimental**

Block 1	(T192, T155, T95, T32, T57, T11, T223, T153, C6, T101, C1, T254, T59, T103, T49, T110, T100, T106, T165, T93, C3, T120, T273, T73, T149, T191, T168, T220, C2, T13, T215, C4, T40, T242, C5, T74, T6, T180, T79, T270)
Block 2	(C5, T271, T195, T109, T211, T231, T112, T76, T8, T29, T222, T201, T71, T265, T48, C1, T125, T38, T37, T259, T258, T21, C6, C4, T17, T147, T97, C2, T267, C3, T145, T217, T163, T96, T181, T249, T207, T161, T105, T99)
Block 3	(T228, T53, T190, T173, T136, T90, T58, C1, C3, T18, T52, T206, T121, T26, T182, T159, T212, T44, C5, T247, T2, T115, C6, T262, C2, T199, T266, C4, T75, T46, T64, T240, T187, T248, T54, T139, T1, T132, T45, T140)
Block 4	(T183, T204, T88, T241, T94, T214, T269, T43, T150, T41, T189, C3, T33, T226, C5, C6, T198, T89, T104, T131, T208, T174, T138, T113, T250, T81, T209, T179, C4, T53, T118, C2, T28, T23, T3, T12, T69, C1, T141, T27)
Block 5	(C4, T162, T117, T252, T176, T130, T272, T157, T232, C6, C5, C3, T135, T56, T114, T35, T36, T227, C2, T196, T14, T108, T219, T169, T84, T239, T 224, T68, T236, T42, T70, T172, C1, T124, T218, T200, T77, T246, T194, T116)
Block 6	(T184, T122, T235, T86, C6, T243, T20, T158, T260, T16, T167, T143, C5, T216, T68, T253, T178, T62, C4, T61, T119, T25, T19, T7, T229, T51, T15, T142, C1, T164, T197, T5, C2, T111, T80, T78, T107, T251, C3)
Block 7	(C3, T31, T237, C6, T133, T72, T127, T137, T254, T91, C4, T146, T193, T4, T156, T60, T171, T166, T47, T98, T82, T50, T230, T210, T234, T162, T263, T9, T10, T203, C5, T170, T255, C1, T87, T154, C2, T185, T188)

Block 8	(T126, T264, T152, T177, T83, T245, C2, C1, T22, T128, T205, T233, T202, T213, T144, C3, T129, T148, T30, T221, T24, T175, T244, T34, C6, T261, T238, T225, T92, T85, T257, T65, T66, T160, T67, T186, T39 T256, C5, C4)
---------	--

Annexe 4

- **Protocole d'extraction d'ADN**

- Pour 100ml de CTAB avec 0.2% μ l de β -mercaptoéthanol et préchauffer la solution dans un bain marie à 65° pendant 10 min.
- Ajouter 700 μ l d'une solution CTAB/ β -mercaptoéthanol dans chaque tube puis agiter manuellement pour homogénéiser la solution après ajouter 700 μ l d'une solution dans chaque tube puis agiter manuellement.
- Incuber pendant une heure à 65 ° au bain marie avec agitation chaque 15 min.
- Ajouter 600 μ l chloroforme : alcool iso amylique dans chaque tube et agiter manuellement (par inversement des tubes) pendant 15 min.
- Centrifuger les tubes pendant 15 minutes accélérer la phase de séparation, si nécessaire cette étape est répétée sur le surnageant pour clarifier la phase aqueuse.
- Dans des nouveaux tubes, ajouter 600 μ l d'isopropanol.
- Après centrifugation, récupérer la phase aqueuse supérieure sans aspirer l'interphase et la transférer dans des nouveaux tubes puis laisser précipiter au congélateur pendant 1 heure.
- Centrifuger à 13000g à 4°C pendant 10 minutes.
- Eliminer l'isopropanol par retournement lent et progressif du tube sur papier absorbant ; on peut voir apparaître un filament blanc ou un amas correspondant à l'ADN extrait.
- Ajouter 1000 μ l d'éthanol 70% dans chaque tube pour rincer le culot.
- Centrifuger à 13000g à 4°C pendant 5 minutes.

- Retourner les tubes afin d'éliminer l'éthanol et de récupérer seulement le culot d'ADN qui reste collé au fond du tube, en utilisant une pipette, afin de faire attention l'ADN qui peut se détacher du fond du tube et être éliminé avec l'éthanol.
- Laisser sécher les culots obtenus dans la hotte pendant 20min (en laissant les bouchons des tubes ouverts).
- Reprendre le culot d'ADN et ajouter 100 μ l de l'eau ultra pure.
- Agiter les échantillons.