

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD Dahleb Blida -1-

Faculté sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologies



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
du Diplôme de Master 2 en biotechnologie académique
Option Biotechnologie végétale

Thème

Recherche de facteurs de résistance aux maladies fongiques
chez le blé, par le marquage moléculaire

Présenté par

TAKDJOUT Farah Insaf

SOUKHAL Abdelbarie

KECHIDA Ismail

Devant le jury composé de

Mr. Snoussi	Pr	Président	université Blida -1-
Mr. Benmoussa	Pr	Examineur	université Blida -1-
Mme. Kabour	Pr	Promoteur	université Blida -1-
Mme. Meamiche	Dr	Co-promoteur	l'institut INRAA

Année universitaire : 2019-2020

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD Dahleb Blida -1-

Faculté sciences de la nature et de la vie

Département de biotechnologies



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention
du Diplôme de Master 2 en biotechnologie académique
Option Biotechnologie végétale

Thème

Recherche de facteurs de résistance aux maladies fongiques
chez le blé, par le marquage moléculaire

Présenté par

TAKDJOUT Farah Insaf

SOUKHAL Abdelbarie

KECHIDA Ismail

Devant le jury composé de

Mr. Snoussi	Pr	Président	université Blida -1-
Mr. Benmoussa	Pr	Examineur	université Blida -1-
Mme. Kabour	Pr	Promoteur	université Blida -1-
Mme. Meamiche	Dr	Co-promoteur	INRAA

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer toute notre reconnaissance et remerciements à Madame Kabour D, Professeur à l'université Saad Dahleb Blida 1, qui a fait preuve d'une grande patience et a été d'un grand apport pour la réalisation de ce travail. Ses conseils, ses orientations, sa disponibilité ainsi que son soutien moral et scientifique nous ont permis de mener à terme ce projet. Son encadrement était des plus exemplaires, qu'elle trouve ici, le témoignage d'une profonde gratitude.

Nos sincères remerciements s'adressent aussi à:

Monsieur SNOUSSI-Professeur au département biotechnologie à la faculté SNV, université Saad Dahleb Blida 1, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de jury de ce mémoire.

Monsieur BENMOUSSA-Professeur à la faculté SNV département de biotechnologie, université Saad Dahleb Blida, de nous avoir honorée d'accepté d'examiner ce travail.

Monsieur ZOUAOULS-chef d'option de biotechnologie végétale qui nous a donné l'accès aux études dans ce master, je remercie infiniment, pour sa gentillesse et son esprit de recherche, mes respectueuses considérations.

Mme MEAMICHE. H-Docteur en science à l'institut national de la recherche agronomique et maître de recherche B pour nous avoir ouvert son laboratoire pour la réalisation de ce travail.

A tous nos enseignants qui ont prodigués notre cursus étudiantin.

Ainsi que ceux qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce travail, nous vous remercions !

Dédicaces

Nous dédions ce modeste travail

A mes parents Amar Takdjout et Nabila Gueddouh, tous les hommages ne pourront être à la hauteur de l'amour qu'ils ne cessent de me procurer que dieu leur accorde une bonne santé et une longue vie.

A ma sœur Lili Takdjout, qui a su être d'un soutien moral.

A Luna et Dada et qui m'ont m'aidé à évacuer mon stress

Insaf

A mes parents Soukhal Djamel et Damardji Seloua, pour leur amour et leurs encouragements qu'ils trouvent le témoignage de ma profonde affection et gratitude.

A mes deux petites sœur Abrar et Afnan, pour leur patience et leur positivité

A mon oncle Damardji Djamel, pour sa bienveillance et son apprentissage scientifique qu'il a su m'octroyé durant mon parcours scolaire et universitaire.

Abdelbarie

A la mémoire de mon défunt père Kechida Bachir, qui m'a élevé, instruit, guidé et qui a participé à mon éducation et su faire naître en moi un esprit scientifique.

A ma mère Merdjani Zohra, qui s'est sacrifié afin que je puisse donner le meilleur de moi-même.

A eux deux je leur dis milles merci d'exister et d'avoir fait partie de ma vie car sans vous je n'aurai jamais atteint mes objectifs fixés.

A mes trois sœurs KechidaNawel, Sarah et Hadjer qui m'ont encouragées dans ce parcours difficile.

A mon grand frère Kechida Abdelkader, qui a su me recadré quand j'en avais besoin

A ma petite nièce adorée que dieu la protège.

Ismail

Et à notre Co-promotrice HayetteMeamiche qui nous a accompagnées et qui nous a guidées tout au long de ce travail.

A vous tous, milles merci !

Résumé

La culture des céréales est le fondement de l'alimentation dans la majorité des sociétés et joue un rôle conséquent sur le plan économique et social, notamment en Algérie la culture de céréale représente un taux important des terrains agricoles mais ces cultures sont confrontées à différentes contraintes, dont les maladies fongiques.

parmi ces maladies la rouille brune une maladie très préjudiciable au rendement et ces conséquences sont extrêmement dommageables dans les parcelles touchées, en réponse à ça nous avons procédé à un croisement entre deux variétés Stylet et Anuello (une variété résistante et une autre sensible à la rouille brune) qui ont donné naissance à 4 lignées (BM, GGR, FA, HD) nous avons par la suite fait une extraction d'ADN sur les jeunes feuilles des parents ainsi que des descendants pour ensuite amplifier ces fragments d'ADN avec l'amorce du gène de résistance à la rouille brune LR 34, après analyse des résultats de l'électrophorèse nous avons déduit que stylet, BM et FA sont sensibles à la rouille brune et Anuello, GGR et HD sont résistants.

Ces résultats nous confèrent un pouvoir de sélection très spécifique et rapide par rapport à la technique de sélection classique qui elle repose sur les observations phénotypiques et qui par conséquent prend plus de temps et n'est pas spécifique donc le marquage moléculaire est la meilleure option de l'amélioration variétale vis-à-vis du rendement et de la spécificité.

Mots clés : Céréales, maladies fongiques, variétés résistantes, variétés sensibles, marquage moléculaire, gène de résistance,

Abstract

The cultivation of cereals is the basis of food in the majority of societies and plays a significant role on the economic and social plan, especially in Algeria the cultivation of cereals represents a significant rate of agricultural land but these cultures are confronted with various constraints. , including fungal diseases.

among these diseases the brown rust a disease very detrimental to the yield and these consequences are extremely damaging in the affected plots, in response to this we proceed to a cross between two varieties Stylet and Anuello (a resistant variety and another sensitive to rust brown) which gave birth to 4 lines (BM, GGR, FA, HD) we then performed a DNA extraction on the young leaves of the parents as well as the descendants to then amplify these DNA fragments with the primer of the LR 34 brown rust resistance gene, after analysis of the results of the electrophoresis we deduced that stylet, BM and FA are sensitive to brown rust and Anuello, GGR and HD are resistant.

These results give us a very specific and rapid selection power compared to conventional selection techniques which are based on phenotypic observations and which therefore take more time and are therefore not specific for molecular labeling and the best option of varietal improvement with regard to yield and specificity.

Keys word: Cereals, fungal diseases, resistant variety , sensitive variety , molecular labeling, resistance gene.

ملخص

تعتبر محاصيل الحبوب من أول المحاصيل التي زرعتها الأنسان في غالبية المجتمعات وتلعب دورًا مهمًا على المستوى الاقتصادي والاجتماعي. في الجزائر، تستحوذ زراعة الحبوب على نسبة كبيرة من الأراضي الزراعية لكنها تواجه صعوبات مختلفة، خاصة من ناحية الأمراض الفطرية.

من بين هذه الأمراض الصدأ البني، هو مرض يصيب المحصول بأضرار وخيمة للغاية ينجر عنها فقدان كلي للمحصول. المتواجد في الأراضي المصابة، استجابة لذلك قمنا بتجهين صنفين من الحبوب هما Stylet و Anuello (صنف مقاوم وآخر حساس للصدأ اللون البني) الذي نتج عنه سلالة الأولى ذات الأربعة أنواع (FA، GGR، BM)، ثم أجرينا استخراج الحمض النووي على الأوراق الصغيرة للوالدين وكذلك الأحفاد لنسخ أجزاء الحمض النووي هذه باستخدام جين البداية LR 34 المقاوم للصدأ البني، بعد تحليل نتائج الأشعاع الكهربائية (Électrophorèse) استنتجنا أن Stylet و BM و FA حساسان للصدأ البني وأن Anuello و GGR و HD مقاومان.

تمنحنا هاته النتائج قوة اختيار محددة وسريعة جدًا مقارنة بتقنيات الاختيار التقليدية التي تستند إلى ملاحظات النمط الظاهري والتي تستغرق وقتًا أطول وبالتالي فهي غير محددة، ولهذا فإن وضع الواسمات الجزيئية هو الخيار الأفضل لتحسين الأصناف فيما يتعلق بالإنتاجية والتنوعية.

الكلمات المفتاحية: الحبوب، الأمراض الفطرية، نوعية مقاومة، نوعية حساسة، الواسمات الجزيئية، جين المقاومة.

LISTE DES ABREVIATIONS

- ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- SSD**: SingelSeedDescent.
- SSR**: Simple SequenceRepeat.
- CTAB**: CetylTrimethyl Ammonium Bromide.
- BME**: B-Mercaptoethanol.
- PCR** : Polymérase Chain Réaction.
- L, mL, μ L** : litre, millilitre, microlitre.
- °C** : Degré Celsius.
- g** : gramme.
- V** : Volte.
- UV** : Ultraviolet.
- KB** : kilos bases.
- PB** : Paires de bases.
- AB** : Acide Borique
- TB** : Tris-Base
- MAS** : Sélection assisté par marqueur
- INRAA** : Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :Image représentant la morphologie externe du blé dur (<i>triticum durum</i>).(<i>Bousquet, 2014</i>)	4
Figure 2 : Image représentant la morphologie externe du ble tendre (<i>triticum aestivum</i>) (<i>Philippe,2019</i>).	6
Figure 3 : Représentation schématique de l'histoire évolutive des espèces de <i>Triticum</i> et <i>Aegilops</i> .D'après <i>FEUILLET</i> et al. (2008).	9
Figure 4 : Représentation schématique montrant le devenir du chromosome B du groupe 5 de blé hexaploïde dans des lignées euploïdies et aneuploïdes.(<i>SEARS, 1966</i>).	10
Figure 5 : image représentative de la rouille jaune chez le blé (<i>triticum</i>). (<i>Bousricir, 2019</i>).....	19
Figure 6 : représentation en lignes de pustule jaune chez le blé(<i>Triticum</i>).(<i>Pluquet, 2019</i>)	20
Figure 7 : Image représentative de la rouille chez le blé (<i>triticum</i>). (<i>BASF SE.2019</i>).	21
Figure 8 : Représentation des pustules dispersées de façon homogène chez le blé (<i>triticum</i>). (<i>BASF SE2019</i>).	23
Figure 9 :Image représentant la septoriose chez le blé (<i>triticum</i>).(<i>Arvalis,2020</i>)	24
Figure 10 : Représentation de pycnide noir sur le feuille du ble (<i>triticum</i>).(<i>Arvalis-institut du végétal ,2018</i>)	25
Figure 11 : Image représentant l'helminthosporiose (tan spot) chez le blé (<i>triticum</i>).(<i>Acta,2016</i>).	26
Figure 12 : Progression de l'helminthosporiose du bas vers le haut chez le blé (<i>triticum</i>). (<i>Acta,2016</i>).	27
Figure 13 : Différentiation des phases lors de l'extraction d'ADN	38
Figure 14 : Image correspondant à une centrifugeuse	38
Figure 15 : Image représentative de la structure CATB.	39
Figure 16 : Représentation de la solubilisation des Protéines membranaires par CTAB.....	39
Figure 17 : Résultat de la quantification.	41
Figure 18 : Représentation des différentes phases du cycle de PCR.	44
Figure 19 : Révélation électrophorèse des résultats de la PCR.	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: représentation de la production du blé en Algérie (1973-2004).....	11
Tableau 2: Evolution des rendements ($U= Qx/ha$).	12
Tableau 3: Consommation par tête de blé dans quelques pays, 1961-2003.	14
Tableau 4: Représentation d'une préparation de solution TBE.	36
Tableau 5: tableau des marqueurs par rapport aux variétés.	39
Tableau 6 : représentation les taux de dilution.....	43
Tableau 7: composant des échantillons.	43
Tableau 8: emplacement des échantillons sur les barrettes.	44

SOMMAIRE

Chapitre 1 : Généralité sur le blé.....	3
1. Généralité sur les céréales.....	3
1.1 Types de céréales	3
1.2 Blé dur et blé tendre	3
1.2.1 Blé dur.....	4
1.2.2 Blé tendre	6
1.3 Répartition du blé (production, rendement).....	11
1.3.1 Production	11
1.3.2 Rendement	11
1.4 Importance de la culture des céréales.....	12
1.4.1 En Algérie	13
Chapitre 2 : Contraintes et solutions	16
1. Contraintes abiotique	16
1-1- L'éclairement.....	16
1-2- La température.....	16
1-2-1- Les basses températures	16
1-2-2- Les températures élevées.....	17
1-3- Le stress hydrique.....	18
2. Contraintes Biotiques.....	19
2.1 Rouille jaune	19
2.1.1 Epidémiologie de la rouille jaune.....	20
2.1.2 Symptômes.....	20
2.1.3 Evolution de la rouille jaune	21
2.1.4 Nuisibilité.....	21
2.2 La rouille brune.....	21

2.2.1	Symptômes.....	22
2.3	La Septoriose du blé.....	24
2.3.1	Symptômes.....	24
2.3.2	Evolution.....	25
2.4	Helminthosporiose (tan spot).....	25
2.4.1	Symptômes.....	26
2.4.2	Evolution.....	27
2.4.3	Les conditions favorables.....	27
3	Amélioration végétal chez le blé.....	28
3.1.1	Création variétale.....	28
3.1.2	Objectifs de la sélection.....	29
3.1.3	Les différents types de sélection.....	29
4	Biotechnologies et solutions proposées (amélioration végétal du blé).....	34
Chapitre 3 : matériel et méthode.....		36
1	Préparation d'un gel d'agarose à 1%.....	36
2	Extraction d'ADN.....	37
2.1	Broyage :.....	37
2.2	Solution d'extraction :.....	37
3	Rôles des différents produits utilisés dans ce protocole.....	39
4	Quantification des échantillons.....	40
4.1	Préparer la migration :.....	41
4.2	Révélation du gel :.....	41
5	Résultats de la quantification.....	41
5.1	Concentration en ADN.....	41
5.2	Qualité de l'ADN.....	42
6	PCR.....	43
Chapitre 4 : résultat et discussion.....		45
1.	Résultats.....	45

2. Discussion	46
Conclusion	46
Références bibliographiques	48

INTRODUCTION GENERAL

Le blé compte parmi les espèces les plus anciennement cultivées et constitue la base de l'alimentation d'une grande partie de l'humanité, d'où son importance économique.

Cependant, cette culture est très sensible aux maladies causées principalement par les Champignons dont la rouille jaune, la rouille brune, la septoriose, l'helminthosporiose. L'amélioration de la production du blé passe donc par un meilleur contrôle de ces pathologies. En effet, le développement de variétés à grande production avec une qualité adéquate du grain reste le principal objectif du sélectionneur. Toutefois, à ces besoins classiques s'ajoutent aujourd'hui des exigences découlant d'une grande prise de conscience sociale en matière de protection de l'environnement, menant à la limitation des traitements phytosanitaires et de la fertilisation chimique. Les techniques nouvelles, en particulier les marqueurs moléculaires, apparaissent comme des outils indispensables d'appui aux programmes classiques d'amélioration pour relever ces défis.

L'utilisation de variétés résistantes constitue une composante essentielle pour la majorité des programmes de sélection et un moyen de contrôle efficace qui prend en considération l'aspect écologique aussi bien qu'économique. Cependant, la pression de sélection exercée par les variétés à résistance mono-génique favorise le développement de nouveaux biotypes capables de contourner ces résistances, ce qui nécessite la recherche continue et rapide de nouvelles sources de résistance. Cette recherche a été

Largement facilitée par l'avènement des techniques de marquage moléculaire durant ces dernières années. En effet, plusieurs gènes de résistance aux maladies ont été récemment localisés dans le génome du blé tendre par l'établissement de liaisons entre ces derniers et des marqueurs moléculaires sur les différentes cartes génétiques. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante. Ces marqueurs moléculaires deviennent aujourd'hui un outil essentiel d'amélioration des plantes et ouvrent de nouvelles perspectives pour le sélectionneur. La recherche de marqueurs moléculaires étroitement liés aux gènes de résistances constitue une étape importante avant leur exploitation pratique pour accélérer et améliorer l'efficacité des programmes de sélection (Hospital, 2001 ; Moreau *et al.*, 2011 ; Eagles *et al.* 2001 ; Dekkers, Hospital, 2002).

La sélection assistée par marqueurs (MAS) est particulièrement avantageuse dans le cas de l'amélioration des résistances aux maladies(**MichelmoreRW., 1995**).

Elle peut se faire sans avoir recours aux tests d'inoculation, permettant ainsi d'éviter les erreurs associées à l'utilisation de ces procédures et de mener l'amélioration de la résistance même dans les aires où le pathogène n'existe pas. De même, les marqueurs moléculaires permettent le cumul rapide de plusieurs gènes dans une seule variété élite en vue d'une résistance plus efficace, et la maîtrise de la taille des fragments chromosomiques introduits par rétrocroisements, ce qui élimine les effets défavorables susceptibles d'être transmis avec les gènes cibles introgressés (**Hospital, 2001**). Ainsi, les schémas de sélection seront accélérés puisque le sélectionneur peut inférer la présence du gène par la présence du marqueur avant même l'expression du phénotype.

Cette sélection assistée par marqueurs est donc d'un intérêt certain pour le sélectionneur puisqu'elle offre l'avantage d'une sélection efficace, rapide et précoce, et devient alors un complément nécessaire aux méthodes traditionnelles d'amélioration génétique des céréales.

Outre leur intérêt dans le domaine de la sélection, les marqueurs moléculaires constituent des outils puissants pour la caractérisation moléculaire des gènes de résistance via la cartographie fine des régions contenant ces gènes menant à leur clonage (**Tanksley et al., 1989 ; Michelmore RW., 1995**).

Le présent article a pour objectif de décrire les principaux systèmes de marquage moléculaire appliqués chez le blé, puis d'évaluer les applications courantes et potentielles de ces marqueurs dans l'amélioration de cette culture pour les résistances aux maladies.

Chapitre 1 : Généralité sur le blé

1. Généralité sur les céréales

Les céréales sont des espèces généralement cultivées pour leur grain, dont l'albumen amylicé, réduit en farine, est consommable par l'homme ou par les animaux domestiques

La plupart des céréales appartient à la famille des graminées (ou poacées). Ce sont : le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le maïs, le riz, le millet, le sorgho. Les unes appartiennent à la sous famille des Festucoidées : blé, orge, avoine, seigle ; les autres à la sous famille des Panicoidées : maïs, riz sorgho, millet.

Enfin, une céréale, le sarrasin appartient à une autre famille, celles des Polygonacées. (**Jaques B. (1980). Les cultures céréalières.ISBN.Paris).**

1.1 Types de céréales

Les céréales regroupent le blé, le riz, le maïs, l'orge, l'avoine, le seigle et les mils (millet et sorghos). Elles appartiennent à la famille des Poacées (*Poaceae*, anciennement Graminées). On y inclut parfois, bien que ce ne soient pas des céréales, des plantes aux qualités nutritionnelles proches : le sarrasin (*Fagopyrum esculentum*), appelé encore blé noir, de la famille des Polygonacées, et le quinoa (*Chenopodium quinoa*), de la famille des Amaranthacées.

Les céréales ont été cultivées dès les débuts de l'agriculture, plusieurs millénaires avant notre ère : elles ont constitué le principal fondement de la révolution du Néolithique, c'est-à-dire de l'invention de l'agriculture. Elles furent ensuite étroitement liées à l'histoire et au développement de grandes civilisations, qu'elles ont contribué à caractériser au travers de régimes alimentaires marqués par la consommation et la culture d'une céréale donnée.

1.2 Blé dur et blé tendre

Le blé est une monocotylédone de la famille des graminées ou Poaceae appartenant au genre *Triticum*. Cette plante annuelle produit un fruit sec indéhiscent, le caryopse. Le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*) sont les deux espèces les plus cultivées dans le monde.

1.2.1 Blé dur

Il s'agit d'une graminée annuelle de hauteur moyenne et dont le limbe des feuilles est aplati (figure1). L'inflorescence en épi terminal se compose de fleurs parfaites. Comme pour le blé tendre, il existe des variétés de blé dur demi naines. Le système racinaire comprend des racines séminales produites par la plantule durant la levée, ainsi que des racines adventives qui se forment plus tard à partir des nœuds à la base de la plante et constituent le système racinaire permanent. Le blé dur possède une tige cylindrique, dressée, habituellement creuse et subdivisée en entrenœuds. Certaines variétés possèdent toutefois des tiges pleines (**Clarke et al., 2002**).



Figure 1 : Image représentant la morphologie externe du blé dur (*triticum durum*). (Bousquet, 2014)

Le chaume (talles) se forme à partir de bourgeons axillaires aux nœuds à la base de la tige principale. Le nombre de brins dépend de la variété, des conditions de croissance et de la densité de plantation. Dans des conditions normales, une plante peut produire en tout trois brins en plus de la tige principale, mais tous ne grènent pas nécessairement (**Bozzini, 1988**). Comme pour d'autres graminées, les feuilles de blé dur se composent d'une base (gaine) entourant la tige, d'une partie terminale qui s'aligne avec les nervures parallèles et d'une extrémité pointue. Au point d'attache de la gaine de la feuille se trouve une membrane mince et transparente (ligule) comportant deux petits appendices latéraux (oreillettes). La tige principale et chaque brin portent une inflorescence en épi terminal.

L'inflorescence du blé dur est un épi muni d'un rachis portant des épillets séparés par de courts entrenœuds (**Bozzini, 1988**). Chaque épillet compte deux glumes (bractées) renfermant de deux à cinq fleurs distiques sur une rachéole. Chaque fleur parfaite est renfermée dans des structures semblables à des bractées, soit la glumelle inférieure (l'Emma ou lemme) et la glumelle supérieure (paléa). Chacune compte trois étamines à anthères biloculaires, ainsi qu'un pistil à deux styles à stigmates plumeux. À maturité, le grain de pollen fusiforme contient habituellement trois noyaux. Chaque fleur peut produire un fruit à une seule graine, soit le caryopse. Chaque graine contient un large endosperme et un embryon aplati situé à l'apex de la graine et à proximité de la base de la fleur.

Le blé dur est bien adapté aux régions à climat relativement sec, où il fait chaud le jour et frais la nuit durant la période végétative, ce qui est typique des climats méditerranéens et tempérés. Les semences peuvent lever à aussi peu que 2 °C, même si la température optimale est de 15 °C . La plus grande partie du blé dur produit dans le monde est constituée de blé de printemps; toutefois, il existe des variétés de blé dur d'hiver (qui ont besoin de vernalisation pour amorcer la transition de la phase végétative à la phase reproductrice).

a) Classification botanique

Le blé dur obéit à la classification suivante (**Prats, 1960 ; Crête ,1965 ; Feillet, 2000**) :

Embranchement :	Angiospermes
Sous embranchement :	Spermaphytes
Classe :	Monocotylédones
Ordre :	Glumiflorales
Super ordre :	Comméliniflorales :
Famille :	Gramineae
Tribu :	Triticeae
Sous tribu :	Triticinae
Genre :	Triticum
Espèce :	Triticum durum

b) Classification génétique

Les sortes de blé se différencient par le nombre de leur chromosome ainsi que par la constitution de leur génome, certains d'entre eux sont diploïdes (ils ont deux jeux de chromosomes) et partagent le génome appelé AA. D'autres quant à eux sont tétraploïdes (quatre jeux de chromosomes) et de formule AA BB.

Un groupe est hexacorde (six jeux de chromosomes) et de formule AA BB DD. Enfin, des blés endémiques de Géorgie forment une série parallèle, avec les génomes AA GG et AA AA GG.

A l'intérieur de chaque groupe, les formes sont inter fertiles alors que les hybrides entre groupes sont fortement stériles. De plus, on doit à un très faible nombre de gènes les différences spectaculaires entre formes sauvages (à rachis fragile) et forme cultivées (à rachis solide), ou bien entre grains vêtus (à glumes et glumelles adhérentes au grain). Et grains nus. Les auteurs modernes (**Mac key, 1966, Zohary et Hopf, 1993**) estiment que c'est à ces groupes naturels qu'il faut accorder le statut d'espèce.

1.2.2 Blé tendre

Parmi toutes les espèces de blé cultivées, le *T. aestivum*, ou blé commun, est la plus importante sur le plan économique (figure2).

Selon **Lersten (1987)**, le *T. aestivum* est une graminée annuelle ou annuelle hivernale, de hauteur moyenne. Les feuilles ont un limbe plan, et l'inflorescence est un épi terminal, à fleurs parfaites.



Figure 2: Image représentant la morphologie externe du blé tendre (*triticum aestivum*) (Philippe,2019).

L'état végétatif de la plante se caractérise par la présence d'un plateau de tallage, dont les bourgeons axillaires se transforment en tiges feuillées. Les tiges, appelées chaumes, possèdent cinq à sept nœuds ainsi que trois ou quatre feuilles véritables. La feuille la plus haute, ou dernière feuille, sous-tend l'inflorescence. Chaque chaume produit un épi composé, dont les ramifications sont les épillets. Les épillets sont portés par le rachis, ou axe principal de l'épi, et séparés par de courts entre-nœuds. Chaque épillet est un axe reproducteur condensé, sous-tendu par deux bractées stériles appelées glumes. Les glumes enveloppent les deux à cinq fleurs, portées chacune par un court pédicelle appelé rachéole. La fleur possède trois étamines se terminant chacune par une grande anthère; le pistil comprend un seul ovaire, un seul ovule et deux styles se terminant chacun par un stigmate plumeux et ramifié.

Le blé tendre est une céréale importante en termes d'exportation et de consommation intérieure dans de nombreux pays du monde. En 1995, plus de 40 millions d'hectares ont été consacrés à la culture du blé en Amérique du Nord, dont un peu moins du tiers (11,4 millions d'hectares) au Canada.

Les méthodes commerciales d'ensemencement et de récolte varient selon le type de blé. Dans le cas du blé d'hiver, comme la vernalisation est nécessaire, les semis doivent avoir lieu en septembre ou en octobre, afin que les plants puissent lever et se développer suffisamment avant le début de l'hiver. Durant la saison froide, les plants restent à l'état dormant. Avec les premières chaleurs du printemps, ils reprennent leur croissance et passent à un stade reproductif, l'épiaison. Dans la plupart des régions d'Amérique du Nord, la récolte peut commencer vers la mi-juillet. Dans le cas du blé de printemps, les plants ne requièrent aucun stade de dormance, et environ 90 jours s'écoulent du semis à la récolte.

a) Classification botanique

Le blé tendre obéit à la classification suivante (**Bonneuil et al., 2009**) :

Règne :	végétalplantae
Sous-règne :	tracheobionta
L'embrochement :	manioliophyta
Classe :	liliopsysda
Sous-classe :	comelinidae
Ordre :	cyperales
Famille :	poaceae
Sous-famille :	pooideae
Tribu :	triticeae
Genre :	triticum
Espèce :	Triticumaestivum

b) Classification génétique

Les espèces du genre *Triticum* sont très variées dans leur composition chromosomique avec certaines espèces diploïdes qui possèdent deux jeux de chromosomes ($2n=2x=14$) et un grand nombre d'espèces polyploïdes stables contenant quatre (tétraploïde, $2n=4x=28$) ou six (hexaploïde, $2n=6x=42$) jeux de chromosomes. Le génome du blé tendre (*T. aestivum* L.) est constitué de trois génomes A, B et D et résulte de l'hybridation successive de génomes diploïdes et tétraploïdes avec des génomes diploïdes (Figure 3). La première hybridation s'est faite il y a 0.5 à 1.3 million d'années entre *Triticum urartu* Thum. Ex. Gandil. (AA, $2n=14$) (**DVORAK et al. 1993**) et plante ou plusieurs plantes encore non identifiées originaires le plus probablement de la section *Sitopsis* (BB, $2n=14$) (**BAHRMAN et al. 1988; KILIAN et al. 2007**). Celle-ci a résulté en un blé tétraploïde *Triticum turgidum* L. ($2n=28$, AABB) (Figure 3) qui a donné naissance à plusieurs groupes variétaux distincts dont *T. turgidum* var. *diccocoides*, non cultivable et considéré comme le plus proche du type primitif (Figure 3). Cette lignée a, à son tour, donné lieu à plusieurs groupes cultivés qui sont tous inter-fertiles. La variété *T. turgidum* var. *dicocon* (AABB), dérivée de *T. turgidum* var. *diccocoides*, est le probable progéniteur du blé hexaploïde (AABBDD) au travers d'une hybridation avec l'espèce sauvage *Aegilops tauschii* (DD) (**KIMBER and FELDMAN 1987**) il y a 8 à 10'000 ans. Des études ont indiqué l'existence d'au moins 2 progéniteurs génétiquement différents à l'origine du

génomme DD du blé hexaploïde, suggérant des événements indépendants de polyploïdisation (DVORAK et al. 1998; GILES and BROWN 2006).

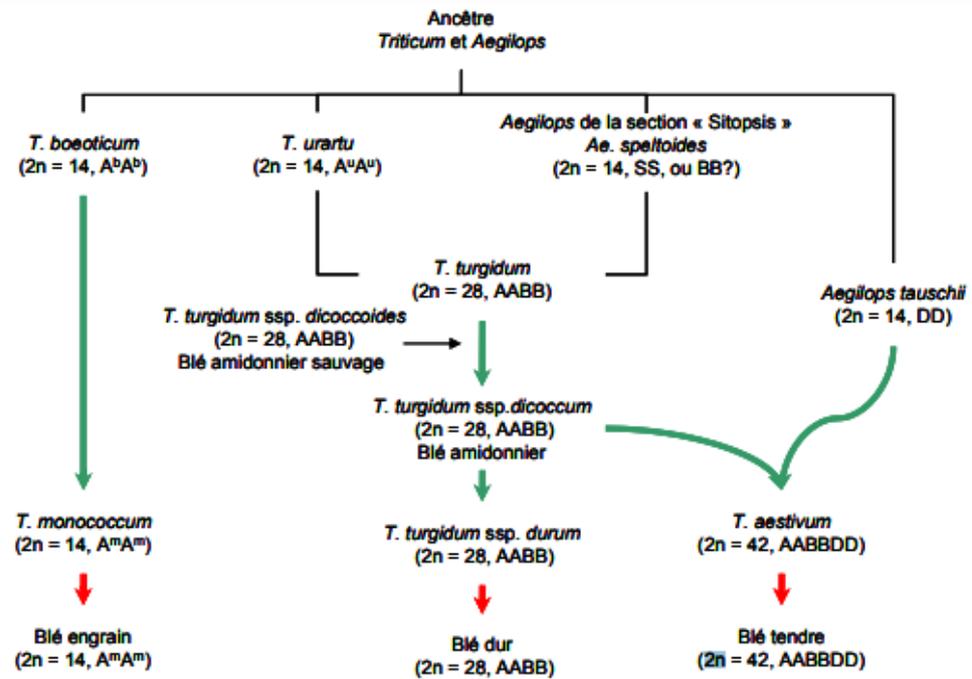


Figure 3: Représentation schématique de l'histoire évolutive des espèces de Triticum et Aegilops. D'après FEUILLET et al. (2008).

Les chromosomes des génomes A, B et D présentent une similitude génétique malgré leurs origines différentes. SEARS (1954) a classé les 42 chromosomes du blé tendre en sept groupes, composés chacun de trois paires de chromosomes sur la base de leurs affinités. Les paires d'un même groupe sont dites homologues. Normalement, l'appariement entre chromosomes homologues ne se fait pas à la méiose, et seuls les chromosomes homologues s'apparient. Ce phénomène est contrôlé génétiquement par un ensemble de gènes localisés sur plusieurs chromosomes, dont le plus important est le gène Ph1 situé sur le bras long du chromosome 5B (GILL et al. 1993; JAMPATES and DVORAK 1986; RILEY and CHAPMAN 1958 ; SEARS and OKAMOTO 1958). Ainsi malgré la complexité de son génome, l'analyse génétique du blé tendre ne revêt pas de difficulté particulière puisqu'il se comporte au moment de la méiose comme un génome diploïde. Grâce à son statut polyploïde, le blé supporte en général assez bien les aberrations chromosomiques telles que l'absence d'un chromosome ou d'une fraction de chromosome. Cette propriété a été largement utilisée par Earnie Sears pour créer toute

une série de lignées aneuploïdes (Figure 4) dont les premières furent des lignées monosomiques et ditélosomiques (SEARS 1954), suivies des lignées nulli-tétrasoniques (NT) (SEARS 1966) (Figure 4). Une lignée nullisomique-tétrasonique est une lignée dans laquelle une paire de chromosomes est manquante est remplacée par une autre paire de chromosomes homologues. Le génome d'une lignée NT chez un blé hexaploïde (*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$) est donc composé de 19 paires + 4 chromosomes (correspondant à un chromosome présent en 4 exemplaires au lieu de deux pour compenser la paire de chromosomes homéologues manquants) (Figure 4). Elles sont très utiles en cartographie car elles permettent de rapidement identifier

La localisation chromosomique d'un segment d'ADN (marqueur, gène). Ces différentes lignées ont également été très utiles pour la création de lignées de substitutions dans lesquelles un chromosome entier d'une variété est remplacé par celui d'une autre (Figure 4) permettant ainsi d'identifier la présence d'un allèle d'intérêt sur un chromosome particulier.

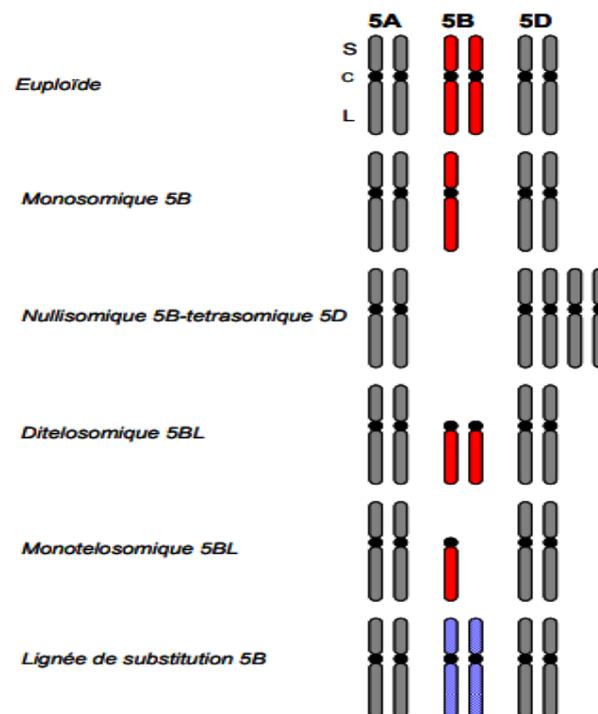


Figure 4: Représentation schématique montrant le devenir du chromosome B du groupe 5 de blé hexaploïde dans des lignées euploïdes et aneuploïdes. (SEARS, 1966)

1.3 Répartition du blé (production, rendement)

1.3.1 Production

La production des céréales occupe environ 80% de la superficie agricole utile (SAU) du pays, La superficie emblavée annuellement en céréales se situe entre 3 et 3,5 million d'ha. Les superficies annuellement récoltées représentent 63% des emblavures. Elle apparait donc comme une spéculation dominante.

Spéculation pratiquée par la majorité des exploitations (60% de l'effectif global)(**RG**A, **2001**),

Spéculation présente dans tous les étages bioclimatiques, y compris dans les zones sahariennes.

Tableau 1: **représentation de la production du blé en Algérie (1973-2004)**

	73/77	78/82	83/87	88/92	86/95	2001	2002	2003	2004
Blé dur	42,34	41,67	36,58	39,95	40,99	46,62	48,74	42,27	49,65
Blé tendre	29,98	25,26	19,74	15,86	15,99	30,11	28,22	27,26	18,08
Total des blés	72,32	66,93	56,32	51,81	56,98	76,73	76,96	69,53	67,73

Source : (**SEFCA, rapport provisoire, juin 1993**).

1.3.2 Rendement

Les premiers changements enregistrés dans les pratiques culturales se résument à l'utilisation des engrais chimiques et des produits phytosanitaires. Ses schémas techniques sont les résultats des orientations du plan triennal, ainsi que les injonctions des instances de tutelle, notamment le ministère de l'Agriculture.

En parallèle, le secteur privé a poursuivi une céréaliculture extensive et le système de production n'aura pratiquement pas évolué à l'avènement de la révolution agraire.

La modernisation de l'agriculture n'a pris une signification pour les céréales qu'à partir du premier plan quadriennal (1970-1973) et l'orientation principale pour l'intensification agricole sera confirmée par le second plan quadriennal (1974-1977). Les perspectives en matière d'intensification sont réaffirmées par la Charte nationale.

Un examen rapide de l'évolution des rendements au cours de la période considérée permet de clairement une stagnation quasi-totale. (tableau2)

Tableau 2: Evolution des rendements (U= Qx/ha).

	72/75	76/79	Taux de croissance des rendements en %
Blé dur	5,7	5,5	-3,51
Blé tendre	7,5	6	-20

Source : (SEFCA, rapport provisoire, juin 1993).

Cependant, dans la pratique, pour chaque plan, les prévisions d'investissements étatiques n'ont jamais été réalisées totalement, et seule une faible part de budgets prévus a réellement été allouée au secteur de l'agriculture. Ceci a eu des effets désastreux, notamment sur la mécanisation qui nécessite des investissements importants.

1.4 Importance de la culture des céréales

La culture des céréales est considérée comme l'une des premières grandes découvertes ayant exercé, une influence majeure sur l'avenir des sociétés humaines. Encore aujourd'hui, les céréales constituent la base de notre alimentation, en raison de la facilité des modes de production, de récolte, de stockage et de transport, de la diversité des aires géographiques de production, de leur richesse en constituants d'intérêt nutritionnel et de la diversité des modes de préparation et de consommation. La culture céréalière est un levier important sur le plan socio-économique, elle est non seulement la source majeure de l'alimentation animale (37% de la production des céréales sont destinés à nourrir les animaux d'élevage, mais également l'alimentation humaine)

En 2016/2017, 706 millions d'hectares de céréales sont cultivés dans le monde, soit 50% des terres arables, 14,4% de la surface agricole mondiale et 5,4% des terres émergées du monde, et 2,6 milliards de tonnes de céréales ont été produites.

La récolte mondiale de céréales s'élève à 2,07 milliards de tonnes (année 2003). Cela représente une moyenne brute de 345 kg par habitant et par an (pour 6 milliards d'habitants au total), moyenne qui s'établit à 155 kg pour les céréales destinées à l'alimentation humaine.

Les chiffres du marché mondial des céréales en 2016-2017 sont produits par la F.A.O¹⁴. La production s'est élevée en 2016 à 2 607,5 millions de tonnes. Les stocks disponibles en début de période s'élevaient à 664,8 millions de tonnes, la disponibilité totale est donc de 32 723 millions de tonnes. Les exportations, au cours de la campagne commerciale, allant de juillet 2016 à juin 2017, dans le cas du blé et des céréales secondaires, et de la campagne commerciale allant de janvier à décembre pour le riz, se sont élevées à 402,8 millions de tonnes. Le stock de clôture est de 720,5 millions de tonnes (soit 27 % de l'utilisation annuelle).

1.4.1 En Algérie

Les céréales et leurs dérivés constituent l'épine dorsale du système alimentaire algérien. Effectivement, les céréales constituent la base du modèle de consommation alimentaire dans ce pays, comme dans la plupart des pays méditerranéens. 54% des apports énergétiques et 62% des apports protéiques journaliers provenaient de ces produits en 2003 et le blé représentait 88% des céréales consommées (**Padilla et Oberti, 2000**) in (**Kellou, 2008**).

L'Algérie se situe ainsi au premier rang mondial pour la consommation de blé avec plus de 200 kg en 2003, l'Egypte se situant à 131 kg et la France à 98 (Tableau 3).

Tableau 3: Consommation par tête de blé dans quelques pays, 1961-2003.

	1961	1970	1980	1990	2000	2003	VAR. 1961- 2003
Algérie	110	120	182	193	190	201	82%
Tunisie	146	153	195	205	202	194	33%
Maroc	130	129	153	180	172	179	38%
Italie	162	176	173	149	150	152	-6%
Égypte	79	87	125	148	136	131	65%
France	126	97	96	92	97	98	-22%
Monde	55	57	95	70	68	67	22%

Source : FAOSTAT 2005 in (Kellou,2008).

On comprend, à travers ces chiffres, que le blé et ses dérivés basiques destinés à l'alimentation humaine (pain et semoule) constituent des produits qualifiés de stratégiques et font en conséquence l'objet d'une politique gouvernementale attentive. A travers les données disponibles actuellement, les consommateurs algériens apparaissent particulièrement diversifiés. Répartis sur une large échelle de revenus, ils sont soumis à des influences culturelles contradictoires, ils peuvent être attachés aux traditions (consommation préparée d'une manière traditionnelle) ou plus au moins tentés par les signes de modernité (restauration de masse et consommation de produits issus de l'industrie alimentaire). La résultante des comportements de ces consommateurs, c'est-à-dire le modèle de consommation algérien, change donc en fonction de l'évolution de la composition de la population et ce, par rapport au : - degré d'urbanisation ; - à l'évolution démographique (taux de croissance annuel : 2,28%) ; - au tassement des revenus et à la libéralisation des prix des produits de première nécessité. Concernant les blés et dérivés, leurs poids dans les régimes alimentaires de l'Algérien ne semblent pas diminuer rapidement, cela d'autant moins que les valeurs nutritionnelles refuges, dont les dérivés de blé sont porteuses, ont démontré qu'elles constituaient un antidote efficace face à la

diminution importante des revenus (baisse du pouvoir d'achat) (**Kellou, 2008**). Depuis la libéralisation des prix et l'augmentation relative de ces derniers pour les blés et leurs dérivés, on observe une diminution très importante du gaspillage et une certaine rationalité de la part des consommateurs qui exigent en contrepartie des produits céréaliers de qualité meilleure car ces derniers (semoule, farine, pâte) ont tendance à se substituer à d'autres aliments composants les protéines nobles (viande, poisson ...)
(**Talamali, 2004**).

Chapitre 2 : Contraintes et solutions

1. Contraintes abiotique

1-1- L'éclairement La lumière est la source d'énergie qui permet à la plante de décomposer le CO₂ atmosphérique pour en assimiler le carbone et réaliser la photosynthèse des glucides. La lumière est donc un facteur climatique essentiel et nécessaire pour la photosynthèse (**Diehl, 1975**). Néanmoins, elle peut devenir une source de stress par son intensité, éclairement trop faible ou trop élevé, conduisant à des phénomènes de photosensibilisation dangereux pour la plante (**Leclerc, 1988**). Sous les conditions de cultures des hautes plaines, c'est plutôt l'excès de l'éclairement qui est un stress, conduisant à la photo inhibition des centres réducteurs des photosystèmes (**Ykhlef, 2001**).

1-2- La température Comme toute plante, le blé dur à un optimum écologique du point de vue température. Au-delà de cet optimum, la plante souffre et elle est pénalisée d'autant plus que les valeurs prises par ce facteur écologique s'en écartent trop (**Papadakis, 1932**). La température rythme la croissance et le développement de la plante. Son action est permanente tout le long du cycle. Elle conditionne l'absorption des éléments nutritifs, l'activité photosynthétique, l'accumulation de la matière sèche et le passage d'un stade végétatif à un autre (**Van Oosterom et al. 1993, Mekhlouf et al. 2006**).

1-2-1- Les basses températures Le degré de sensibilité de la céréale au froid est très variable dans le temps et fonction des stades végétatifs. Les basses températures hivernales entravent la croissance, en début du cycle, des génotypes sensibles et sont nécessaires pour la satisfaction des besoins des variétés vernalles (**Bouzerzour et al. 1995**). Lorsqu'elles se présentent tardivement au printemps, leur avènement coïncide avec le stade méiose, elles détruisent alors les grains de pollen et les ovaires (**Abbassenne, et al. 1997**). Les blés cultivés traditionnellement dans le bassin méditerranéen sont de type semi alternatif. Leur floraison est assez tardive leur permettant d'échapper aux basses températures printanières. L'adoption de cultivars de type printemps, insensible à la photopériode et aux besoins négligeables en températures vernalles sur les hautes plaines orientales ont montré le risque des épiaisons précoces induites, chez de tels génotypes, par des températures hivernales plus douces

(**Bouzerzour et al. 2002, Mekhlouf et al. 2006**). **Paulsen et Heysen (1983)** observent des dégâts très importants sur blé tendre, au stade épiaison, dues à des températures de l'ordre de 0,3°C sous abri. La température de l'ordre de + 6°C est rapportée comme étant destructive au stade formation du grain de pollen (**Gate, 1995**). Pendant la phase de montaison, les effets des basses températures, dans la plage des – 5°C a +3°C se manifestent par des limitations de la croissance et la destruction des jeunes feuilles et des talles, dans les cas sévères. **Sutka (1994)** montre, à partir de l'analyse d'un croisement diallèle de blé tendre, que le contrôle génétique de la tolérance au froid est de nature additive. Les résultats de l'analyse de substitution chromosomique montrent qu'aux moins 10 chromosomes interviennent dans le contrôle de la tolérance au froid et que les chromosomes 5D et 5A sont les plus actifs (**Sutka 1994**). **Mekhlouf et al., (2001)** notent une grande variabilité de réponses des géotypes de blé dur vis à vis de cette contrainte.

1-2-2- Les températures élevées Les hautes températures interviennent aussi comme contrainte limitant le potentiel de production des zones semi-arides. Elles affectent les organes floraux, la formation du fruit, ainsi que le fonctionnement de l'appareil photosynthétique. Au cours de la montaison, elles entraînent la réduction du tallage-épi. La méiose et la phase de remplissage du grain sont particulièrement sensibles à cette contrainte. Les seuils de 25 à 27 °C sont rapportés comme étant très pénalisants. Le nombre de grains/épi et le poids du grain sont fortement affectés (**Cackett et Wall, 1971; Gate et al. 1996, Fellah et al. 2002**). L'avènement de cette contrainte, si elle est accompagnée par un déplacement des masses d'air chaud venant du sud, exagèrent les effets sur la plante en augmentant la transpiration, la respiration, engendrant la sénescence foliaire, qui est suivie par la sénescence de la plante entière si ce phénomène, connu localement sous le vocable de sirocco, perdure au-delà de trois jours (**Baldy, 1974**). Globalement les températures élevées réduisent la taille et le poids des organes. Leur incidence demeure plus faible sur le nombre d'organes émis. Les variétés tardives sont généralement celles qui sont les plus exposées à ce type de contrainte. Sous ces conditions limitantes, elles accusent des baisses de rendements liés à la coïncidence de la phase de remplissage avec la période d'élévation de la température (**Bouzerzour et al. 1995**). Les géotypes précoces esquivent et minimisent le plus souvent les effets de cette contrainte (**Abbassenne et al., 1997**). **Monneveux et al., (2002)** notent que les températures supérieures à 30°C, après floraison, ont des effets négatifs sur le stockage des assimilats et la qualité de la graine.

1-3- Le stress hydrique L'eau constitue le milieu interne des plantes. C'est une véritable matrice vitale du fonctionnement cellulaire. A l'exception des grains mûrs, les différents organes de la plante renferment entre 80 et 90 % d'eau d'imbibition. Cette eau est nécessaire au fonctionnement de la plante. L'eau d'imbibition qui s'évapore suite à la transpiration est renouvelée en permanence par l'eau absorbée par les racines. Lorsque l'absorption ne peut satisfaire la demande de la transpiration, alors le stress hydrique s'installe (**Levitt, 1980**). Sous stress hydrique la plante perd une partie de l'eau d'imbibition et ses processus physiologiques sont alors affectés. La transpiration dépend du rayonnement, de la température de l'air ambiant, de la canopée et des mouvements aérodynamiques de l'air (**Levitt, 1980**). La quantité d'eau transpirée est fonction aussi de l'indice foliaire et du degré d'ouverture, du diamètre et de la fréquence des stomates (**De Raissac, 1992**) Le rythme d'absorption est fonction de l'humidité relative du sol et du développement du système racinaire (**Baldy et al., 1993**). Les besoins en eau du blé atteignent des valeurs très importantes, au regard des quantités de pluies que reçoit l'étage bioclimatique semi-aride. Ces besoins sont fonction du type de variétés, et varient de 450 à 600 mm. Sous conduite pluviale et sur les hautes plaines orientales, ces besoins sont rarement satisfaits suite à la faiblesse et à l'irrégularité des pluies (**Baldy et al., 1993**). La phase critique pour l'eau débute avec le stade gonflement et se termine 20 jours après l'épiaison, date de réalisation du palier hydrique (**Oweiss et al., 1998**). Le régime des pluies méditerranéennes est très irrégulier dans l'espace et le temps. L'efficacité de ces pluies pour la céréale dépend fortement des techniques culturales appliquées, des caractéristiques hydrodynamiques des sols et du rythme de développement de la variété cultivée (**Kribaa, 2002**). La fréquence des événements pluvieux tend à décroître à partir du mois d'avril, alors que la température devient de plus en plus forte. La demande climatique s'accroît à un moment où se détermine le rendement en grain (**Mekhlouf et al., 2006**).

Selon le stade végétatif où il survient, le stress hydrique affecte différemment la plante. Au stade montaison, il provoque un arrêt de croissance des tiges. Il s'ensuit une diminution du nombre de talles fertiles dont la conséquence est une réduction du nombre de grains /m². Au stade floraison, c'est la destruction des organes floraux qui prédomine et au cours de remplissage du grain, il y a une diminution du niveau et de la durée du palier hydrique, dont la conséquence est une chute de poids moyen du grain (**Triboi et al., 1985**).

2. Contraintes Biotiques

En écologie, les facteurs biotiques représentent l'ensemble des interactions du vivant sur le vivant dans un écosystème. Opposables aux facteurs abiotiques, ils constituent une partie des facteurs écologiques de cet écosystème, parmi ces facteurs et dans le cas du règne végétal on parle de pathologie.

2.1 Rouille jaune

La rouille jaune, *puccinia strigiformes*, maladie très préjudiciable au rendement, à la faveur du climat, fréquence, son extension géographique et son intensité ne cessent d'augmenter. (Figure 5).



Figure 5 : Image représentative de la rouille jaune chez le blé (*triticum*). (Bousricir, 2019).

2.1.1 Epidémiologie de la rouille jaune

- **Cibles** : blés (tendre et dur), triticale, orge
- **Période de développement** : sortie hiver, voire automne
- **Type d'épidémie** : explosif et précoce
- **Température optimale (germination spores)** : 10 à 15 °C, mais les souches actuelles tolèrent des températures plus élevées.
- **Vitesse du cycle** : 9 jours
- **Taux d'humidité optimal** : 100%
- **Capacité de sporulation** : très élevée
- **Dissémination** : par le vent
- **Plantes hôtes en hiver** : repousses de céréales ou cultures à semis précoce

2.1.2 Symptômes

Les symptômes de la rouille jaune peuvent être observés sur les feuilles, les gaines mais aussi les épis. Ils se caractérisent par la présence de pustules allongées (urédosores), de couleur jaune-orangée, organisées de façon linéaire entre les nervures de la face supérieure des feuilles.

L'épidémie débute souvent sur des plantes individuelles, généralement en automne (contamination primaire). Les symptômes apparaissent lentement pendant l'hiver et ne sont souvent détectés qu'au début du printemps, lorsque de petites zones ou foyers de plantes infectées se détachent visuellement dans les champs.

Aux premières phases de la maladie, les pustules jaune-orangé de la rouille jaune sont difficiles à distinguer de celles de la rouille brune. Rapidement, l'évolution de leur organisation en lignes jaunissur les jeunes feuilles permet un diagnostic sans équivoque (figure 6). A un stade plus avancé de la maladie, les stries finissent par se rejoindre pour finalement occuper la largeur complète du limbe. Les feuilles finissent par se fendiller et s'enrouler aux environs des mois de mai/juin, lorsque le climat est chaud et sec.

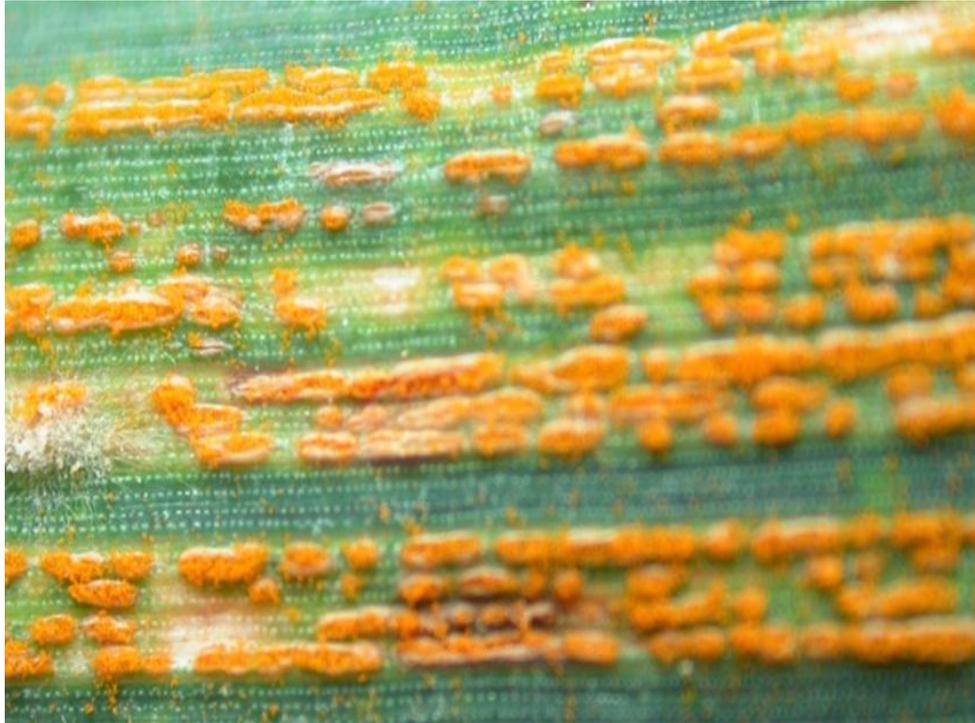


Figure 6: représentation en lignes de pustule jaune chez le blé(*Triticum*). (Pluquet, 2019) .

2.1.3 Evolution de la rouille jaune

- Sensibilité en progression
- Contournement de résistances variétales
- Nouvelles races plus agressives et plus tolérantes aux UV et aux températures supérieures à 15°C (Warrior)

2.1.4 Nuisibilité

La nuisibilité de la rouille jaune est considérable. Dans les parcelles touchées, elle peut atteindre 70%. Sa fréquence est plus faible que d'autres maladies foliaires, mais ses conséquences sont extrêmement dommageables dans les parcelles touchées.

2.2 La rouille brune

Puccinia triticina est spécifique au blé. D'autres *Puccinia* spp. et pathotypes peuvent affecter l'orge, le seigle et le triticale, mais ils ne provoquent pas d'infections croisées.

C'est une maladie foliaire causée par un parasite obligatoire. Les feuilles sont les principaux organes attaqués, les gaines sont parfois atteintes et en cas de très fortes infestations les épis peuvent être touchés. (figure7)



Figure 7 : Image représentative de la rouille chez le blé (triticum). (BASF SE.2019).

2.2.1 Symptômes

La maladie apparaît généralement tardivement sur les feuilles supérieures entre le stade dernier feuille pointant et l'épiaison. Les attaques les plus précoces ont pu être observées dès le stade 2 nœuds... Des rares pustules peuvent être observées dès le stade 3 feuilles en particulier si l'hiver est très doux et les semis précoces. Cette infestation constituera l'inoculum initial.

- **Parcelle** : La répartition est homogène dans la parcelle (dissémination par le vent).
- **Feuille** : Pustules allant du brun au brun orangé, dispersées sur la feuille, essentiellement sur la face supérieure. Les quelques pustules du début d'attaque peuvent générer des centaines de pustules, si le climat est chaud et humide.
- **Épis** : Les attaques graves peuvent atteindre l'épi (barbes, glumes) en fin de cycle (figure 8).



Figure 8 : Représentation des pustules dispersées de façon homogène chez le blé (triticum). (BASF SE2019).

Astuce : Les pustules contiennent une poudre brun orangé (spores) qui reste sur les doigts après contact.

2.3 La Septoriose du blé

Mycosphaerella graminicola (*Septoria tritici*), est une maladie qui touche essentiellement le blé, et occasionnellement le seigle, le triticale et certaines espèces de graminées (figure9).



Figure 9 : Image représentant la septoriose chez le blé (*triticum*). (Arvalis, 2020)

2.3.1 Symptômes

La plupart des années, les symptômes de la Septoriose peuvent être observés dès les premières phases de croissance.

Dans les jeunes parcelles de blé à semis automnal, des plaques aqueuses, qui prennent rapidement une apparence brune et nécrotique, sont déjà observables début décembre, ainsi que tout au long de l'hiver sur les étages foliaires inférieurs.

Celles-ci contiennent des pycnides noires apparentés, la principale caractéristique de *M. graminicola*.

La présence de pycnides est particulièrement fréquente sur les feuilles mortes hivernantes du blé d'hiver. Sur le plant mature, les lésions sont de couleur brune, et parfois limitées par des veines qui leur donnent une apparence rectangulaire. Les pycnides noires deviennent davantage visibles dans les lésions lorsque les symptômes se manifestent. Les

lésions peuvent confluer, et créer ainsi de larges zones de tissu nécrotique de couleur brune (figure10).



Figure 10: Representation de pycnide noir sur le feuille du ble (triticum).(Arvalis-institut du végétal ,2018) .

2.3.2 Evolution

A l'automne, le champignon, présent sur les résidus de paille, va contaminer les jeunes pousses de blé et débiter son développement.

En hiver, sa progression est ralentie par les conditions climatiques défavorables.

Au printemps, les températures plus clémentes vont réactiver l'épidémie. Les symptômes apparaissent et les pycnides vont assurer la propagation de la maladie par effet « splashing » (projection des spores par les gouttes de pluie) des étages foliaires inférieurs vers les étages supérieurs, mais aussi aux plantes voisines.

2.4 Helminthosporiose (tan spot)

La tache auréolée affecte le blé. C'est une maladie répandue en Algérie. Elle est plus fréquente dans les régions dont la pluviométrie est importante. Elle est causée par le champignon *Drechslera tritici repentis*. (Figure 11).

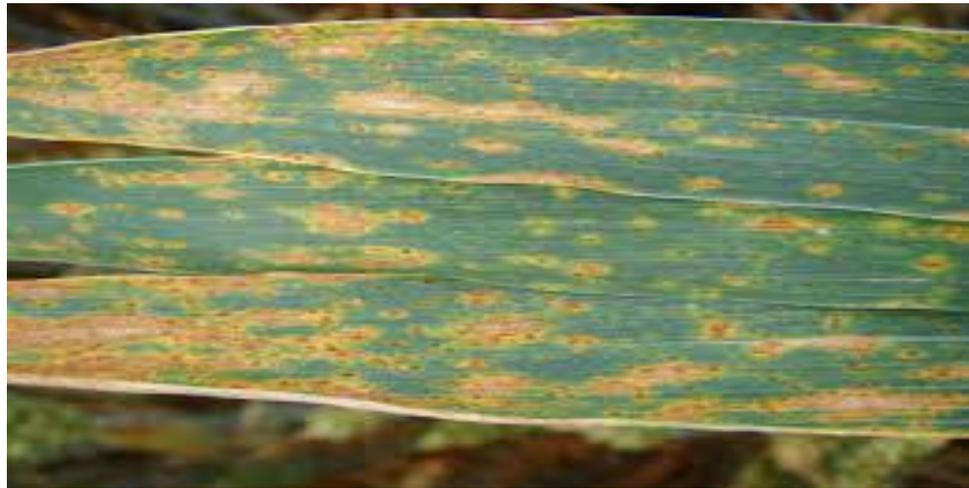


Figure11:Image représentant l'helminthosporiose (tan spot) chez le blé (triticum).(Acta,2016).

2.4.1 Symptômes

Cette maladie peut s'observer sur les feuilles (figure 12). Elle apparaît le plus souvent en fin de cycle de la culture, Apparaissent sur les 2 faces du limbe des feuilles. Les taches les plus typiques sont petites, brunes, avec au centre un point noir ou un anneau brun foncé, correspondant à la zone de contamination du champignon. Les grains de blé sont plus petits avec un aspect ridé. Ils peuvent être colorés en rouge, avec un noircissement de la partie germinative La maladie débute sur les semis d'orge âgés d'un mois. Il ne se forme tout d'abord que des rayures pâles sur les feuilles puis il apparaît des bandes régulières partant du bas de la gaine jusqu'au sommet du limbe. Ces bandes sont d'abord vert jaunâtre puis fortement décolorées et enfin brunes. Les feuilles atteintes se flétrissent, retombent le long du chaume et, en se desséchant, se fragmentent en lanière de largeur limitée (internervaire). L'épi est fréquemment complètement arrêté dans sa croissance. Il avorte alors dans les dernières gaines et seule l'extrémité des barbes apparaît au sommet du chaume. Les épis des tiges attaquées restent érigés ce qui permet d'estimer les dommages surtout en ce qui concerne les variétés dont l'épi se recourbe.



Figure 12: Progression de l'helminthosporiose du bas vers le haut chez le blé (triticume). (Acta,2016).

2.4.2 Evolution

La tache auréolée hiverne sur le chaume de blé, la paille à la surface du sol ou partiellement enfouie, et les balles de paille de blé. Les spores, qui sont produites au printemps, sont transportées par le vent jusqu'aux plants en croissance. L'infection demande au moins six heures de temps pluvieux, et les températures oscillant de 15 à 28°C avec des périodes de rosée favorisent l'infection. Les spores produites sur les feuilles atteintes ont tendance à se propager au cours de la saison de croissance pendant les périodes pluvieuses. La tache auréolée a accentué sa présence dans les Prairies avec la hausse du travail réduit du sol, et le semis direct, en particulier dans les monocultures.

2.4.3 Les conditions favorables

À son développement sont une température entre 18 et 28°C; humidité entre 60 et 100%; un temps pluvieux et couvert qui persiste plus de 48 heures permet l'infection des plantes.

3 Amélioration végétal chez le blé

L'amélioration des plantes, en interaction avec l'agronomie, a déjà beaucoup apporté à la satisfaction des besoins alimentaires de l'homme, d'un point de vue génétique, le but de l'amélioration des plantes est de réunir dans un même ensemble de plantes, une variété, le maximum de gènes favorable pour les différents caractères à améliorer.

L'amélioration du blé a principalement les objectifs suivants :

- Développer des variétés de bonne qualité technologique.
- Identification de sources de résistance et /ou de tolérance.
- Développer des variétés productives et adaptées aux conditions climatiques.
- Valoriser au mieux les produits des céréales (grain, paille).
- Développer des variétés résistantes aux maladies et insectes.
- Préserver le germoplasme local.

3.1.1 Création variétale

La biodiversité se conserve mais se crée aussi. La création variétale peut être induite par l'hybridation ou le simple mélange entre deux ou plusieurs variétés choisies. La création variétale peut aussi être fortuite, c'est le cas des hybridations naturelles, des mutations naturelles... Les plantes ainsi repérées par l'homme peuvent être multipliées et sélectionnées pour donner naissance à de nouvelles variétés.

C'est l'ensemble des processus visant à rassembler des caractères d'intérêt au sein d'une nouvelle variété de plante cultivée. Ces caractères sont généralement recherchés chez des variétés déjà existantes ou chez des plantes sauvages de la même espèce ou d'espèces proches.

«Les espèces présentent plusieurs variétés cultivées ou cultivars».

Cultivar ou « variété cultivée » : population artificielle au sein d'une espèce, caractérisée par:

- Une base génétique étroite (voire réduite à un génotype);
- Des caractères agronomiques homogènes bien définis;
- Sa reproductibilité selon un schéma de sélection fixé et déposé.

3.1.2 Objectifs de la sélection

Les objectifs de la sélection sont nombreux. Généralement, le premier critère évoqué est la productivité. Celle-ci dépend de nombreux facteurs. Elle peut être le résultat de la réduction des facteurs limitant du rendement, mais le potentiel de productivité peut également être accru par une amélioration de la physiologie des plantes : augmentation de l'activité photosynthétique, meilleure croissance, amélioration de la migration, de la répartition des assimilats et/ou de la mobilisation des réserves de la plante (grains, racines...).

Certaines plantes comme le blé nécessitent une adaptation variétale importante aux conditions de sol et de climat. Pour les agriculteurs, l'un des facteurs les plus importants est la résistance aux maladies et aux parasites.

Ceci intervient non seulement dans le rendement, mais aussi dans le revenu de l'agriculteur. En effet, il peut exister d'autres solutions comme l'utilisation de produits de traitement qui, le cas échéant, peuvent augmenter les charges opérationnelles sur la culture.

La sélection prend depuis longtemps en compte le besoin qualitatif et les contraintes industrielles des transformateurs. La qualité intrinsèque de la récolte, son état sanitaire, l'homogénéité des lots, l'aptitude des lots à la conservation, les qualités technologiques pour la transformation et les utilisations (boulangerie, biscuiterie, trituration...) sont des facteurs de sélection importants, diversifiés et codifiés dans des cahiers des charges.

Les attentes vis-à-vis de l'agriculture augmentent et se diversifient : meilleur respect de l'environnement, lutte contre le changement climatique, qualité nutritionnelle améliorée, production de molécules... La recherche prend déjà en compte ces nouveaux critères afin de permettre par exemple la production d'énergie via la biomasse, de substances à usage non alimentaire comme des huiles particulières pour l'industrie, voire de vaccins ou de médicaments.

3.1.3 Les différents types de sélection

a) Sélection massale ou visuelle (jusqu'à la fin du 19ème siècle)

C'est la sélection dans la masse d'une population végétale selon des critères phénotypiques propres à chaque agriculteur qui cultive cette population. Cette technique

ancestrale de sélection permet d'améliorer la valeur moyenne de l'ensemble des individus de la population.

Elle consiste à retenir, dans une population, certaines plantes avec des caractères intéressants dont les graines seront utilisées comme semences l'année suivante.

Selon Bouharmont (1994), cette méthode a longtemps été appliquée avec succès chez beaucoup d'espèces allogames. Elle consiste à récolter la semence destinée à la génération suivante sur les plantes qui correspondent aux souhaits de l'agriculteur. Pour les caractères fortement héréditaires, la sélection est efficace, elle se traduit par une augmentation progressive de la fréquence des allèles favorables dans les populations ; elle est plus lente que chez les autogames, surtout lorsque plusieurs gènes sont impliqués. L'observation du phénotype suffit pour la couleur du fruit, la morphologie de l'inflorescence ou la précocité.

La sélection massale pour le rendement est plus difficile : un test de descendance portant sur quelques dizaines de plantes est nécessaire pour contrôler la valeur des individus repérés au champ.

b) Sélection récurrente

Dans son principe, la sélection récurrente se rapproche de la sélection massale dans la mesure où l'objectif est d'améliorer la valeur moyenne d'une population en sélectionnant de génération en génération les meilleurs individus de cette population. La différence avec la sélection massale réside dans le fait que les croisements sont cette fois-ci contrôlés, et que la sélection récurrente conduit à la sélection de lignées ou d'hybrides. Cette méthode permet de limiter la perte de variabilité génétique au cours du processus de sélection : c'est la méthode de choix pour travailler sur des caractères dont le déterminisme génétique est complexe.

c) Sélection moderne ou généalogique (à partir du 20ème siècle)

C'est un procédé qui consiste à croiser volontairement des plantes qui disposent de caractères que l'on désire perpétuer et/ou associer.

La découverte de la reproduction sexuée des végétaux (1676, Millington-Grew) puis la redécouverte des lois de Mendel (1865) par De Vries (1903) posent les bases scientifiques de la sélection moderne

Cette méthode est également appelée sélection individuelle ou sélection par la méthode de lignées pures ou pedigree. Elle est utilisée surtout pour l'amélioration des plantes autogames (**Zahour, 1992**).

Cette méthode consiste à choisir des individus dans une population hétérogène et procéder ensuite à l'étude des descendance en autofécondation en suivant la filiation généalogique de chaque individu (plante ou épis par ligne), d'où le nom de sélection généalogique (**Demarly et Sibi, 1996**), à chaque génération, on choisit des plantes intéressantes et on attend la génération suivante pour voir si le caractère retenu s'extériorise à nouveau et de façon homogène (**Vespa, 1984**).

En partant d'une F2 très hétérogène, des autofécondations successives et des éliminations importantes aboutissent à la création d'une lignée très fortement homozygote pour ses caractères ; Si elle présente des caractères intéressants, cette lignée sera déposée à l'inscription et deviendra une variété commerciale (**Maciejewski, 1991**).

- La première étape consiste à choisir un nombre important de plantes ou d'épis au sein d'une population hétérogène.

- La deuxième étape consiste à semer les descendance des plantes choisies (plante ou épi par ligne) pour une sélection visuelle. Souvent, des épidémies de maladies sont artificiellement créées pour éliminer les descendance sensibles. Les lignées défectueuses sont alors écartées et seules les lignées supérieures sont gardées.

Après élimination des types non désirables, chaque lignée homogène est récoltée et sa descendance est semée séparément durant une ou plusieurs années pour des observations supplémentaires dans différents environnements.

- La troisième étape commence lorsque le sélectionneur ne peut plus choisir entre les lignées sur la seule base d'une sélection visuelle. Les lignées restantes (généralement très peu) sont alors comparées entre elles et avec une ou plusieurs variétés déjà établies. Les comparaisons se font généralement pour le rendement et pour d'autres caractères tels que la résistance aux maladies, la précocité, la hauteur (**Zahour, 1992**).

La sélection généalogique est une méthode efficace pour les caractères peu influencés par le milieu (**Gallais et al. ,1992**). Son grand intérêt est de fournir à la grande culture des lignées pures dont les avantages sont considérables : végétation uniforme, tiges de même hauteur, grains de même taille et rendement élevé (**Khaldoun et al. ,2006**).

- La méthode Bulk

Le sélectionneur laisse la population de départ F2 s'autoféconder pendant plusieurs générations ; Au cours des autofécondations successives, les différents caractères intéressants à l'état récessif peuvent s'extérioriser en devenant homozygotes.

Le choix des plantes intéressantes commence au plus tôt en F4 (alors qu'en sélection généalogique, elle commence en F2) (**Maciejewski ,1991**).

Jusqu'à ce stade, les premières générations F2. F3 etc. Sont récoltées en vrac et ressemées sans aucune identification de pedigree : aucun choix, sauf des éliminations par compétition ou par sélection naturelle (**Demarly et Sibi, 1996**).

A partir de la F5, la technique de travail de la méthode Bulk s'identifie à celle de la sélection généalogique (**Maciejewski ,1991**).

L'intérêt de la stratégie est d'avoir allégé considérablement les premières générations et de reporter les choix sur les structures F4 déjà fortement homozygotes (**Demarly et Sibi, 1996**).

- Back-Cross

Le rétrocroisement, ou back-cross, est utilisé pour introduire un caractère intéressant, comme la résistance à une maladie par exemple, dans une lignée de bonne valeur agronomique.

Cette lignée est croisée avec une autre lignée : une plante sauvage apparentée ou une plante appartenant à une espèce proche qui possède le caractère d'intérêt. Après avoir vérifié que l'hybride possède ce caractère, on procède à une série de croisements avec la lignée d'intérêt agronomique (rétrocroisements), en sélectionnant à chaque étape les plantes qui portent le caractère d'intérêt.

Les rétrocroisements sont répétés pendant 6 à 8 générations, ce qui permet d'obtenir une lignée extrêmement proche de la lignée initiale mais qui possède en plus le caractère que l'on voulait introduire.

Les descendants issus du premier croisement possèdent 50% du patrimoine génétique de la lignée élite, et 50% du patrimoine du donneur. Lors des backcross suivants, la proportion du génotype élite augmente, les individus obtenus au deuxième backcross sont 75% élite et 25% donneur.

Au bout du septième backcross, la part de la lignée élite est de 96,88%, on estime alors que la lignée obtenue est suffisamment proche de la lignée élite. On tend vers l'obtention d'une lignée isogénique, en ne différant de la lignée élite que par un seul gène.

- La sélection par filiation unipare (SSD)

Cette méthode, utilisée pour la sélection des plantes à cycle court, s'applique peu chez les céréales. Elle convient pour les espèces qui donnent facilement plusieurs générations par an et peu de graines par gousse, les potagères par exemple (**Maciejewski, 1991**).

Au lieu de décider quelle plante F2 sera retenue, on récolte systématiquement une seule graine ou un seul épi par plante F2. Lorsque les plantes ont bien progressé vers un taux d'homozygotie satisfaisant, on poursuit par la méthode pedigree (généalogique) qui autorise alors un choix bien plus pertinent (**Anonyme, 2006**) I. Les autofécondations sans sélection sont répétées sur 4 à 5 générations au total ;

Le sélectionneur garde ainsi un exemplaire, au moins, de chaque plante de la population de départ (**Maciejewski, 1991**).

Le but est d'obtenir des lignées à partir d'un maximum de plantes F2. Ceci permet de réduire les risques de perte des génotypes supérieurs par sélection (artificielle ou naturelle) surtout pour les caractères à faibles héritabilités tels que le rendement (**Zahour, 1992**).

Le désavantage principal de la sélection SSD, est la part importante du hasard qui risque de conserver beaucoup de matériel inintéressant. Théoriquement cette méthode est celle qui garde cependant toute la variabilité génétique et peut servir de témoin de l'étendue de celle-ci (**Boubekeur, 2005**).

- La mutagenèse

D'après (**Beaudoin et al. (2002)**), l'organisme a une tendance naturelle à passer d'un état héréditaire à une autre, le processus est appelé mutation. Elle est définie également d'après (**Donini et Sinino, 1998**) comme étant un changement de la structure soudain du caractère hérité et qui serait par la suite transmis à la descendance. Ces changements peuvent se produire à trois niveaux :

-La mutation chromosomique se traduit par un changement de la structure du chromosome, des segments de chromosome, ou même des groupes de chromosomes. Elle se manifeste par addition ou délétion d'un seul chromosome ou dédoublement du chromosome.

- La mutation spontanée peut se produire sans cause apparente, des analyses ont révélé que les facteurs internes et externes de la plante pourraient être responsables de ces mutations.

-La mutation génique elle affecte généralement un seul gène en agissant sur la structure des molécules d'ADN constitutif de ce gène.

Les mutations induites ou mutation artificielles sont provoqués par :

Des agents mutagènes physiques tels que les rayons, des isotopes radioactifs surtout ceux du Cobalt et du Césium, les rayons Gamma et les Neutrons.

Des agents chimiques le plus souvent le méthyle-sulfonate d'éthyle (MSE) et sulfate diéthyle (SDE), Ethylèneimine (IE), Nitrosouréthane d'éthyle (NUE), Ethylnitroso urée (ENH) méthyle nitroso urée (HNM) (Mohan *et al.*, 1998 ; Beaudoin *et al.*, 2002).

4 Biotechnologies et solutions proposées (amélioration végétal du blé)

Au sens large, les biotechnologies peuvent être définies comme un ensemble de techniques et de connaissances permettant d'exploiter les propriétés du vivant à des fins d'application (**Gros-claude, 1998**).

Si la réalisation d'essais en plein champ et l'expertise humaine restent la base du métier de sélectionneur, les méthodes classiques de sélection sont désormais complétées par les biotechnologies qui permettent de gagner un temps précieux.

Par exemple, avec les biotechnologies, il est désormais possible de cartographier le génome du blé ce qui lui permet de trier le matériel génétique et d'identifier le gène qui va conférer la résistance. Ce gène de résistance sera alors introduit dans une variété par croisements successifs et suivi grâce à un marqueur moléculaire pour vérifier qu'il est toujours bien présent à la sortie. Ainsi, les délais pour obtenir de nouvelles variétés sont beaucoup plus courts.

Chapitre 3 : matériel et méthode

Dans le cadre d'un rapport de stage à l'unité de recherche biotechnologie à l'institut des recherches agronomiques –Rabat, Maroc, des recherches sur les gènes de résistance aux maladies fongiques notamment (rouille brune) grâce à des techniques de marquage moléculaire qui furent réalisés par le Docteur Sripada UDUPA ainsi que Mme Laila DAHBI. Le protocole se fait comme suit :

1 Préparation d'un gel d'agarose à 1%

Pour préparer 300 mL de gel (1% de 300 mL = 3g de poudre d'agarose) :

- 1) Incorporer 3g de poudre d'agarose dans un Erlenmeyer.
- 2) On a du TBE dilué 5x, on veut du TBE dilué 0,5x: 30 mL de TBE 5x complété à l'eau distillée jusqu'à 300 ml. Verser la solution obtenue dans l'Erlenmeyer.
- 3) Placer l'Erlenmeyer dans le micro-onde après avoir marqué la limite du liquide.
- 4) Retirer l'Erlenmeyer une fois que le liquide est limpide.
- 5) Refroidir : Placer l'Erlenmeyer dans une bassine d'eau froide sur un agitateur magnétique (mettre un barreau magnétique dans l'Erlenmeyer) et maintenir ainsi jusqu'à ce que l'Erlenmeyer soit tiède.
- 6) Couler le gel doucement avec un débit régulier pour ne pas faire de bulles.
- 7) Laisser le gel solidifier (30 min environ).

Rem : Pour régler le peigne d'électrophorèse prendre un papier Wattman plié deux fois et le placer sur le bac. Poser le peigne par-dessus et ajuster sa hauteur en fonction de la largeur du papier en utilisant les vis du peigne.

Préparation d'une solution de TBE 5x

Tableau 4: Représentation d'une préparation de solution TBE.

Acide Borique	28 g
Tris-Base	54 g
EDTA (0,5 M)	20 mL

Ajuster à l'eau distillée jusqu'à 600ml puis ajuster le pH à 8 avec de l'acide borique.

Ajuster le tout à l'eau distillée jusqu'à 1L.

2 Extraction d'ADN

Prélèvement d'échantillons sur des jeunes feuilles de blé placées chacune dans un tube Ependorff.

Placer les tubes, couvercle ouvert dans une étuve à 60°C pendant 24h (ou dans un lyophilisateur).

2.1 Broyage :

- 1) Placer une bille d'acier 5 mm dans chaque tube après avoir rincé les billes à l'alcool.
- 2) Placer les tubes dans le broyeur (Tissue Lyser Qiagen) - quatre tubes de chaque cote- et régler l'appareil pour 10 min à 30t/s.

2.2 Solution d'extraction :

Solution à préparer sous la hotte (le BME est irritant et sent fort) : les 14 mL et 28 μ L dans un bécher à couvrir avec de l'aluminium.

-Placer le bécher dans un bain marie à 65°C juste pour préchauffer.

-Sortir les échantillons broyés du broyeur et retirer la bille de chaque.

-Prélever 700 μ L du bécher et les mettre dans chaque échantillon. Fermer, agiter.

-Ajouter 700 μ L à nouveau.

-Fermer les tubes et les placer sur une plaque dans le bain marie.

-Pendant une heure sortir la plaque toutes les 15 min pour agiter.

-Ajouter 500 ML de phénol chloroforme Isoamyl alcool (24 : 1) dans chaque tube et agiter doucement pendant 15 min.

-Centrifuger pendant 15 min à 30000 tours/min à la température ambiante.

- Mettre 666 μ L d'isopropanol dans 8 nouveaux tubes Ependorf 2 mL. Mettre les tubes au congélateur.

-Sortir les tubes de la centrifugeuse et les placer sur un support.

-Placer en face de chacun un tube sorti du congélateur et les marquer des mêmes noms.

-Prélever 1000 μ L de surnageant sans chaque tube sans toucher le culot et les ajouter aux tubes d'isopropanol froid

-Placer les tubes mélange isopropanol/surnageant dans le congélateur pendant 1h.

-Jeter les tubes avec culots seuls.

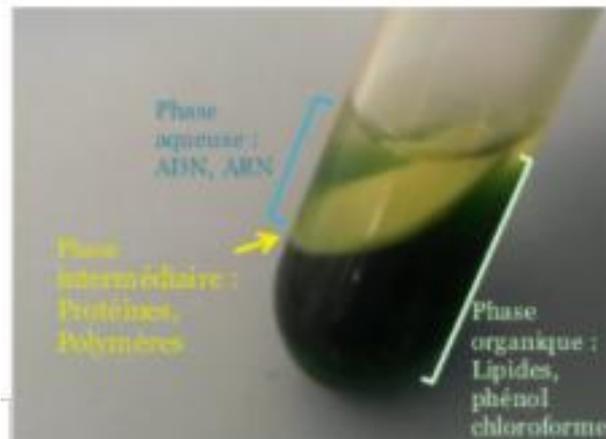


Figure 13: Différentiation des phases lors de l'extraction d'ADN



-Mettre les tubes à centrifuger 10 min 13000 tours à 4°C (refroidir la centrifugeuse à l'avance)

-Enlever le surnageant sans secouer. La pelote d'ADN est une petite plaquette blanche au fond du tube.

Figure 14: Image correspondant à une centrifugeuse.

-Rincer avec 1mL d'éthanol 70% pendant 5 min.

-Centrifuger pendant 5 min(13000 tours).(Ne garder que la pelote dans le tube)

-verser doucement le liquide dans un bécher poubelle et s'aider de papier absorbant pour les dernières gouttes.

-Tapoter le tube contre la table pour faire retomber la pelote au fond du tube quand elle glisse.

-Placer les tubes ouverts sous ventilation stérile pour sécher pendant 5 min. Une fois séchées les pelotes sont invisibles.

-Re-suspendre l'ADN dans 100 μ L d'eau ultra pure.

- Mettre les tubes au réfrigérateur pour la nuit.

3 Rôles des différents produits utilisés dans ce protocole

Le CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide) est un détergent qui rompt les membranes des cellules de la plante.

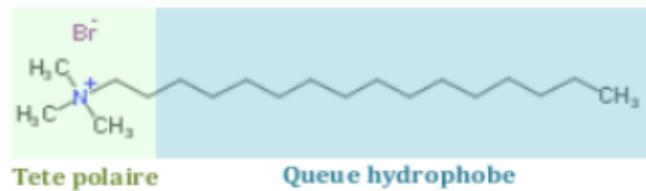


Figure 15: Image représentative de la structure CATB.

Il s'agit d'une molécule amphiphile. On retrouve cette même propriété chez les lipides qui composent la bicouche lipidique des membranes biologiques. D'après le modèle de la mosaïque fluide des membranes biologiques les protéines membranaires de la bicouche lipidique y sont enfermées par interactions hydrophobes avec les queues lipidiques.

Les détergents biologiques tels que le CTAB solubilisent les protéines membranaires et détruisent la bicouche lipidique en formant des micelles lipide-CTAB (les têtes hydrophiles des lipides et du CTAB interagissent avec les liaisons hydrogène d'H₂O et les queues hydrophobes forment des agrégats) ainsi que des complexes CTAB-protéines (les parties hydrophobes des protéines et du CTAB forment des liaisons hydrophobes ce qui protège et solubilise les protéines).

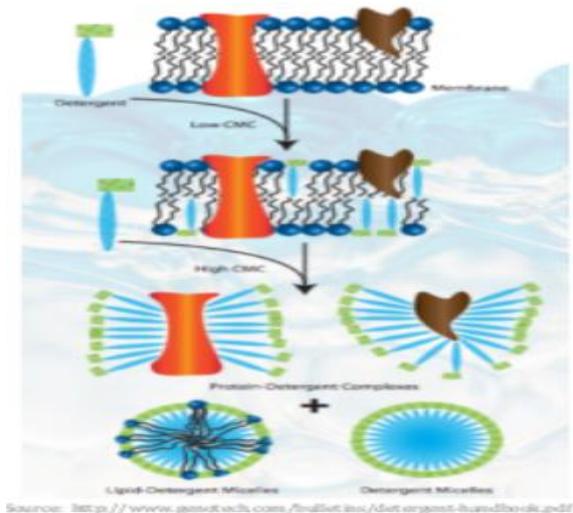


Figure 16 : Représentation de la solubilisation des Protéines membranaires par CTAB.

Le B-Mercaptoethanol (BME) est un agent réducteur qui dénature les protéines notamment en réduisant leurs ponts disulfures ce qui détruit leurs structures secondaires et tertiaires.

Dans une protéine deux groupements thiols de l'acide amine soufre cystéine peuvent s'oxyder pour former une liaison covalente cys-sscys : c'est ce que l'on appelle un pont disulfure.

Le BME a aussi pour rôle d'éliminer les tanins ainsi que les polyphénols présents dans les feuilles.

Dans le mélange phénol chloroforme isoamyl alcool le phénol et le chloroforme forment une bonne combinaison pour dénaturer les protéines. L'isoamyl alcool empêche la formation de mousse lors du processus. Le phénol ayant une densité supérieure à celle de l'eau (1.07 g/cm³ contre 1.00 g/cm³) il forme une phase inférieure (phase organique). Le chloroforme facilite la formation de cette phase car il est miscible avec le phénol et qu'il a une densité plus grande : 1.47 g/cm³.

L'eau étant plus polaire que le phénol, l'ADN, qui est chargé négativement par ses groupements phosphates, est soluble dans la phase supérieure (phase aqueuse).

Les acides aminés hydrophobes des protéines ainsi que les polymères hydrophobes interagissent avec le phénol : ils précipitent dans l'interphase. Cette interaction hydrophobe avec le phénol cause aux lipides de précipiter dans la phase organique.

L'isopropanol permet de faire précipiter l'ADN pour former une pelote d'ADN après centrifugation. En effet le groupement hydroxyle de cet alcool forme des liaisons hydrogène avec l'eau et est soluble dans l'eau, or l'ADN n'est pas soluble dans l'isopropanol. Les molécules d'eau et d'isopropanol forment un réseau forçant ainsi l'ADN à précipiter.

4 Quantification des échantillons

Sortir les tubes du réfrigérateur et les passer à la centrifugeuse pendant 5 min 13000 tours à 4°C. Transférer 100 µL de chaque tube vers la ligne 7 de l'ADN stock Algeria de Chafika.

Tableau 5: tableau des marqueurs par rapport aux variétés.

Ligne7	BM	BM	FA	FA	GGR	GGR	HD	HD
(Marqueur)	A	B	C	D	E	F	G	H

De l'ADN stock ligne 7 prélevé 3 µl y ajouter 3 µl de Bbm et 4 µL d'eau ultra pure.

4.1 Préparer la migration :

-Verser du TBE dans la cuve d'électrophorèse des deux côtés du gel jusqu'au max fill après avoir enlevé les peignes. Du mélange prélever 8 µl de chaque échantillon et placer dans les puits.

-Mettre 5 µL de marqueur lambda dans le premier puits.

-Passer de 60 V a 80-100 V pendant ~1h.

4.2 Révélation du gel :

-Retirer le gel délicatement et le placer dans un bac plein de BET Mettre le bac sur un agitateur basculant 2D pendant 20 min.

-Remplir le bac d'eau et le placer sur l'agitateur pour un rinçage pendant 10 min.

-Placer le gel après l'avoir séché au papier absorbant dans la machine Bio Rad Gel Doc XR+.

5 Résultats de la quantification

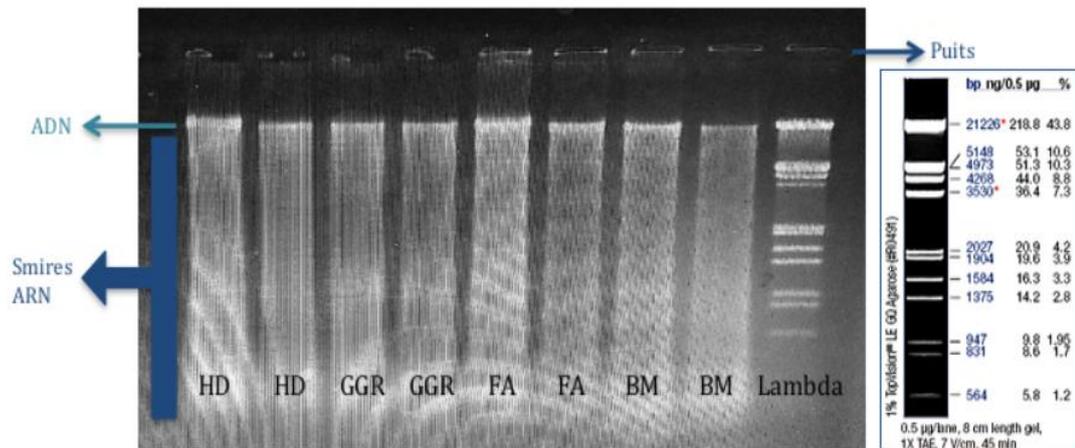


Figure 17: Résultat de la quantification.

5.1 Concentration en ADN

Pour estimer la concentration d'une bande d'ADN en interprétant le gel on compare l'épaisseur de la bande à celle de la bande du marqueur au niveau de laquelle elle est et dont on connaît la concentration.

Pour effectuer une PCR on utilise un volume $V_f=100$ UL et $C_f= 10^{-5}$ -80 ng/ UL Il y a trop d'approximations si on tente d'estimer par le calcul notamment car l'ADN n'est pas entièrement concentré au niveau de la bande visible.

Il est possible de quantifier l'ADN en utilisant la spectrophotométrie, le nano drop ... mais l'ADN n'étant pas pur (ca prendrait trop de temps et ça serait trop couteux de le purifier) lors de la spectro l'ADN n'est pas le seul à absorber les ondes lumineuses.

5.2 Qualité de l'ADN

Un bon échantillon d'ADN est long (+20KB) car lorsque l'ADN est dégradé il est découpé en petits morceaux. Les 8 bandes d'ADN ici sont à environ 21 KB l'ADN est donc de bonne qualité.

6 PCR

Pour la PCR on a choisi de faire les dilutions suivantes (approximation l'œil sans calcul) que l'on a placé dans la 6ème ligne de l'ADN stock Algérie.

Tableau 6 : représentation les taux de dilution.

Ligne 7	A	B	C	D	E	F	G	H
Noms	BM	BM	FA	FA	GGR	GGR	HD	HD
ADN (µL)	20	10	10	5	10	10	10	5
Eau ultra pure (µL)	80	90	90	95	90	90	90	95

Dans cette PCR on a mit un échantillon de chaque BM FA GGR et HD; 2 échantillons témoins Annuelo et Stylet pour vérifier que les extractions de Chafika sont bonnes; 10 aléatoires de la F1 (pour comprendre pourquoi la PCR précédente n'avait pas marche); 2 échantillons test qualité de Blé tendre => Total de 16+2 (marge) échantillon.

Tableau 7: composant des échantillons.

	1 échantillons	16+2 échantillons
Water	4,375 µL	78,75 µL
Buffer 5x	2 µL	36 µL
MgCl ₂	0,6 µL	10,8 µL
dNTP	1 µL	18 µL
Primers	1 µL	18 µL
Tag	0,025 µL	0,45 µL
DNA	1 µL	1 µL

L'amorce utilisée est celle du gène de résistance LR 34 notamment résistant à la rouille brune.

Les 10 échantillons aléatoires:

Tableau 8: emplacement des échantillons sur les barrettes.

Barrette 1	1 : 1	1 : 2	1 : 3	1 : 4	1 : 5	1 : 6	1 : 7	1 : 8
Barrette 2	2 : 1	2 : 2	Stylet	Annuello	BM	FA	GGR	HD

Préparer le mix PCR pour 18 après avoir fait un spin down de 10 secs aux différents composants. Ne sortir la Tag pour l'ajouter au mix qu'à la dernière minute et essayer de la maintenir la plus froide possible.

Pour chaque échantillon d'1 µL d'ADN déposé dans un tube de barrette PCR, prélever 9 µl du mix et l'y ajouter. Effectuer un Spin down à la centrifugeuse (10 sec) Placer les barrettes dans la machine PCR pour un cycle de 3h :

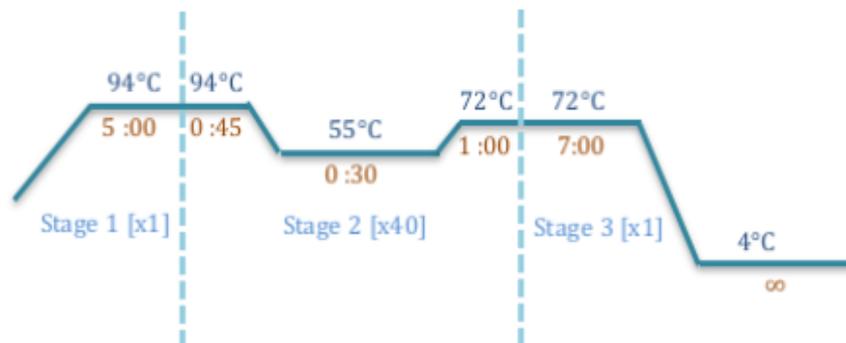


Figure 18: Représentation des différentes phases du cycle de PCR.

Chapitre 4 : résultat et discussion

1. Résultats

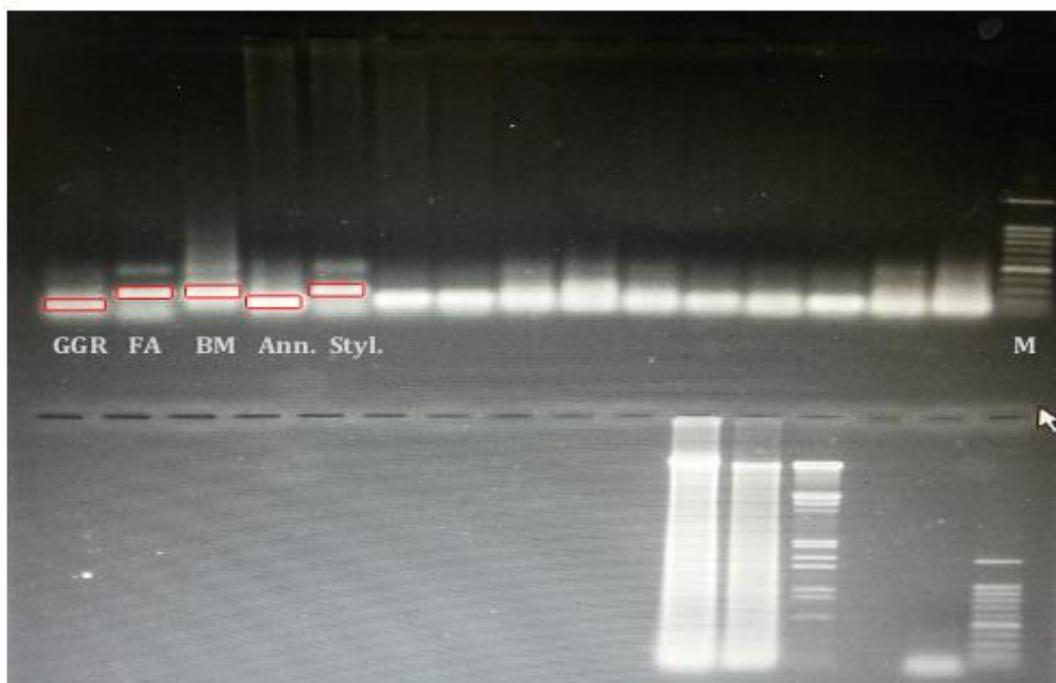


Figure 19: Révélation électrophorèse des résultats de la PCR.

D'après le gel il y a bien eu amplification d'ADN c'était le but des 10 échantillons aléatoires.

Pour les quatre échantillons BM GGR FA HD, On les compare à Stylet et Annuello (parents) pour l'interprétation.

La bande d'ADN de Stylet est entre 200 et 300 pb, or l'allèle sensible du gène LR34 est amplifié à 229 pb. Stylet est donc sensible à la rouille brune.

La bande d'ADN de Annuello est située entre 100 et 200 pb, or l'allèle résistant du gène LR34 est amplifié à 150 pb. Annuello est donc résistant à la rouille brune.

De la même manière on voit que FA sont sensibles et GGR et HD résistants.

2. Discussion

La sélection des variétés résistantes à la rouille brune est possible de différente manière. La sélection classique qui consiste à croiser des variétés résistantes à la rouille brune pour ensuite sélectionner les descendants qui ne présentent pas ou peu de symptômes de la pathologie, ce cycle de sélection est répété plusieurs fois, cette technique peut prendre beaucoup de temps voir une dizaine d'année pour l'obtention de la variété souhaiter d'autant plus qu'elle n'est pas spécifique contrairement aux techniques modernes (marquage moléculaire), l'hybridation des amorces des gènes résistants à la rouille brune avec les fragments d'ADN des variétés étudiées permettent aux biotechnologies de sélectionner la variété désirée de manière spécifique et à moindre délai.

Conclusion

Aujourd'hui, avec le marquage moléculaire, de nouvelles perspectives s'ouvrent pour le sélectionneur. La mise en évidence de marqueurs moléculaires liés à des gènes de résistance aux maladies dans des lignées de blé en cours de sélection, ou servant de parents potentiels dans les croisements, permet d'intervenir précocement au niveau d'un schéma de sélection. Cette sélection permettra des constructions de génotypes qui sont difficilement réalisables par la sélection phénotypique. De plus, dans la sélection classique, les effets des gènes peuvent être masqués lors de l'accumulation de facteurs de résistance à une même maladie et le phénotype ne permet donc pas le choix, avec certitude, de la combinaison de gènes souhaités.

Par ailleurs, la création de variétés résistantes par des rétrocroisements assistés par marqueurs est une méthode qui reste économique et écologique et ne présente, contrairement aux organismes génétiquement modifiés (OGM), aucun risque ni problème éthique concernant leur acceptabilité puisque les ressources génétiques sont utilisées depuis le début de la sélection. Les marqueurs moléculaires ont déjà fait leur preuve de robustesse et de précision pour l'étiquetage la cartographie de caractères d'intérêt chez les plantes, particulièrement chez le blé. Toutefois, bien que leur utilisation devienne une réalité, la maîtrise du coût de marquage constitue encore un défi pour beaucoup d'utilisateurs.

Ce coût peut être réduit d'une part, par la simplification et la robotisation des techniques de marquage moléculaire et d'autre part, par l'intégration d'outils de génomique développés chez le riz, plante modèle pour les monocotylédones/céréales et de bio-informatique qui permettent d'analyser les séquences des gènes chez cette plante simple, et de rechercher les gènes ayant la même fonction dans des espèces différentes. Le développement de nouvelles technologies comme les SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) qui permettent la recherche et l'exploitation du polymorphisme au nucléotide ouvre de nouvelles voies d'applications pour la génétique végétale. Ces techniques s'avèrent très prometteuses pour les utilisations à grande échelle et peuvent être considérées comme les marqueurs moléculaires de demain (Gupta et al, 2001 ; Rafalski, 2002a,b).

Ces nouvelles approches (génomique, bio-informatique, SNP) ainsi que l'accès aux banques de Séquences EST (Expressé Séquence Tags) peuvent accélérer la cartographie génomique et l'étiquetage des gènes chez les cultures à génome complexe comme le blé.

Références bibliographiques

1. **Abassenne F., Bouzerzour H. et Hachemi L., 1997-** Phénologie du blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone semi - aride .Annales Agronomiques. Institut National Agronomique, El Harrach, 18 :24 -36.
2. **Abassenne F., Bouzerzour H. et Hachemi L., 1998 -** Phénologie et production du blé dur (*Triticum durum* Desf.) en zone semi – aride d’altitude. Annales Agronomiques. INA, 18: 24 -36.
3. **Anonyme., 1994 -** Historique de blé dur. 32 p.
4. **Ben Salem M. et Vierra Da Siva J.B., 1990 –** Mécanismes physiologiques à la sécheresse et création variétale. Rapport d’activité numéro 1, MA/DGFRA /INRAT, Tunisie, 23pages.
5. **BENCHARIF A. 1993 -** Analyse macro-économique de la filière des céréales en Algérie. ENIAL
6. **Benlaribi M., 1984-** Facteurs de productivité chez six variétés de blé dur (*Triticum durum* Desf.) cultivées en Algérie. Thèse de Magister, I.S.B. – Université de Constantine, 111p.
7. **Benlaribi M., 1990-** Adaptation au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.) : Etude des caractères morphologiques et physiologiques. Thèse de Doctorat d’Etat, I.S.N.- Université de Constantine, 164 p.
8. **Benlaribi M., Monneveux Ph. et Grignac P., 1990-** Etude des caractères d’enracinement et de leur rôle dans l’adaptation au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.). Agronomie 10: 305-322.
9. **BENNETZEN, J. L., and W. RAMAKRISHNA, 2002**Numerous small rearrangements of gene content, order and orientation differentiate grass genomes. Plant Mol Biol 48: 821- 827.
10. **BENT, A. F., 1996** Plant disease resistance genes: Function meets structure. Plant Cell 8: 1757-1771.
11. **Bonjean A., 2001-** Histoire de la culture des céréales et en particulier celle de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Dossier de l’environnement de l’INRA, N°21 :29-37.
12. **Bonjean A., 2001-** Histoire de la culture des céréales et en particulier celle de blé tendre (*Triticum aestivum* L.). Dossier de l’environnement de l’INRA, N°21 :29-37.

13. **CHEN, Q., J. JAHIER and Y. CAUDERON, 1989** Production and Cytogenetical Studies of Hybrids between *Triticumaestivum* L. Thell and *Agropyroncrisatum* (L) Gaertn. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Série 3, Sciences de la vie* 308: 425- 430.
14. **CLAESSON, L., M. KOTIMAKI and R. VONBOTHMER, 1990** Production and Cytogenetic Analysis of the F1-Hybrid, *Elymuscaninus*, *Triticumaestivum* and the Backcross to *Triticumaestivum*. *Cereal Res Commun* 18: 315-319.
15. **Dekkers JCM., Hospital F.(2002).**The use of moleculargenetics in the improvement of agrecultural population (Revue).*Nat I.Rev.Genet.*3(1),p.22-32.
16. **DJERMOUN A., 1995** - La distribution des produits céréaliers en Algérie. Cas des produits finis dans la région de Blida. Thèse de Magister, INA, El Harrach, 1994, 303 P.
17. **Eagles HA., Bariana HS.,Ogbonnaya FC., Rebetzke GJ., Hollanby GJ., Henry RJ., Hanschke PH., Carter M.(2001).**Implomentation of markers in Ostralianwheat breeding.*Aust.J.Agric.Res.*52 (11-12), p.1349-1356.
18. **FEUILLET, C., P. LANGRIDGE and R. WAUGH, 2008**Cerealbreedingtakes a walk on the wildside. *Trends Genet.* 24: 24-32.
19. **GALLAIS, André.** Comprendre l'amélioration des plantes.1ere édition. France : Editions Quae, 21mai 2015 ,240
20. **GILL et al. 1993; JAMPATES and DVORAK 1986; RILEY and CHAPMAN 1958 ; SEARS and OKAMOTO 1958**
21. **HAYES, H. K., J. H. PARKER and C. KURTZWEIL, 1920**Genetics of rustresistance in cross of varieties of *Triticum vulgare*withvarieties of *T.durum* and *T. dicocon*. *J AgricRes (Washington, D.C)* 19: 523-542.
22. **Hospital, F ., 2001** .Size of donor chromosome segments aroundintrogresedloci and reduction of linkage drog in marker-assistedbackcross programs.*Genetics*158(3),1363-1379.
23. **Lamotte M., 1995** - A propos de la biodiversité, courrier de l'environnement de l'INRA n°24
24. **LIU, Z. W., R. R. C. WANG and J. G. CARMAN, 1994**Hybrids and Backcross ProgeniesbetweenWheat (*Triticum aestivum* L.) and ApomicticAustralianWheatgrass [*Elymusrectisetus* (Nees in Lehm) a-Love and Conner] - Karyotypic and Genomic Analyses. *TheorAppl Genet* 89: 599-605.

25. **Michelmore RW.(1995).**Isolation of disease resistance genes from crop plants. *Curr. Opin. Biol.* 6, p. 145-152.
26. **Moreauet J . M., 2011.** Lutte contre les maladies. Livre blanc « cereales » ULg Gembloux Agro-Bio Tech et CRA-W.
27. **Piccard E., 1988** - Sélection du blé dur . L'intégration de biotechnologies : 48 – 58.
28. **SEARS, E. R., 1954** The aneuploids of common wheat. *Mo Agric Exp Stn Res Bull* 572: 19.
29. **SEARS, E. R., 1966.** Nullisomic-tetrasomic combinations in hexaploid wheat. In: Riley R, Lewis KR (eds), pp. 29-45 in *Proc 10th Int Bot Congress*, Oliver & Boyd, Edinburgh, Scotland.
30. **SEARS, E. R., and M. OKAMOTO, 1958.** Intergenomic chromosome relationships in hexaploid wheat. *Proc. Tenth Int. Congr. Genet.* 2: 258-259.
31. www.arvalis-infos.fr/performances-des-varietes-de-ble-tendre-disponibles-en-2019-@/view-23095-arvarticle.html.
32. www.arvalis-infos.fr/le-maghreb-une-opportunit-e-pour-le-ble-dur-francais-@/view-17093-arvarticle.html.
33. www.noriap.com/blog/rouille-jaune-une-adaptation-des-programmes-fongicides-sur-bl%C3%A9.
34. www.google.com/search?q=la+rouille+brune&sxsrf=ALeKk012ZjAR6tzgXWbXoXXVDfO4reI5yg:1598282410885&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKEwiQz-f6kbTrAhWsA2MBHb8PAyAQ_AUoAXoECBcQAw&biw=1366&bih=576#imgrc=E4eb0qW46i7GwM.
35. www.google.com/search?q=septoriose+du+bl%C3%A9&tbn=isch&ved=2ahUKEwiG59D8kbTrAhUSLxoKHfTgCQcQ2-.cCegQIABAA&oq=septoriose+&gs_lcp=CgNpbWcQARgAMgIIADICCAAyAggAMgIIADICCAAyAggAMgIIADICCAAyAggAMgIIADoHCCMQ6gIQJzoECAAQQzoFCAAQsQM6BAgjECc6BwgAELEDEENQyP2qAViumasBYJGlqwFoAXAAeACAAYcCiAHmC5IBBTEuOS4xmAEAoAEBqgELZ3dzLXdpei1pbWewAQRAAQE&scient=img&ei=rtpDX4bYKpLeaPTBpzg&bih=576&biw=1366#imgrc=Wn_uZECx73ca3M.
36. www.google.com/search?q=helminthosporiose+bl%C3%A9&hl=fr&sxsrf=ALeKk03O0jB5L5KINIU1kf5FMHbw2bzVXw:1598285574160&source=lnms&tbn=isch&

[sa=X&ved=2ahUKEwiJxJbfnbTrAhW98uAKHbdQAIUQ_AUoAXoECA0QAw&biw=1366&bih=576#imgrc=NozXFrvbjQ_WTM.](#)