



## PREFACE

Ce polycopié de cours intitulé : Introduction à la sélection assistée par des marqueurs moléculaires, est une matière fondamentale du semestre 1, plus particulièrement du programme de la formation du master académique dispensé en première année master Biotechnologie et valorisation des plantes (BVP) (2025/2026), avec coefficient 3 et un crédit de 6, son volume horaire global (VHS) est de 67h30 (14-16 semaines), 1h30 fois 2 de cours et 1h30 fois 2 de travaux dirigés par semaine. L'enseignement de cette matière a pour objectif de fournir des bases théoriques permettant l'acquisition de connaissances et des concepts dans le domaine de génétique, biologie moléculaire et l'importance des marqueurs moléculaires dans l'amélioration et la diversité génétique des plantes. Pour mieux comprendre cette matière, il est nécessaire que l'étudiant doit avoir des prérequis sur les notions en génétique et notamment la génétique quantitative et les concepts clés en biologie moléculaire.

Ce polycopié de cours fait appel à des disciplines très variées, notamment la biologie moléculaire, la génétique quantitative, la sélection végétale et l'amélioration des plantes et la biodiversité. Il est composé de quatre chapitres, dans chacune des quatre parties on a illustré des exemples contextuels.

Le premier chapitre et après une introduction il définit le concept de marqueur moléculaire et envisage le génotypage et le polymorphisme des marqueurs : RFLP, RADP, SSR, AFLP et SNP et leur principe d'identification et d'application.

Dans le deuxième chapitre destiné aux plantes modèles concernées par la sélection par les marqueurs moléculaires on a étudié l'identification des caractères d'intérêt chez le pois (*Pisum sativum* L.) et application des marqueurs dans l'étude de la diversité génétique chez *Vigna sinensis* et le troisième chapitre concerne les marqueurs moléculaires et l'amélioration des plantes on étudie le cas de la luzerne (*Medicago sativa* L.) et enfin le quatrième chapitre traite l'utilisation des marqueurs moléculaires pour la sélection pour la résistance : au mildiou (*Erysiphe pisi* Syd.), à la fusariose et sélection pour la précocité de floraison. A la fin de ce chapitre nous avons expliqué les stratégies de sélection et notamment le pyramidage des QTLs dans les lignées élites *via* les marqueurs moléculaires. Une citation minimisée dans le texte et la littérature est présentée à la fin du polycopié.

# SOMMAIRE

## CHAPITRE I

<b>I.1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>I.2. Les outils de biologie moleculaire au service des marqueurs moléculaires .....</b>	<b>2</b>
<b>I.2.1. Les enzymes de restriction .....</b>	<b>2</b>
<b>I.2.1.1.Les nucléases .....</b>	<b>2</b>
<b>I.2.1.2.Origine des enzymes de restriction.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.1.3. Nomenclature des enzymes de restriction.....</b>	<b>3</b>
<b>I.2.1.5.Applications principales des enzymes de restriction .....</b>	<b>5</b>
<b>I.3. Clonage d'un gène <i>in vivo</i> et création de plasmide recombiné .....</b>	<b>7</b>
<b>I.4. La réaction de polymérisation en chaine (PCR) .....</b>	<b>8</b>
<b>I.5. Les sondes moléculaires.....</b>	<b>10</b>
<b>I.6. Les puces à ADN .....</b>	<b>10</b>
<b>I.6. 1. Utilisation des puces à ADN .....</b>	<b>10</b>
<b>I.7. Le séquençage des gènes.....</b>	<b>11</b>
<b>I.8. Les marqueurs moléculaires .....</b>	<b>12</b>
<b>I.8. 1. Introduction.....</b>	<b>12</b>
<b>I.8. 2. Définition d'un marqueur moléculaire .....</b>	<b>12</b>
<b>I.8.2. 1.Les caractéristiques d'un bon marqueur moléculaire.....</b>	<b>12</b>
<b>I.8.3. Les avantages de l'utilisation des marqueurs moléculaires .....</b>	<b>13</b>
<b>I.9. Le génotypage.....</b>	<b>13</b>
<b>I.9.1. Applications du génotypage .....</b>	<b>14</b>
<b>I.9.2. Les outils du génotypage: RFLP, RADP, SSR, AFLP et SNP .....</b>	<b>14</b>
<b>I.9.2.1. Le génotypage RFLP .....</b>	<b>15</b>
<b>I.9.2.2. Le génotypage RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....</b>	<b>17</b>
<b>I.9.2.3. Le génotypage microsatellites SSR (simple séquence repeat) .....</b>	<b>19</b>
<b>I.9.2.4. Le génotypage AFLP (Amplified Fragment Lenght Polymorphism).....</b>	<b>21</b>
<b>I.1.2.5. Génotypage SNP (Single Nucleotide Polymorphisms).....</b>	<b>22</b>
<b>I.10. Principes d'identification et d'application des marqueurs moléculaires.....</b>	<b>24</b>
<b>I.10. 1.Le principe d'identification des marqueurs moléculaires .....</b>	<b>24</b>
<b>I.11.Utilisations des marqueurs moléculaires .....</b>	<b>25</b>
<b>I.11.1.Description de la variabilité génétique.....</b>	<b>25</b>
<b>I.11.2.Caractérisation et structuration de la variabilité génétique .....</b>	<b>26</b>

I.11.3. Phylogénie.....	26
I.11.4. Analyse de la diversité génétique.....	27
I.11.4. 1. Phylogéographie.....	27
I.11.4. 2. Structure et différenciation.....	28
I.11.4. 3. Flux de gènes, recherche de parenté et introgression.....	28
I.11.4.4. Identification.....	29
I.11.4.5. Cartographie génétique et applications.....	29
I.11.4.5. 1. Principe d'établissement de cartes génétiques.....	29
I.11.4.5. 2. Carte référence, portabilité dans l'espèce.....	30
I.11.4.5. 3. Recherche de QTL, gènes candidats.....	31
I.11.4.5. 4. Cartographie comparée entre espèces.....	31
II.1. Plantes modèles et l'utilisation des marqueurs.....	33
II.1.1.Introduction.....	33
II.1.2.Les critères de choix d'une plante modèle.....	33
II.1.2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
II.1.2.2. <i>Oryza sativa</i> .....	34
II.1.2.3. <i>Medicago truncatula</i> .....	35
II.1.2.4. <i>Solanum lycopersicum</i> .....	36
II.1.2.5. <i>Populus trichocarp</i> .....	37
II.1.2.6. <i>Vitis vinifera</i> .....	38
II.1.2.7. <i>Brachypodium distachyon</i> .....	38
II.1.2.8. <i>Eucalyptus grandis</i> .....	39
II.1.2.9. <i>Zea mays</i> .....	39
II.1.2.9. 1.Importance économique et agronomique du Maïs.....	40
II.2.Légumineuses en Algérie.....	40
II.2.1.Importance nutritionnelle des légumineuses.....	41
II.2.2.Le pois ( <i>Pisum sativum</i> L.).....	42
II.2.2.1.Description botanique de <i>pisum sativum</i> .....	42
II.2.2.2.Variétés de petit pois.....	43
II.2.2.3.Importance nutritionnelle du petit pois.....	43
II.2.2.4.Importance agronomique.....	44
II.2.2.4.1.Fixation de l'azote atmosphérique.....	44
II.2.2.5.Les caractères d'intérêt chez le pois ( <i>Pisum sativum</i> L.).....	45
II.2.2.5.1.Identification des caractères d'intérêt chez le pois ( <i>Pisum sativum</i> L.).....	45

<b>II.3. Application des marqueurs dans l'étude de la diversité génétique chez <i>Vigna sinensis</i></b> .....	46
<b>III.1. L'amélioration des plantes</b> .....	47
<b>III.1.1. Les bases théoriques de l'amélioration des plantes</b> .....	47
<b>III.2. La génétique quantitative</b> .....	50
<b>III.3. Les marqueurs moléculaires et l'amélioration des plantes</b> .....	51
<b>III.3.1. Le cas de la Luzerne (<i>Medicago sativa</i> L.)</b> .....	53
<b>III.3.1.1. La description botanique de la luzerne <i>Medicago sativa</i></b> .....	53
<b>III.3.1.2. Systématique</b> .....	54
<b>III.3.1.3. Le cycle de la luzerne</b> .....	54
<b>III.3.1.4. Utilisation de la luzerne <i>Medicago Sativa</i> dans alimentation animale</b> .....	55
<b>III.3.1.5. Utilisation de la luzerne <i>Medicago Sativa</i> dans alimentation humaine</b> .....	55
<b>III.3.1.6. Quelques atouts agronomiques de la luzerne</b> .....	56
<b>III.3.1.6.1. Favorise la biodiversité:</b> .....	56
<b>III.3.1.6.2. Économie d'azote</b> .....	56
<b>III.3.1.6.3. Érosion et sols</b> .....	57
<b>III.3.1.6.34. Qualité de l'eau</b> .....	57
<b>IV.1. La sélection végétale</b> .....	58
<b>IV.1.1. Le principe de la sélection végétale</b> .....	59
<b>IV.1.2. Les objectifs de la sélection végétale</b> .....	60
<b>IV.1.3. Les étapes de la sélection artificielle</b> .....	60
<b>IV.1.4. Sélection récurrente phénotypique</b> .....	62
<b>IV.1.5. Le rétrocroisement</b> .....	63
<b>IV.2. La Sélection assisté par marqueurs moléculaires (SAM)</b> .....	64
<b>IV.2.1. Principe de sélection assistée par marqueurs (SAM)</b> .....	65
<b>IV.2.2. Méthodes de la SAM</b> .....	66
<b>IV.2.3. Les étapes clés de la technique SAM</b> .....	67
<b>IV.2.4. Applications de SAM</b> .....	67
<b>IV.2.5. SAM et programmes d'introgession</b> .....	67
<b>IV.2.5. Les programmes d'introgession assisté par marqueurs</b> .....	68
<b>IV.2.5.1. Exemple de l'introgession du gène Bt chez le Maïs</b> .....	69
<b>IV.2.6. Conversion assistée par marqueurs</b> .....	70
<b>IV.2.7. Domaines d'Application de la SAM</b> .....	70
<b>IV.2.7.1. Exemples de sélections assistées par marqueurs</b> .....	71
<b>IV.2.8. Sélection assisté par marqueur SAM en amélioration du blé</b> .....	71

IV.2.9. Avantages et défis de la SAM.....	72
IV.2.10. Comparaison entre méthodes de sélection traditionnelle et SAM.....	73
IV.2.11. Quels types de cultures bénéficient le plus de la sélection assistée par marqueurs.....	75
IV.3. Sélection pour la résistance au mildiou ( <i>Erysiphe pisi</i> Syd.) .....	75
IV.3.1. Définition .....	75
IV.3.2. Mildiou de la tomate .....	76
IV.3.3. Types de résistance au mildiou .....	76
IV.3.4. Méthodes de sélection au mildiou .....	76
IV.3.4.1. La sélection massale .....	77
IV.3.4.2. La sélection généalogique .....	77
IV.3.4.3. Les avantages de la sélection pour la résistance au mildiou de la tomate.....	78
IV.4. Mildiou de la vigne.....	79
IV.5. La résistance du tournesol au mildiou .....	80
IV.5. 1. Utilisation de la technique .....	80
IV.6. La sélection pour la résistance à la fusariose ( <i>Fusarium oxys purum</i> F.S.P) .....	81
IV.6.1. Cycle de vie du champignon.....	81
IV.6.2. Les symptômes de la fusariose .....	82
IV.6.3. La lutte contre la fusariose.....	83
IV.6.3.1. La lutte chimique .....	83
IV.6.3.2. Lutte biologique .....	83
IV.6.3.2.1. Les stimulateurs de défense naturelles (SDN) .....	84
IV.6.3.3. La lutte génétique.....	84
IV.7. Méthodes de sélection de la fusariose.....	84
IV.7.1. La sélection classique .....	84
IV.7.2. La sélection par marqueurs .....	84
IV.8. Les étapes de la sélection pour la résistance à <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. ....	85
IV.9. Sélection pour la précocité de floraison .....	86
IV.9.1. Introduction.....	86
IV.9.2. Importance de la précocité de floraison.....	86
IV.9.2.1. Importance agronomique de la précocité de floraison .....	87
IV.10. Les facteurs influençant la précocité de floraison des fruits et légumes .....	87
IV.11. Les indicateurs de précocité.....	88
IV.12. Les étapes impliquées dans la sélection pour précocité de floraison.....	88
IV.13. Méthodes de sélection .....	89

<b>IV.13. 1.Méthodes directes</b> .....	89
<b>IV.13. 1.1.La sélection généalogique</b> .....	90
<b>IV.13. 1.2.La sélection massale</b> .....	90
<b>IV.13.2.Méthodes indirectes</b> .....	90
<b>IV.13.3.La sélection par marqueurs moléculaire de la précocité de floraison</b> .....	90
<b>IV.13.3.1.La sélection assistée par génotype-environnement</b> .....	91
<b>IV.14.Précocité de floraison pour les légumineuses</b> .....	91
<b>IV.15.Les avantages et les inconvénients de la sélection pour la précocité de floraison</b> .....	92
<b>IV.16.Les perspectives de la sélection pour la précocité de floraison</b> .....	93
<b>IV.17.Quel type de marqueurs pour la sélection SAM</b> .....	93
<b>IV.17.1.SAM pour les caractères quantitatifs</b> .....	93
<b>IV.17.2.La notion QTL et la sélection assisté par marqueur</b> .....	94
<b>IV.17.2.1.Définition d'un QTL</b> .....	94
<b>IV.17.2.2.Fonctionnement des QTL</b> .....	94
<b>IV.17.2.3.Localisation d'un QTL</b> .....	94
<b>IV.17.2.4.Cartographie des QTL</b> .....	96
<b>IV.17.2.4.1.Le principe de la cartographie</b> .....	96
<b>IV.17.2.5.Applications des QTL</b> .....	97
<b>IV.17.2.6.Identification des QTL</b> .....	98
<b>IV.17.2.7.L'analyse QTL</b> .....	98
<b>IV.18. La cartographie d'un gène majeur</b> .....	98
<b>IV.18. 1.Localiser les gènes majeurs</b> .....	98
<b>IV.18. 2.Détection de la liaison</b> .....	99
<b>IV.18. 3.Apport à la sélection</b> .....	100
<b>IV.18. 4.Analyse fine de la structure du gène</b> .....	100
<b>IV.19.SAM pour pyramider les gènes</b> .....	100
<b>IV.19.1.Pyramidage des gènes</b> .....	100
<b>.IV.19.1.1.Exemples de pyramidage</b> .....	101
<b>IV.19.2.Comment faire le pyramidage</b> .....	102
<b>IV.20.SAM et les stratégies de sélection</b> .....	102
<b>IV.20.1. Introgression de gènes (Rétrocroisement)</b> .....	102
<b>IV.20.2. Le cumul de multiples gènes bénéfiques (pyramidage)</b> .....	102
<b>IV.20.3. Stratégie de sélection par seuil</b> .....	103
<b>IV.20.4. Stratégie de sélection par classification</b> .....	103

<b>IV.20.5. Stratégie de sélection par renforcement</b> .....	103
<b>IV.20.6. Stratégie de sélection SLS-SAM</b> .....	103
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	104

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

**ACP** : Analyse en Composante Principale

**ADNc** : sonde d'ADN complémentaire

**ADNg** : Sonde d'ADN génomique

**AFLP**: Amplified Fragment Length Polymorphism)

**AFSA** : Association Française du syndrome d'Angelman

**ASAP**: As Soon As Possible

**ATN** : Anomalies du Tube Neural

**Avr** : Avirulence

**BAC**: Bacterial Artificial Chromosome

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool

**BSA** : Bulk Segregant Analysis

**CEA** : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives

**CIM**: Composite Interval Mapping

**C/N** : rapport Carbone/Azote

**cpSSR** : microsatellite chloroplastique

**CRISPR CaS9** : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

**D/TGGE**: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

**EPIC**: Exon Priming, Intron Crossing

**EPIC** : Emulsion, Paired Isolation and Concatenation

**EPIC**: EPIC Exon Priming, Intron Crossing

**EST**: Expressed Séquence Tag

**FAO**: Food and Agriculture Organization

**FOV**: *Oxysporum* F.sp. *Vasinfectum*

**GEBV** : Genetic Estimated Breeding Values

**IGGP** : International Grape Genome Program

**IM**: Interval Mapping

**INRA** : Institut national de la recherche agronomique

**INRAE** : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

**ISSR**: Inter Simple Sequence Repeats

**ISTR**: Inter-Simple Sequence Repeats

**LD**: Déséquilibre de Liaison

**LDL-cholestérol** : Lipoprotéine de base Densité-cholestérol

**MAAP** : Multiple Arbitrary Amplicon Profiling  
**MADR** : Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural  
**MAT** : Matières Azotées Totales  
**MIM**: Multiple Interval Mapping  
**OGM** : Organisme Génétiquement Modifié  
**ONG** : Organisation Non-Gouvernementale  
**PAMPs**: (Pathogen-Associated Molecular Patterns)  
**PCR** : Réaction de Polymérisation en Chaîne  
**PCR-RFLP** : PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Voir CAPS  
**QTL** : Quantitative Trait Loci  
**RAHM** : Random Amplified Hybridization Microsatellites  
**RAMP** : Random Amplified Microsatellite Polymorphism  
**RAPD**: Random Amplified Polymorphic DNA  
**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism  
**RGA** : Resistance Gene Analogs  
**RILs** : Lignées Recombinantes Inbred  
**SAM** : Sélection Assistée par Marqueurs moléculaires  
**SAMPL** : Sélective Amplification of Microsatellite Polymorphie Loci  
**SCAR** : Sequence-Characterized Amplified Region  
**SDN** : Stimulateurs de Défense Naturelles  
**SLS-SAM** : Single Large. Scale- Sélection Assistée par Marquer  
**SNP** : Single Nucleotide Polymorphism  
**S-SAP**: Sequence-Specific Amplification Polymorphisms  
**SSCP**: Single Strand Conformation Polymorphism  
**SSD** : Single Seed Descent  
**SSR** : Simple Séquence Repeat  
**STMS** : Sequence-Tagged Microsatellite Site  
**STS** : Sequence-Tagged Site  
**TAIR** : Arabidopsis Information Resource  
**TeMAAP** : Template Endonuclease Cleavage MAAP  
**TGC** : Consortium international du Génome de la Tomate  
**UC** : Unité Cartographique de carte génétique  
**WGS**: Whole Genome Shotgun sequencing  
**YAC** (Yeast Artificial Chromosome)

## **LISTE DES FIGURES**

**Figure 01 :** Dispositif d'électrophorèse

**Figure 02 :** résultat d'électrophorèse

**Figure 03:** Plasmide comme vecteur de clonage

**Figure 04 :** 1<sup>ère</sup> étape Dénaturation

**Figure 05 :** 2<sup>ème</sup> étape Hybridation

**Figure 06 :** 3<sup>ème</sup> étape l'élongation

**Figure 07 :** Les étapes de la réalisation d'une sonde moléculaire

**Figure 08:** principe de la puce à ADN

**Figure 09:** interprétation du séquenceur automatique

**Figure 10:** Étapes du génotypage

**Figure 11:** Technique RFLP

**Figure 12:** les marqueurs RFLP

**Figure 13 :** marqueur RAPD

**Figure 14:** Illustration schématique du principe de la technique SSR.

**Figure 15:** les marqueurs AFLP

**Figure 16 :** Les marqueurs SNP

**Figure 17 :** Principe d'utilisation d'un marqueur moléculaire de type microsatellite en  
identification variétale

**Figure 18 :** (A) représentation graphique (dendrogramme) ; (B) représentation graphique  
(APC)

**Figure19 :** carte génétique de marqueur RFLP chez la pomme de terre

**Figure 20 :** cartographie comparée

**Figure 21:** *Arabidopsis thaliana*

**Figure 22:** *Oryza sativa*

**Figure 23:** *Medicago truncatula*

**Figure 24:** *Solanum lycopersicum* L.

**Figure 25:** *Populus trichocarp*

**Figure 26 :** *Vitis vinifera*

**Figure 27:** *Brachypodium distachyon*

**Figure 28:** *Eucalyptus grandis*

**Figure 29:** Le Maïs (*Zea mays*)

**Figure 30 :** Organisation d'une plante de pois Boyeldieu, ( 1991)

**Figure 31:** Schéma montrant la liaison entre les gamètes.

**Figure 32:** Chromosome métaphasique

**Figure 33 :** exemple caryotype 21 paires de xomes

**Figure34 :** Marqueurs moléculaires et étude de la diversité génétique au niveau du génome

**Figure 35 :** marqueurs moléculaires utilisés dans l'amélioration des plantes

**Figure 36:** La luzerne

**Figure 37 :** Les repères historiques de la sélection

**Figure 38:** Les différentes étapes de la sélection artificielle

**Figure 39:** La sélection est une activité pluridisciplinaire

**Figure 40:** Les étapes de la sélection récurrente

**Figure 41:** Rétrocroisement (back-cross) dans le cas d'un gène de résistance dominant

**Figure 42:** Sélection par marqueurs moléculaires

**Figure 43:** Introduction dans une lignée d'un caractère intéressant

**Figure 44 :** Marquage l'introgression d'un gène R provenant d'un parent donneur dans le génome d'un receveur à l'aide des marqueurs A et B mis en évidence par électrophorèse

**Figure 45:** Introgression du gène Bt chez le Maïs

**Figure 46:** Localisation des gènes les plus utilisés dans l'amélioration du

**Figure 47 :** La S.A.M permet le tri d'un grand nombre de plantes en sélection à un stade de développement très précoce.

**Figure 48:** prélèvement d'une très faible quantité de matériel végétal pour la réalisation de S.A.M au laboratoire

**Figure 49 :** taches blanches sur les feuilles causées par le mildiou

**Figure 50:** Symptôme de mildiou de la tomate

**Figure 51 :** Sélection massale

**Figure 52 :** Le Défiant (tomate hybride résistante au mildiou)

**Figure 53 :** Early Girl (Tomate hybride résistante au mildiou)

**Figure 54:** variétés résistantes de tomates.

**Figure 55:** Analyse d'un profil AFLP (Caractéristique du polymorphisme

**Figure 56:** Cycle de vie du champignon *Fusarium oxysporum*

**Figure 57 :** symptômes de la fusariose.

**Figure 58 :** Précocité de floraison

**Figure 59 :** La précocité d'épiaison pour les graminées

**Figure 60 :** La cartographie d'un caractère quantitatif

**Figure 61:** Identification d'un gène par un marqueur moléculaire

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 01:** Quelques Enzymes de restriction et types de coupure induites

**Tableau 02:** Les principales techniques de marquage moléculaire

**Tableau 03:** Comparaison entre différents types des marqueurs RFLP, AFLP et SSR

**Tableau 04:** Les buts réalisés par la sélection végétale dans différents domaines

**Tableau 05:** Ecart entre dates de précocité des variétés précoces et tardives

## **I.1. Introduction**

L'amélioration génétique des plantes est de plus en plus étudiée grâce notamment au développement des biotechnologies. L'étude génétique des caractères agronomiques, tel que le rendement, la graine ou la qualité du fruit sont des axes importants de la recherche en amélioration génétique.

Au sein d'une population, l'apparition de nouveaux caractères est en lien avec des modifications de l'information génétique, soit naturellement par hybridation naturelle et /ou artificielle interspécifique et intra-spécifique des espèces, par implication du phénomène mutagénèse.

la variabilité génétique d'une population est diminuée par la sélection naturelle car certaines combinaisons génétiques défavorables dans le milieu où elles se produisent ont été enlevées . Cependant elle peut aussi maintenir à une fréquence stable, des nouveaux variant génétiques, sans pour autant éliminer les anciennes versions

Face au besoin toujours croissant de créer de nouvelles variétés capables de répondre à des besoins spécifiques, d'importants progrès ont été réalisés par l'exploitation de la variabilité génétique qu'offrent les espèces sauvages en caractères d'intérêt agronomique.

Dans le but d'augmenter, de stabiliser la productivité des plantes cultivées et au-delà de la sélection classique, différentes techniques biotechnologiques comme les marqueurs moléculaires peuvent être utilisées pour améliorer la tolérance ou la résistance aux facteurs de l'environnement.

La sélection assistée par marqueurs (SAM) est un outil d'aide à la sélection qui vise à augmenter l'efficacité de la sélection et à permettre un progrès plus rapide que la sélection phénotypique classique. Elle est basée sur l'utilisation de marqueurs qui sont des loci polymorphes pour lesquels il est possible de connaître le génotype des individus.

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

De plus le développement des marqueurs moléculaires et les différentes techniques (RFLP, AFLP, RAPD, Microsatellites) offrent la possibilité d'établir de nouvelle approche pour améliorer les stratégies de sélection.

Les marqueurs moléculaires confirment et renforcent les observations phénotypiques mais, dans la plupart des cas, leur utilisation n'élimine pas le besoin de faire des tests phénotypiques sur les plantes. Ces marqueurs seront d'une grande importance dans l'amélioration des cultures à valeur agronomique et dans les programmes de sélection assistée par marqueurs. Le développement de nouveaux marqueurs, ainsi que les techniques de génotypage haut-débit permettent de donner de nouvelles perspectives à l'utilisation de la SAM.

## **I.2. Les outils de biologie moléculaire au service des marqueurs moléculaires**

Grâce aux progrès récents de la biologie moléculaire, en particulier la découverte des séquences microsatellites et la technique d'amplification des séquences d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), maintenant plusieurs marqueurs moléculaires sont disponibles et organisés en cartes génétiques dans la plupart des espèces d'élevage

### **I.2.1. Les enzymes de restriction**

A la fin des années 1960 des chercheurs ont découvert dans des cellules bactériennes des enzymes capables de découper la molécule d'ADN en morceaux. Ces enzymes appelées enzymes de restriction les cellules bactériennes qui les contiennent se défendent contre les molécules d'ADN qui leur sont < étrangères > comme par exemple celles des bactériophages, virus parasitant les bactéries.

#### **I.2.1.1. Les nucléases**

Les nucléases dégradent les molécules d'ADN en rompant les liaisons phosphodiester liant un nucléotide au suivant. Il existe 2 types de nucléases.

##### **A- Les exonucléases**

Ces enzymes éliminent des nucléotides un à un à partir d'une extrémité de l'ADN. Il en existe différents types, par exemple la Bal31 (obtenue de cultures d'*Alteromonas espejana*) éliminant des nucléotides à partir des 2 extrémités des 2 brins, l'exonucléase 3 (obtenue à partir de cultures d'*E. coli*) catalysant l'hydrolyse séquentielle des nucléotides d'un ADN à partir d'une extrémité 3' libre.

##### **B- Les endonucléases**

Dans les infections lysogéniques ces enzymes sont produites par de très nombreuses bactéries. Elles découpent l'ADN in vitro de façon spécifique. Plus de 1200 différentes enzymes de restriction ont été caractérisées et elles sont classées en 3 types :

**Type I** : l'enzyme reconnaît sa séquence puis se déplace sur l'ADN et s'arrête de manière aléatoire 1000 à 5000 paires plus loin et libère quelques dizaines de nucléotides.

**Type II** : une fois la séquence reconnue, l'enzyme coupe l'ADN au niveau de cette séquence (les plus courantes en biologie moléculaire).

**Type III** : après reconnaissance de la séquence spécifique, ces enzymes découpent l'ADN une vingtaine de nucléotides plus loin. La longueur des séquences reconnues est comprise entre 4 et 8 bases. Elle est identique sur les 2 brins.

Les enzymes de restriction sont utilisées pour établir une carte de restriction de toute molécule d'ADN que l'on souhaite caractériser. Cela consiste à déterminer l'ordre des sites de restriction le long de cette molécule, qui vont produire, après "digestion enzymatique" de cette molécule, des fragments de tailles différentes dont la taille pourra être définie par électrophorèse.

Les enzymes de restriction appartiennent à la classe des endonucléases, c'est-à-dire des enzymes capables de cliver les liaisons phosphodiester entre deux nucléotides à l'intérieur d'un acide nucléique. Les endonucléases se différencient des exonucléases qui dégradent la molécule d'ADN à partir de l'une de ses extrémités (3' ou 5').

#### **I.2.1.2. Origine des enzymes de restriction.**

Ces enzymes extraites des cellules procaryotes découpent *in vitro* n'importe quel ADN de manière très spécifique, chacune de ces enzymes reconnaît une séquence symétrique particulière de quelques nucléotides appelées site de restriction et effectue une coupure des deux brins de la molécule dans cette séquence. La molécule d'ADN est ainsi fragmentée, les morceaux obtenus ou fragments de restriction sont de longueur variable.

Les chercheurs disposent aujourd'hui de plusieurs centaines d'enzymes de restrictions différentes, leur offrant plus de 150 manières différentes de couper l'ADN. Le découpage de l'ADN est reproductible : c'est le même à chaque fois qu'on utilise une même enzyme sur une même molécule d'ADN, les extrémités des fragments de restriction obtenus sont connues, elles dépendent de l'enzyme utilisée pour couper l'ADN.

Les bactéries peuvent être parasitées par des virus à ADN. Les bactéries fabriquent des enzymes de restriction qui sont capables de cliver les ADN étrangers. Pour éviter une autodestruction de leur propre ADN, elles se protègent contre leurs propres enzymes de restriction par une modification des sites de restriction correspondants.

#### **I.2.1.3. Nomenclature des enzymes de restriction.**

Les enzymes de restriction présentent une nomenclature bien précise. Leur nom comporte plusieurs lettres (3 ou 4). La première lettre de dénomination de l'enzyme est écrite en majuscule, elle correspond au genre de la bactérie d'où a été extraite l'enzyme. La seconde lettre et la troisième lettre (en minuscules) correspondent à l'espèce de la bactérie d'où l'enzyme est extraite. On peut avoir une quatrième lettre écrite en majuscule correspondant à

la souche bactérienne. Enfin pour terminer, un chiffre romain indique l'ordre de caractérisation de ces enzymes.

**Exemples:**

Eco RI extraite d'*Escherichia coli* RYB le site de restriction reconnu: **G / AATTC**

Sma I extraite de *Serratia marcescens* site de restriction reconnu: **CCC / GGG**

**I.2.1.4. Les classes d'enzymes de restriction.**

La plupart des enzymes de restriction utilisées au laboratoire présentent un site de reconnaissance (souvent palindromique) et un site de coupure identique ou proche du site de reconnaissance, ce sont des enzymes de type II. Certaines bactéries possèdent d'autres types d'enzymes de restriction.

Les enzymes de type I reconnaissent des séquences sur l'ADN sans aucune symétrie. Ces enzymes coupent non pas au niveau de la séquence de reconnaissance mais 1000 à 5000 paires de bases plus loin. Les enzymes de type III présentent également un site de reconnaissance mais coupent une vingtaine de nucléotides plus loin.

**Tableau 01:** Quelques enzymes de restriction et types de coupure induites

Enzymes	Site de restriction	Extrémités des fragments obtenus		
<b>EcoRI</b>	....GAATTC.....	....G	et	AATTC.....
	....CTTAAG.....	.....CTTAA		G.....
<b>HpaII</b>	....CCGG.....	...C	et	CGG.....
	....GGCC.....	...GGC		C.....
<b>HaeIII</b>	....GGCC.....	.....GG	et	CC.....
	....CCGG.....	.....CC		GG.....
<b>BamHI</b>	....GGATCC....	....G	et	GATCC.....
	....CCTAGG.....	CCTAG		G.....
<b>BalI</b>	....TGGCCA.....	....TGG	et	CCA.....
	....ACCGGT....	....ACC		GGT...

Comme pouvez-vous le constater certaines enzymes font des coupures « franches » alors que d'autres font des coupures « décalées ». Dans ce dernier cas les extrémités ne sont formées que d'un brin : Ce sont des extrémités cohésives car elles peuvent se lier par complémentarité des bases azotées avec un brin possédant la séquence complémentaire. Ces extrémités permettent l'assemblage de fragments d'ADN découpés avec la même enzyme de restriction

#### **I.2.1.5.Applications principales des enzymes de restriction**

Les enzymes de restriction sont des outils indispensables en biologie moléculaire pour la manipulation de l'ADN et la création d'outils de diagnostic génétique :

**A.Technologie de l'ADN recombinant et génie génétique :** Les enzymes de restriction permettent d'insérer des gènes ou des fragments d'ADN spécifiques dans des plasmides (des molécules d'ADN circulaires).

**B.Clonage et sous-clonage** Elles servent à isoler un fragment d'ADN d'un plasmide pour l'insérer dans un autre, ce qui permet sa réplication dans des bactéries.

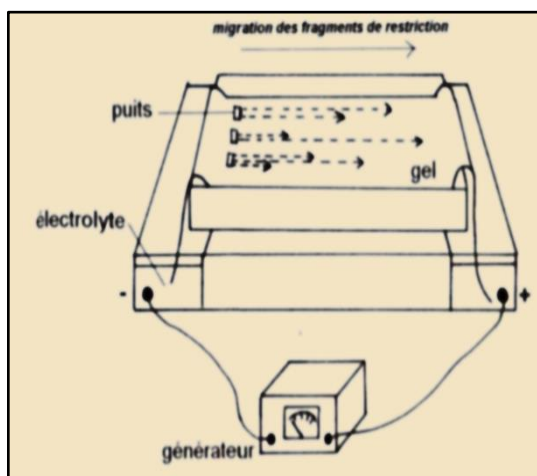
**C.Identification de mutations :** En introduisant des sites de restriction à des endroits précis d'un gène, on peut utiliser les enzymes de restriction pour détecter la présence de petites variations génétiques (polymorphismes de nucléotides simples, ou SNP).

**D. Diagnostic et identification d'espèces :** Les enzymes de restriction sont utilisées pour analyser les motifs de coupure de l'ADN, permettant d'identifier des organismes ou de distinguer des individus au sein d'une même espèce

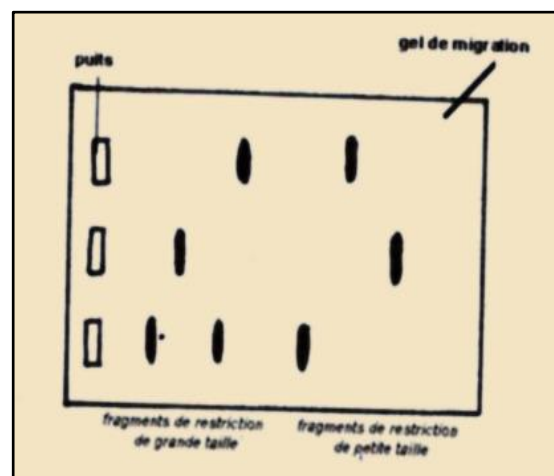
**I.3. Séparation et visualisation des fragments restriction par électrophorèse sur gel d'agarose**

Lorsque l'on obtient de nombreux fragments d'ADN il peut être utile de pouvoir les séparer : L'électrophorèse permet de trier les macromolécules d'un mélange en fonction de certaines de leurs caractéristiques, taille et charge électrique notamment. Elle consiste à soumettre le mélange de molécules (dans ce cas les fragments de restriction) à l'action d'un champ électrique dans lequel elles se déplacent chacune à une vitesse qui dépend notamment de sa taille.

Concrètement, le dispositif est constitué d'un support sur lequel on dépose le mélange de molécules que l'on veut séparer : Il s'agit pour l'électrophorèse des fragments de restriction d'un gel dans lequel est creusé un « puits » dans lequel on verse le mélange de fragments de restriction. Ce gel est déposé dans une cuve à électrophorèse qui est placée sous tension. L'ADN étant une molécule chargée négativement, les puits sont placés cote cathode, et pendant le temps de mise sous tension les fragments migrent dans le gel (vers l'anode) chacun a une vitesse qui dépend de sa taille. Au moment où on cesse l'électrophorèse, les différents fragments ne sont plus mélangés dans le puits mais « étalés » dans le gel entre la cathode et l'anode. (Fig. 01).



**Figure 01 :** Dispositif d'électrophorèse



**Figure 02 :** résultat d'électrophorèse

Cette technique très performante permet de séparer des fragments dont la longueur ne diffère que de quelques nucléotides. La longueur des fragments est exprimée en kilobases (Kb) : nombre de paires de bases de longueur.

Pour déterminer la longueur des différents fragments séparés, on fait migrer à partir d'un des puits des fragments d'ADN de longueur connue, qui servent « d'étalons ». Les fragments d'ADN sont invisibles, mais on peut les révéler par autoradiographie ou par coloration au bromure d'éthidium. On observe alors dans le gel des bandes parallèles.

L'autoradiographie permet de localiser des isotopes radioactifs : le rayonnement électromagnétique qu'ils émettent à la propriété d'impressionner les émulsions photographiques. Les molécules radioactives sont placées au contact d'un film imprégné d'une émulsion photographique. Au bout de quelques heures, le film photographique est développé et les zones impressionnées par les rayonnements émis par les isotopes radioactifs apparaissent en noir. Le plus souvent le marquage de l'ADN est réalisé par des atomes de  $^{32}\text{P}$  (l'acide phosphorique de l'ADN renferme le phosphore).

Le bromure d'éthidium est une substance qui, lorsqu'elle est fixée à l'ADN, a la propriété de devenir fluorescente, c'est-à-dire qu'elle a une coloration orange lorsqu'elle est éclairée à l'aide des rayons ultraviolets.

Dans cet exemple, le puits d'en haut et de celui du milieu contenaient chacun des fragments de deux tailles différentes (on observe donc deux bandes dans l'alignement de chacun de ces puits). Le puits d'en bas contenait quant à lui des fragments de trois longueurs différentes (on observe donc trois bandes dans l'alignement de ce puits) (**Figure 02**). Les résultats d'électrophorèse permettent de :

- ✓ identifier ou mettre en évidence certaines portions de molécules d'ADN, par comparaison des bandes obtenues avec une électrophorèse témoin.
  - ✓ Trouver un morceau d'ADN précis par « hybridation » avec une sonde
- Isoler des fragments d'ADN afin de les utiliser : l'électrophorèse n'endommage pas les morceaux d'ADN, et les extraire du gel ne pose pas de difficulté particulière.

### **I.3. Clonage d'un gène *in vivo* et création de plasmide recombiné**

L'intégration du morceau d'ADN à cloner dans un vecteur fait intervenir une enzyme de restriction qui ouvre le vecteur : on utilise la même enzyme que celle qui a permis d'obtenir le fragment d'ADN à cloner, ainsi ils possèdent les mêmes extrémités cohésives. L'intervention d'une ligase (enzyme) permet de lier ces extrémités qui sont complémentaires : le morceau d'ADN que l'on veut multiplier est ainsi intégré dans le vecteur.

Lorsque le vecteur de clonage est un plasmide, les cellules ou il pénètre vont-elles mêmes se diviser et aboutir à la formation de clones de cellules (populations de cellules génétiquement identiques).

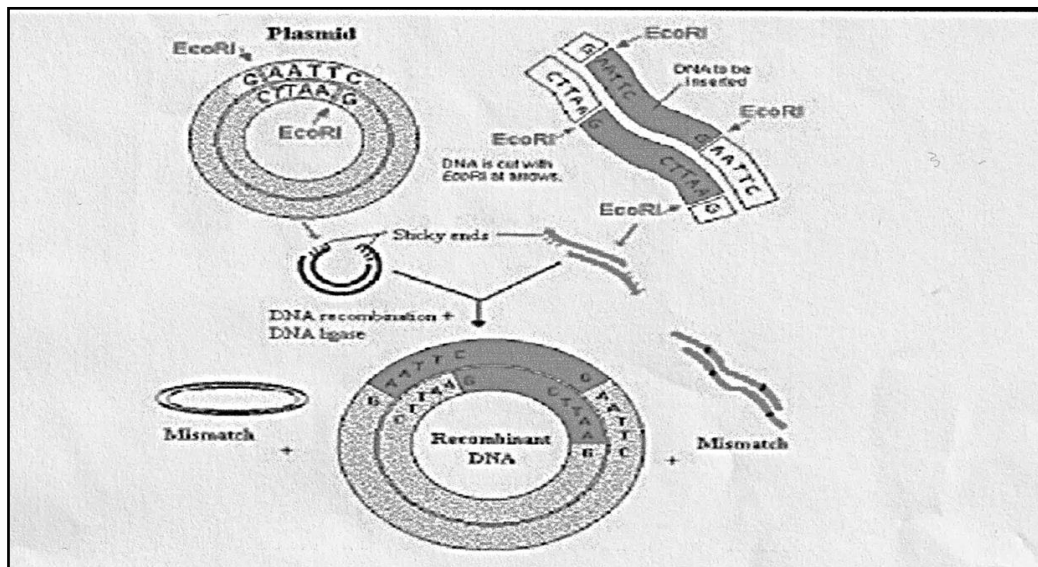


Figure 03: Plasmide comme vecteur de clonage

#### I.4. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Permet de répliquer artificiellement un morceau d'ADN in vitro, sans clonage. C'est une méthode strictement enzymatique, très efficace, basée sur l'utilisation d'une enzyme présente dans les cellules, l'ADN polymérase : elle assemble les nucléotides selon le « modèle » fournit par un brin : elle synthétise le brin complémentaire. Elle se déroule en trois étapes

La PCR, ou réaction de polymérisation en chaîne, permet de répliquer artificiellement un morceau d'ADN in vitro, sans clonage. C'est une méthode strictement enzymatique, très efficace, basée sur l'utilisation d'une enzyme présente dans les cellules, l'ADN polymérase : elle assemble les nucléotides selon le « modèle » fournit par un brin : elle synthétise le brin complémentaire.

**1<sup>ère</sup> étape Dénaturation** : on sépare les deux brins de la molécule d'ADN à multiplier. Une augmentation de température (95°) permet cette séparation. Donc les deux brins sont séparés.

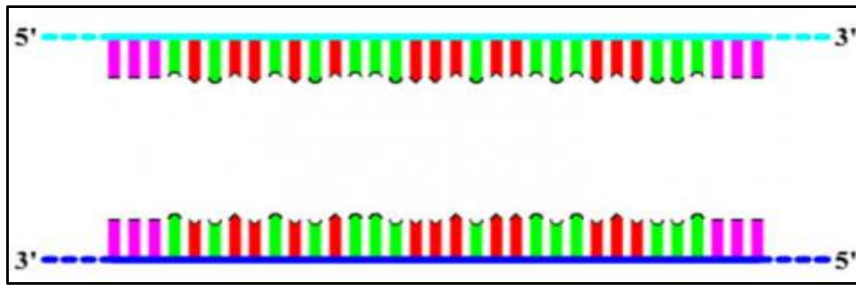


Figure 04 : 1<sup>ère</sup> étape Dénaturation

**2<sup>ème</sup> étape Hybridation (40 à 65°)** : Des amorces, courtes séquences de nucléotides complémentaires des extrémités des brins d'ADN sont ajoutées : ces petits poly nucléotides sont nécessaire au démarrage de la synthèse par la polymérase. Les amorces se lient, par complémentarité des bases, aux extrémités des brins. Cette technique suppose donc que l'on connaisse la séquence des nucléotides des extrémités du morceau d'ADN à multiplier (pour pouvoir fabriquer les amorces).

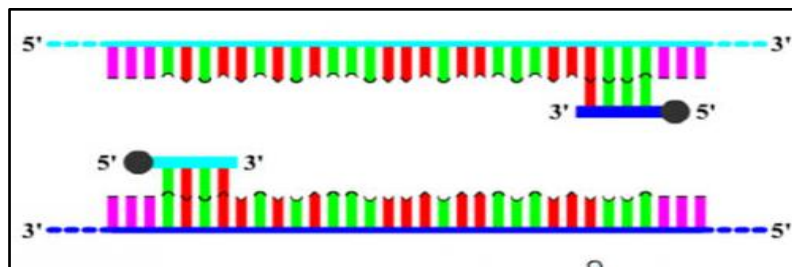


Figure 05 : 2<sup>ème</sup> étape Hybridation

**3<sup>ème</sup> étape l'élongation** : La Taq polymérase et des nucléotides (synthétisées artificiellement selon les procédés de la chimie organique) sont ajoutés. Dans le milieu placé à la température de 72°C (température optimale pour l'activité de la polymérase) les nucléotides libres sont assemblés à partir des amorces, sur toute la longueur des brins d'ADN : à partir d'une molécule d'ADN on en obtient donc deux molécules d'ADN rigoureusement identiques. On peut enchaîner les cycles de copies : en 10 cycles on obtient plus de 1000 exemplaires de l'ADN à multiplier, et en 20 cycles on obtient 1million !

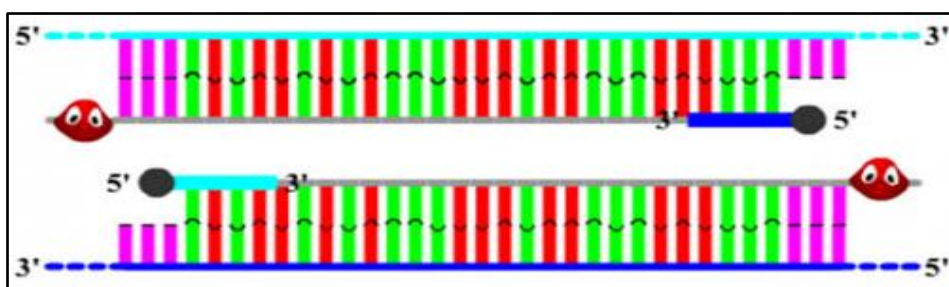


Figure 06 : 3<sup>ème</sup> étape l'élongation

## I.5. Les sondes moléculaires

La sonde utilisée est morceau d'ADN de structure connue : soit une copie d'un gène, dénaturée de façon à séparer les deux brins, soit un brin d'ADN synthétisé à partir d'un ARNm. Dans ce cas on utilise une enzyme, la transcriptase-inverse, qui réalise le processus inverse de la transcription (la transcription est la première étape de la synthèse des protéines consistant à synthétiser un ARNm complémentaire des bases azotées d'un des deux brins). Cette technique ne permet de parvenir au but que si on a pris soin de marquer la sonde (sonde radioactive ou fluorescente) afin de la rendre repérable, une fois qu'elle est hybridée avec le morceau recherché la sonde peut également être un ARNm.

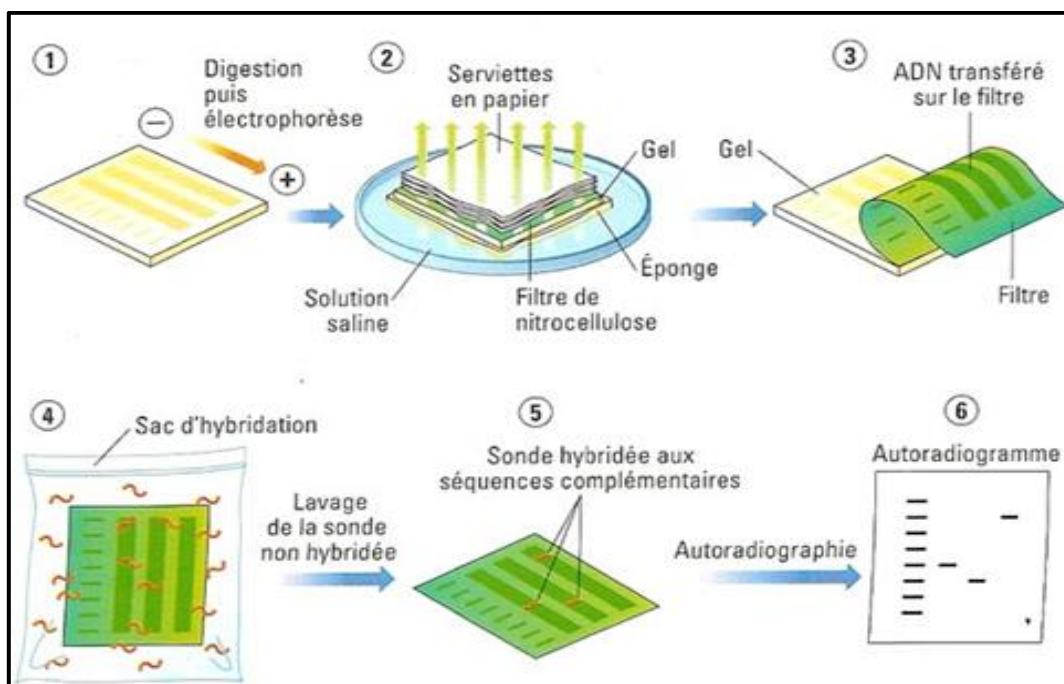


Figure 07 : Les étapes de la réalisation d'une sonde moléculaire

## I.6. Les puces à ADN

Les puces à ADN sont des images fonctionnelles du génome. Avec l'aide de plusieurs milliers de sondes, il est possible de comparer finement deux plantes. Après excitation laser des lames de verre sur lesquelles les échantillons des plantes ont été déposés, l'interprétation des couleurs de puits permet de déceler les différences génétiques de deux plantes. Des marqueurs de type RFLP permettent eux aussi de différencier et de caractériser « en routine » des variétés sur un grand nombre de caractères agronomiques.

### I.6. 1. Utilisation des puces à ADN

Les puces à ADN permettent de regrouper des gènes ayant le même profil d'expression dans des conditions expérimentales particulières. Elles peuvent par exemple être un outil performant pour

l'étude des facteurs abiotiques comme la tolérance à la sécheresse qui impliquent de nombreuses chaînes métaboliques et donc de nombreux gènes, car plusieurs milliers, voire plusieurs millions de substitutions de nucléotides peuvent être ainsi étudiées simultanément.

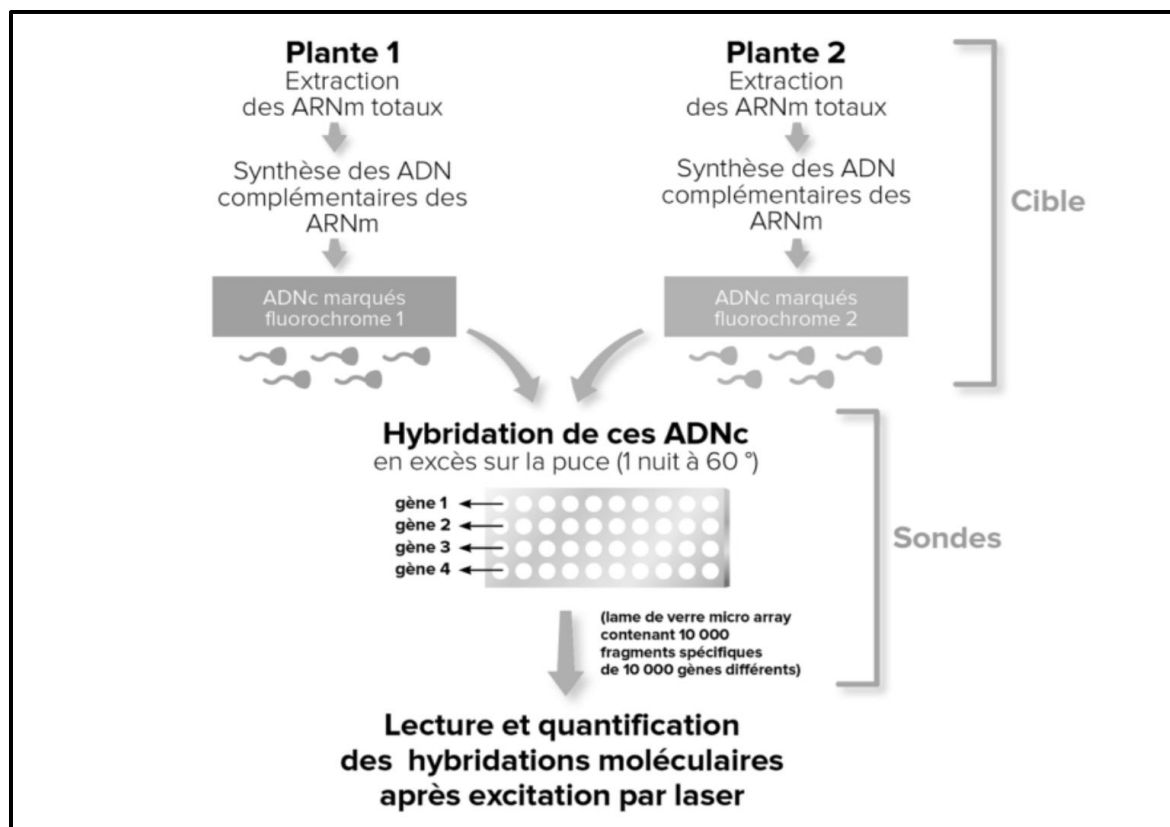


Figure 08: principe de la puce à ADN

## I.7. Le séquençage des gènes

Le séquençage des gènes consiste à déterminer la séquence des nucléotides qui les constituent. C'est une étape majeure dans la connaissance du génome.

Le fragment d'ADN à séquencer doit être disponible en grande quantité (clonage ou PCR) et les deux brins doivent être séparés. Ces brins sont placés en présence d'amorces qui s'hybrident avec une des extrémités et qui permettront d'initier la synthèse du brin complémentaire, Il n'existe aucune méthode directe de détermination de la séquence des nucléotides, mais aujourd'hui de nombreuses manipulations nécessaires au séquençage. La méthode la plus pratiquée aujourd'hui dans les laboratoires a été mise au point par Fred Sanger.

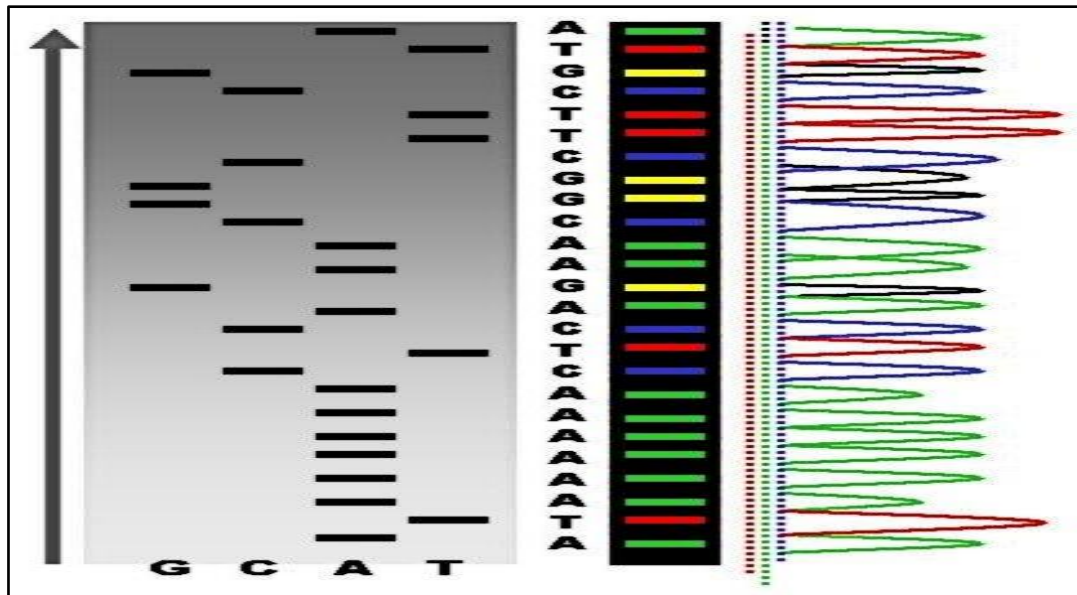


Figure 09: interprétation du séquenceur automatique

## I.8. Les marqueurs moléculaires

### I.8. 1. Introduction

La notion de marqueur génétique a été introduite en 1980. Ces marqueurs moléculaires, ils signalent la présence de séquence conférant tel ou tel caractère phénotypique. Ils sont donc utilisés pour décrire, identifier, distinguer et tracer une variété végétale.

Ces marqueurs moléculaires sont donc des indicateurs neutres de variabilité génétique.

Le marqueur est utilisé pour "baliser" le génome, ils peuvent établir des relations de parenté entre individus. En outre, le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN. Les marqueurs moléculaires sont et sont essentiels pour la sélection assistée par marqueurs. Ils sont présents dans toutes les cellules d'un organisme et révélés par les techniques de biologie moléculaires..

Les marqueurs moléculaires permettent le cumul rapidement de plusieurs gènes dans une seule variété élite.

### I.8. 2. Définition d'un marqueur moléculaire

Les marqueurs moléculaires correspondent à des séquences ADN codantes ou non, ou à sa représentation moléculaire (ARN, protéine ils sont partagé par tous les êtres vivants individus. Au sein du génome d'une plante, de telles séquences génétiques, sont statistiquement liées à un caractère phénotypique particulier de la plante

#### I.8.2. 1. Les caractéristiques d'un bon marqueur moléculaire

Un marqueur génétique idéal doit être :

**a**-polymorphe,

**b**- relativement « neutre » :

**c**- codominants:

**d**- un caractère mendélien à hérédité simple.

**e**- dispersé le long du génome.

**f**- ne pas être lié à un autre marqueur, être stable, quel que soit le stade du développement

**g**-ne pas avoir d'impact sur la croissance ou la reproduction sexuée, être facilement observable, sans ambiguïté possible, être peu coûteux.

**h**-non épistatique :

### **I.8.3. Les avantages de l'utilisation des marqueurs moléculaires**

Dans la sélection assistée par les marqueurs moléculaires, ces marqueurs facilitent grandement le processus

- **Gain de temps** : Réduction du temps de développement des nouvelles variétés les marqueurs permettent une analyse rapide et hautement précise du matériel génétique.

-**Connaissance approfondie** : les marqueurs aident à comprendre les relations entre les individus et à étudier les mécanismes génétiques.

-**Sélection assistée par marqueurs** : les marqueurs facilitent la sélection des caractères souhaités dans des populations des plantes.

-**Optimisation des ressources** : les marqueurs permettent d'économiser du temps, de l'argent et des ressources matérielles.

Ces atouts font des marqueurs génétiques une composante essentielle pour faire progresser la recherche en génétique du développement.

Concernant la tolérance à la sécheresse une étude sur le riz a découvert un marqueur lié à ce gène d'intérêt et en utilisant ce marqueur, les chercheurs ont pu développer plus rapidement une variété de riz plus résistante aux conditions arides.

### **I.9. Le génotypage**

La technique de génotypage permet d'identifier et d'analyser les variations génétiques au sein de l'ADN d'un individu, d'une espèce ou d'une population pour déterminer quels marqueurs sont présents dans un organisme.

Le génotypage peut impliquer plusieurs méthodes comme la réaction en chaîne par polymérase (PCR), les puces à ADN ou le séquençage, il permet également d'identifier des différences dans la séquence de l'ADN, comme les polymorphismes mononucléaires (SNP) ou les microsatellites

Après le génotypage terminé, on peut utiliser l'information pour sélectionner les meilleurs individus. Cette sélection est guidée par les données des marqueurs, réduisant ainsi le besoin d'observer des générations successives pour leurs caractéristiques visibles.

Il faut noter cependant que les tests de génotypage peuvent être coûteux, mais les bénéfices à long terme dépassent souvent ces investissements lorsque l'on considère l'amélioration génétique obtenue.

Il existe plus d'une dizaine de techniques de marquage génétique. Cinq techniques sont largement répandues ou prometteuses sont abordées :

- a) les iso enzymes,
- b) les RFLP (restriction fragment length polymorphism)
- c) les RAPD (random amplified polymorphic DNA)
- d) les AFLP (amplified fragment length polymorphism)
- e) les microsatellites

### **I.9.1. Applications du génotypage**

**A- Recherche médicale:** Identifier des variations génétiques associées à des maladies ou à des réponses à des traitements.

**B-Identification:** Reconnaître des individus ou des souches microbiennes.

**C-Biodiversité:** Étudier la diversité génétique au sein des espèces et comprendre leur évolution.

**D-Traçabilité:** Caractériser et suivre des micro-organismes, par exemple dans le cadre de la santé publique ou de l'agroalimentaire

### **I.9.2. Les outils du génotypage: RFLP, RADP, SSR, AFLP et SNP**

Le marquage moléculaire regroupe un ensemble de techniques qui révèlent les différences de séquences d'ADN (acide désoxyribonucléique) entre les individus. Les marqueurs moléculaires, RAPD, SSR et AFLP sont basés sur la PCR et permettent de lire l'ADN à travers son amplification.

Aujourd'hui plusieurs techniques de marquage moléculaire sont disponibles et ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories :

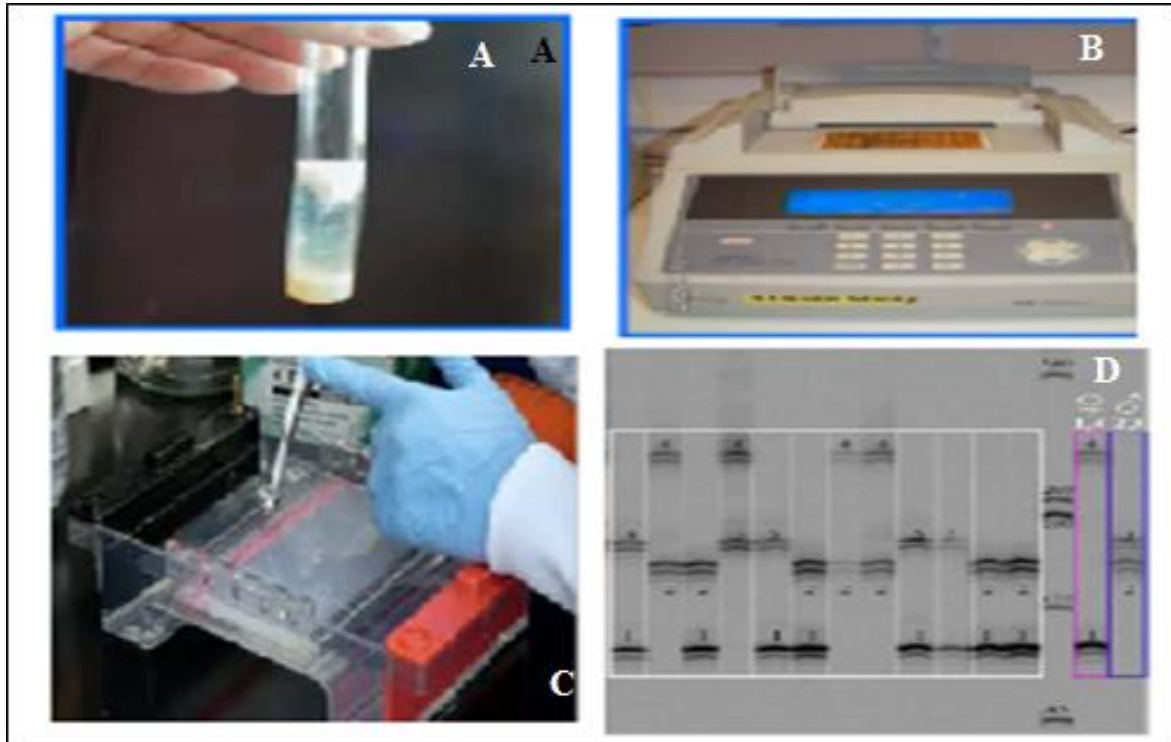
**A-** Les marqueurs de type RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

**B-** les marqueurs basés sur la méthode de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Le choix du système de marquage dépend de l'objectif précis fixé, des moyens et des compétences disponibles au laboratoire.

Les marqueurs basés sur la technique PCR tendent à remplacer les marqueurs morphologiques, iso-enzymatique et RFLP et deviennent très nombreux.

dans le cadre de l'étude des populations et des pathologies, l'identification et le génotypage sont essentiels à la découverte de variations génétiques.



**Figure 10:** Etapes du génotypage, **A** : extraction de l'ADN, **B** : amplification PCR, **C**:électrophorese, **D** : lecture/interprétation

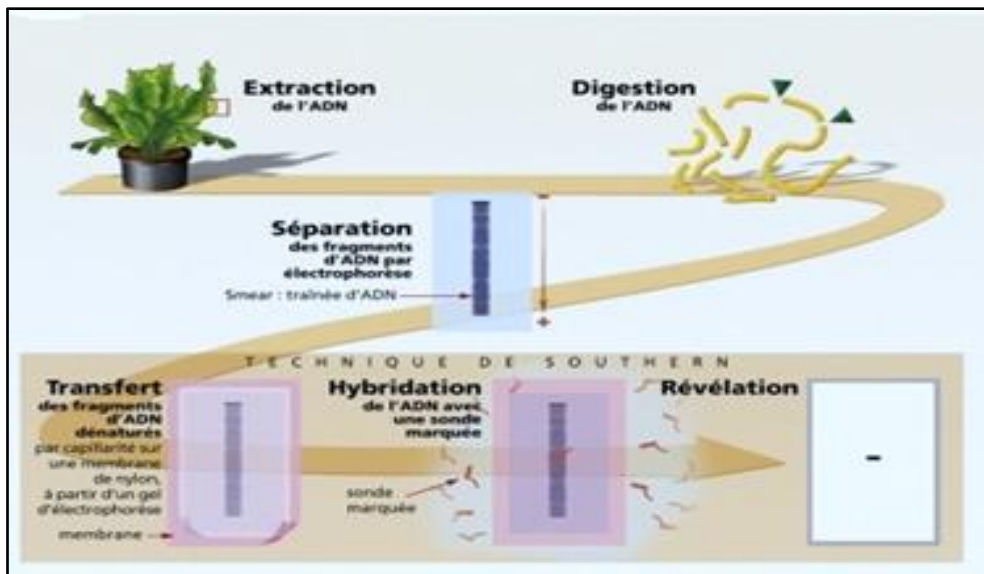
### I.9.2.1. Le génotypage RFLP

Les marqueurs RFLP combinent l'utilisation d'enzymes de restriction et de sondes génétiques et permet de révéler des mutations présentes au niveau de l'ADN.

#### Le principe du RFLP

Le principe du RFLP consiste à soumettre l'ADN d'un individu à l'action d'enzymes de restriction qui coupent l'ADN à des sites de restriction très précis. Les fragments de restriction de tailles variables sont séparés sur gel d'agarose et transférés par capillarité sous forme dénaturée sur une membrane de nylon.

Tout changement de la séquence du site de restriction, l'enzyme ne le reconnaît pas et elle ira couper le site suivant. Donc, le polymorphisme observé entre deux individus est basé sur la différence qui existe dans la longueur des fragments obtenus après la digestion enzymatique.



**Figure 11:** Technique RFLP

Dans la technique RFLP les enzymes de restriction coupent l'ADN en des sites spécifiques

La technique RFLP implique les manipulations suivantes :

1. Extraction et purification de l'ADN génomique en quantité assez importante
2. L'ADN génomique est soumis à une digestion par une enzyme de restriction.
3. Séparation des fragments de restriction par une électrophorèse en gel.
4. L'ADN est ensuite transféré du gel sur une membrane de nylon (transfert de southern blot).
5. L'hybridation moléculaire avec une sonde d'ADN marquée soit par la radioactivité, soit chimiquement. La sonde va alors s'hybrider avec le ou les fragments de l'ADN avec lesquels elle présente des homologies.

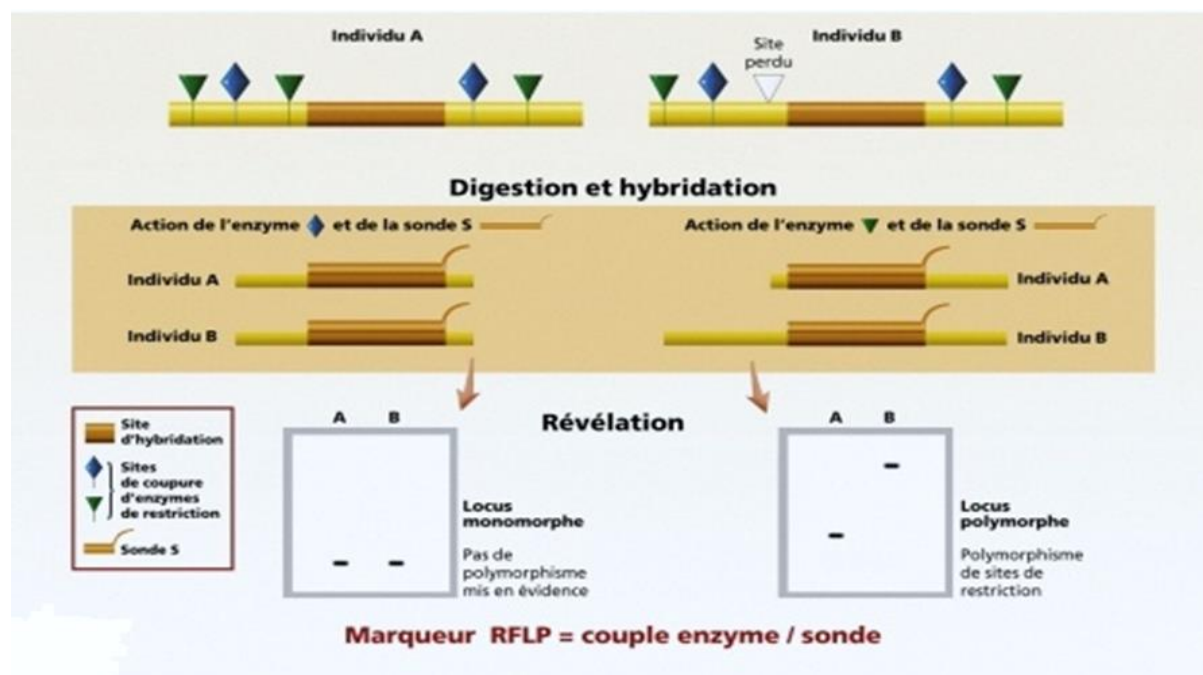
La membrane est un support solide qui peut être soumis à plusieurs cycles d'hybridation/déshybridation. Elle peut donc être utilisée avec plusieurs sondes successivement (jusqu'à une dizaine).

La technique RFLP demande des compétences en biologie moléculaire ainsi qu'une organisation et des matériels de laboratoire adaptés. Il est très difficile d'automatiser les différentes étapes de cette technique.

La reproductibilité des résultats dépend du soin apporté à la préparation des ADN, afin d'exclure tout risque de digestion partielle par les enzymes de restriction.

En fonction des sondes utilisées, les marqueurs peuvent provenir de tout le génome, nucléaire ou cytoplasmique, codant ou non. Ils sont donc en nombre quasi illimité, locus-spécifiques et codominants.

Les RFLP sont dits codominants parce qu'ils distinguent entre les organismes hétérozygotes et homozygotes. Un organisme hétérozygote à un locus (Aa) présentera deux fragments de tailles différentes alors qu'un seul fragment ne sera visible pour organisme homozygote (AA ou aa). Bien que cette technique soit co-dominante et permet une analyse génétique complète, elle est lente et laborieuse. Les étapes de transfert et d'hybridation empêchent une automatisation du travail.



**Figure 12:** les marqueurs RFLP

Ils permettent de marquer toutes les régions du génome, nucléaire ou cytoplasmique, les régions codantes ou non codantes. Ils présentent un bon potentiel de transfert entre espèces, même assez éloignées, grâce à certaines sondes de séquences très conservées.

### I.9.2.2. Le génotypage RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Chez plusieurs espèces, les marqueurs RAPD ont été utilisés pour l'analyse de la diversité génétique, la caractérisation de ressources génétiques et la cartographie des génomes

La technique RAPD est rapide et d'une faible technicité car elle ne nécessite pas de digestion par une enzyme de restriction, pas de transfert sur une membrane pas de préparation de sonde radioactive. Toutefois, sa reproductibilité est difficile à obtenir.

#### **Le principe de Technique RAPD**

Cette technique permet de réaliser une réaction PCR sur l'ADN de l'individu étudié en utilisant une amorce courte, de 10 nucléotides en général, de séquence arbitraire. L'amorce va

s'hybrider chaque fois que se trouvera dans l'ADN une séquence qui lui est complémentaire (ou comportant un nombre limité de mésappariements).

Les produits d'amplification obtenus en RAPD, dont le nombre dépasse rarement la dizaine, sont en général séparés par électrophorèse en gel d'agarose. Dans la majorité des cas, le polymorphisme révélé par la technique RAPD est de type présence/absence.

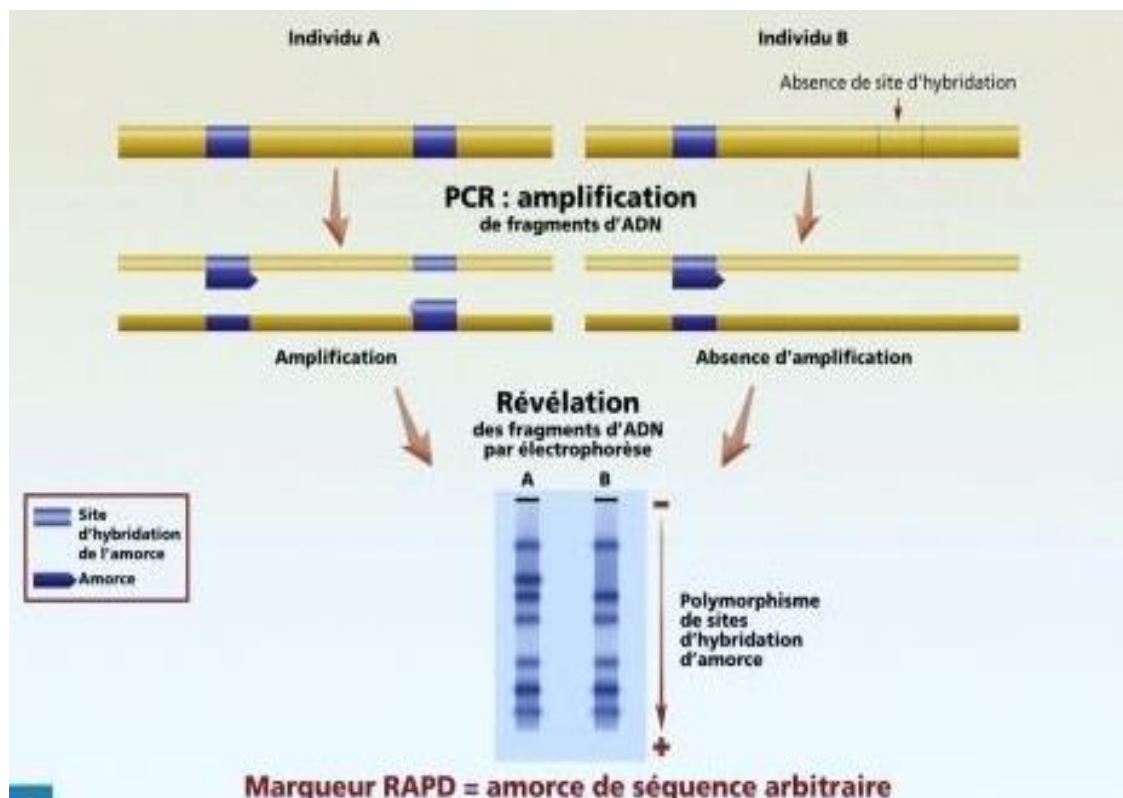


Figure 13 : marqueur RAPD

Lors d'analyses de populations en ségrégation, il est cependant possible de repérer des bandes d'amplification allèles qui diffèrent par leur taille. Les marqueurs ainsi générés sont donc codominants. On peut considérer que 10 à 15 % des marqueurs RAPD sont codominants.

Dans certaines conditions la cartographie des marqueurs RAPD montre que certaines bandes sont présentes dans les génotypes de la descendance mais absentes chez les plantes parentales. Il faut noter également que les marqueurs RAPD ne ciblent pas une séquence donnée donc ils, doivent être prudemment transférés vers une autre espèce végétale différente de celle où ils ont été établis. Les marqueurs sont caractérisés par une taille de fragment, ce qui n'implique en aucun cas l'homologie de séquence des fragments amplifiés de même taille qui sont observés chez des individus différents.

**I.9.2.3. Le génotypage microsatellites SSR (simple séquence repeat)**

Les microsatellites sont des éléments répétitifs d'ADN à différents endroits (séquences de di-, tri- ou tétra- nucléotides répétés en tandem) chez tous les organismes vivants eucaryotes et procaryotes.

Les microsatellites sont repartis de façon uniforme sur l'ensemble du génome de l'organisme vivant. Les microsatellites sont de bons marqueurs moléculaires codominants (absence de dominance) et multi-alléliques, possèdent un polymorphisme élevé, sont transférables, on les rencontre d'une manière très abondante dans les génomes des eucaryotes (organismes possédant un véritable noyau). Ces marqueurs moléculaires sont impliqués dans la variabilité intra et inter-population à cause de leur polymorphisme élevé.

La technique PCR qui révèle que le polymorphisme de ces marqueurs moléculaires est plus élevé à celui des marqueurs RFLP et SNP.

Pour que ces marqueurs puissent être des repères ou bien balise du génome et sans aucune ambiguïté, ils doivent être entourés par une paire d'amorces spécifiques des bordures droite et gauche d'un microsatellite est utilisée pour amplifier le même microsatellite chez différents individus.

L'électrophorèse en gel d'acrylamide ou d'agarose à haute résolution permet de révéler le polymorphisme de longueur. Le développement des marqueurs microsatellites, c'est-à-dire la définition des amorces bordantes spécifiques, est un travail assez lourd. Selon les protocoles classiques, il faut réaliser une banque génomique et la cribler afin d'y repérer les clones qui portent des motifs microsatellites.

Et par la suite ces clones sont séquencés, des amorces sont définies à partir de leur séquence et les conditions d'amplification et de révélation du polymorphisme sont mises au point. Des programmes importants de génétique fondés sur les microsatellites (génomes humains, animaux et végétaux) montrent que, pour un à deux microsatellites utilisables, cinq auront dû être séquencés.

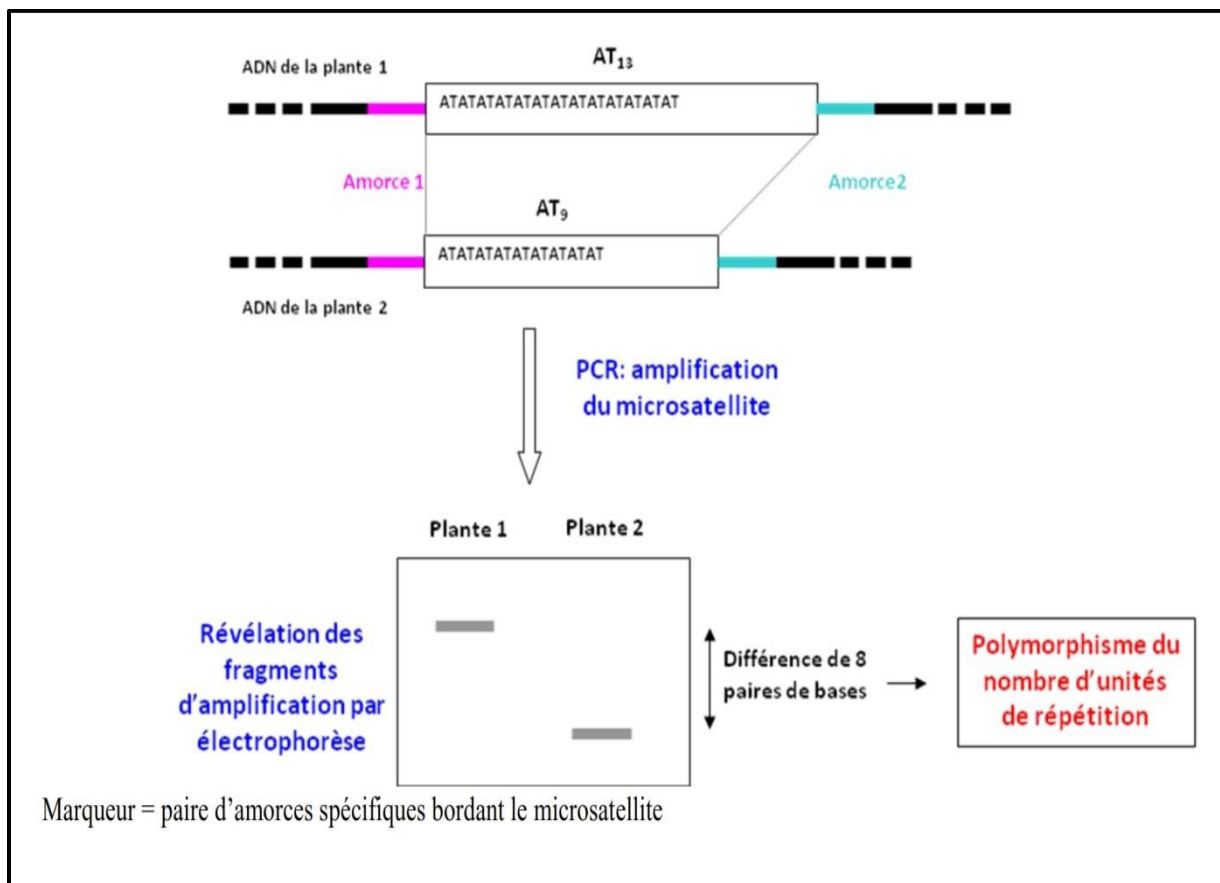
Les protocoles de visualisation peuvent être en partie automatisés.

Outre leur distribution sur l'ensemble du génome, l'intérêt en génétique des microsatellites réside dans leur polymorphisme extrêmement élevé.

Le polymorphisme concerne le nombre des unités de répétition qui constitue la séquence microsatellite. Celui-ci varie vraisemblablement surtout à cause des erreurs commises par la polymérase lors de la réplication. La séquence microsatellite est, de plus, soumise aux mécanismes d'évolution rapides des séquences répétées en tandem.

Il est parfois possible de repérer des séquences qui portent des motifs microsatellites simplement en interrogeant les bases de données qui compilent les séquences d'ADN publiées. Pour chaque plante, 1 à 5 % en moyenne des séquences disponibles de gènes ou d'ADNc contiennent des microsatellites. Ceux-ci sont presque exclusivement localisés dans les régions non codantes : introns, séquences amont du codon start (ou codon d'initiation) ou région 3' non traduite. Le transfert des marqueurs microsatellites à des espèces proches du même genre a été réalisé chez des plantes annuelles ou des arbres forestiers.

À l'intérieur d'un groupe d'espèces très proches, les zones bordantes des microsatellites sont assez conservées, ce qui permet de transférer les amorces d'amplification. Le passage à des espèces d'autres genres de la même famille montre un succès réduit dans l'obtention d'amplification de microsatellites et de leur polymorphisme. La conservation de ces séquences disparaît rapidement avec l'éloignement génétique des taxons.



**Figure 14:** Illustration schématique du principe de la technique SSR.

### I.9.2.4. Le génotypage AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La technique AFLP est fondée sur la mise en évidence conjointe de polymorphisme de site de restriction et d'hybridation d'amorces arbitraires.

L'ADN génomique purifié est soumis à l'action de deux enzymes de restriction (généralement *EcoRI* et *MseI*) qui possèdent des sites de reconnaissance de 6 et 4 nucléotides..

Des adaptateurs de séquence connue de 10 à 15 bases, adaptés aux extrémités cohésives des sites de restriction, sont ajoutés aux extrémités des fragments d'ADN par une réaction de ligation. Une première amplification, dite pré sélective, amplifie les fragments d'ADN à l'aide d'amorces correspondant à la séquence des adaptateurs et du site de restriction additionné en 3' d'une base définie arbitrairement.

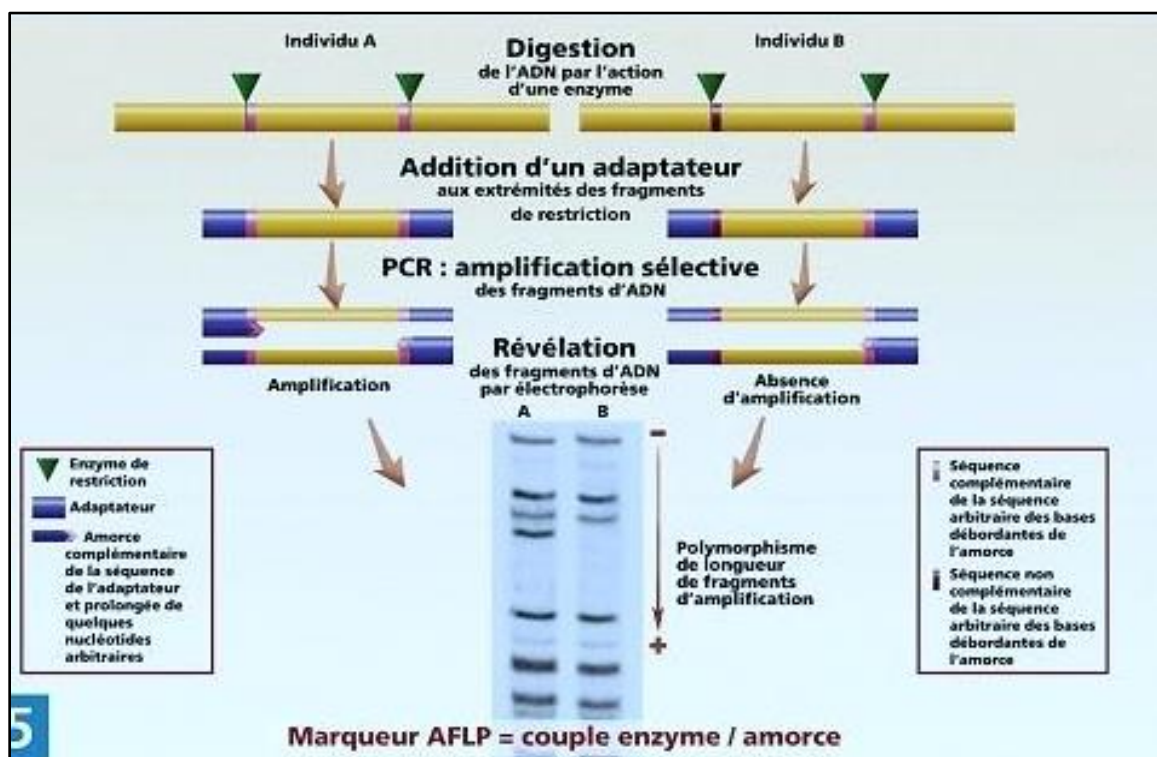


Figure 15: les marqueurs AFLP

La technique AFLP nécessite plus de technicité que la technique RAPD mais génère plus de marqueurs, plus polymorphes et avec plus de fiabilité. Beaucoup d'études de diversité ou de cartographie utilisent désormais le procédé AFLP. Plusieurs techniques de génotypage dérivent de la technique AFLP. L'une des techniques de génotypage qui dérive de la technique AFLP est la technique la S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism), qui se focalise sur le polymorphisme au niveau des gènes.

La technique SAMPL (Sélective Amplification of Microsatellite Polymorphie Loci) associe des séquences microsatellites à une amorce AFLP. L'usage de ce type de marqueurs semi-

aléatoires devrait se généraliser. Il existe d'autres techniques de marquage moléculaire MAAP (ASAP, EPIC, ISTR, RAHM, RAMP, RAMPO, TecMAAP).

Cependant, parmi les limites des marqueurs AFLP est que sont techniquement difficiles et coûteux. D'autre part, les AFLP sont notés comme marqueurs dominants, ce qui a réduit leur contenu informatif, car ils ne permettent pas de faire la distinction entre les individus hétérozygotes et homozygotes.

### **I.9.2.5. Génotypage SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)**

Cette technique repose sur la variation d'une seule paire de nucléotide à une position donnée. Les SNP sont des marqueurs moléculaires qui permettent d'identifier des génotypes (reconnaître des personnes, par exemple), à partir d'échantillons de matière organique, ou permettant de contribuer à la construction d'arbres généalogiques d'êtres vivants ou d'espèces, ce type de génotypage s'appuie sur le polymorphisme des microsatellites présents dans le génome. Les SNP sont des variations naturelles qui ne concernent qu'un seul nucléotide dans une séquence donnée.

Comparés aux autres marqueurs moléculaires, les marqueurs SNP présentent l'avantage d'une répartition homogène dans tout le génome et d'être excessivement nombreux. Ce nombre élevé permet donc potentiellement la création de cartes génétiques à très haute densité.

L'accumulation récente des données de génomes complétement séquencés, de séquences génomiques ainsi que de séquences codantes (EST) a permis de développer des marqueurs SNP chez plusieurs génomes végétaux comme le maïs et le blé .

Ils ont jusqu'à présent généralement été détectés en tant que marqueurs dominants et utilisés pour la construction des cartes génétiques et physiques ainsi que pour étudier la phylogénie, la diversité génétique et le déséquilibre de liaison (LD).

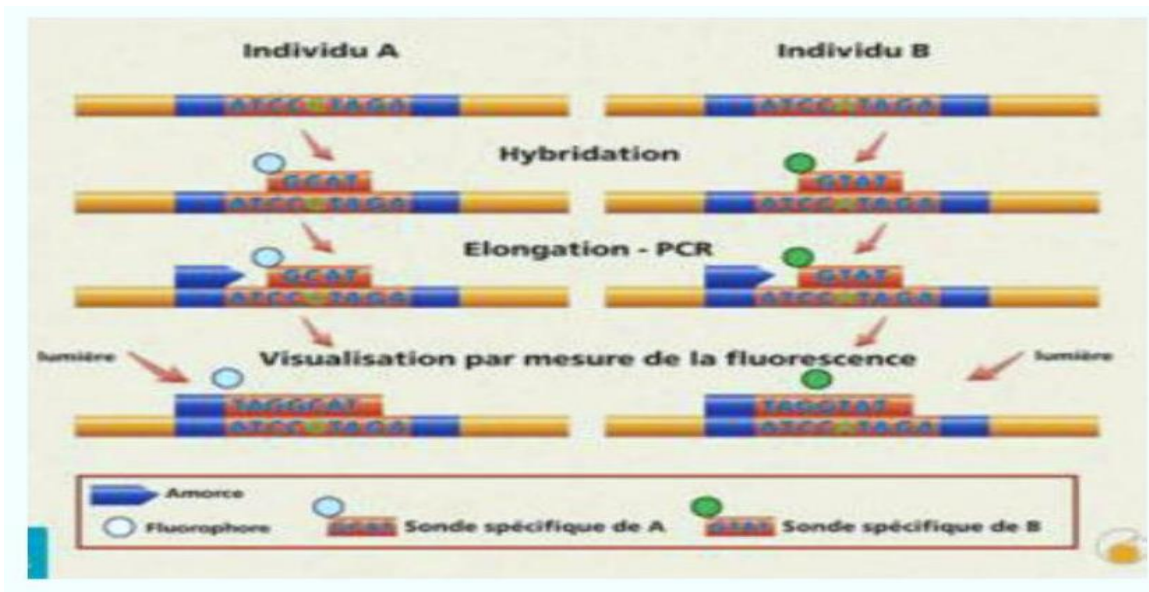


Figure 16 : Les marqueurs SNP

**En résumé**, les marqueurs RFLP et microsatellites sont spécifiques de locus, codominants et sont utilisés généralement pour la cartographie et la détection de QTL.

Par contre les marqueurs RAPD et AFLP sont dominants, non spécifiques de locus et servent essentiellement à la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène d'intérêt en vue de son clonage. La comparaison des principales techniques de marquage moléculaire et la comparaison entre différents types son illustrées dans le tableau 02 et tableau 03.

Tableau 02: Les principales techniques de marquage moléculaire

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

**Tableau 03:** Comparaison entre différents types des marqueurs RFLP, AFLP et SSR

(Daniel *et al.*, 2006 ; De vienne, 1999).

Marqueur	avantage	inconvénients
<b>RFLP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La RFLP est une méthode fiable et facilement transférable entre laboratoire.</li> <li>-Il s'agit d'un marqueur codominant.</li> <li>-Aucune information sur la séquence n'est requise.</li> <li>-Elle est utilisable pour faire des cartes génétiques de liaisons.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La RFLP nécessite une grande quantité d'ADN.</li> <li>-Elle n'est pas automatisable, vue es étapes de transfert et d'hybridation.</li> <li>-Certaines espèces possèdent un taux peu élevé de polymorphisme.</li> <li>-Un faible nombre de locus sont détectés par expérience.</li> </ul>
<b>RAPD</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-L'AFLP permet un survol rapide de l'ensemble du polymorphisme du génome.</li> <li>-Elle est hautement reproductible.</li> <li>-Il n'y a pas besoin de connaître une séquence et de créer des sondes spécifiques.</li> <li>-Elle permet la création facile et rapide de cartes génétiques.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La génération d'une grande quantité d'information.</li> <li>-nécessite une analyse automatisée et la technologie informatique.</li> <li>-Ce sont des marqueurs dominants.</li> <li>- Les marqueurs AFLP sont souvent localisés aux centromères et aux télomères.</li> </ul>
<b>SSR</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Les microsatellites sont des marqueurs codominant.</li> <li>-Ils sont très largement utilisés.</li> <li>-Ils y a une grande fréquence de SSR dans le génome.</li> <li>-Les microsatellites sont bien répartis à travers tout le génome.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-La préparation des microsatellites est assez lourde car il faut « cribler une banque génomique enrichie avec une sonde du microsatellite, séquencer les clones positifs, synthétiser les amorces oligonucléotidiques et tester les paires d'amorces dans un échantillon d'individus ».</li> </ul>

## I.10. Principes d'identification et d'application des marqueurs moléculaires

### I.10. 1.Le principe d'identification des marqueurs moléculaires

Le principe d'identification des marqueurs moléculaires se repose sur l'analyse des variations de l'ADN (le polymorphisme) pour identifier des individus ou des espèces. En comparant les empreintes génétiques (ou "empreintes ADN") d'échantillons inconnus avec des références connues, il est possible de vérifier leur identité, de suivre la transmission de gènes, ou de distinguer des variétés.

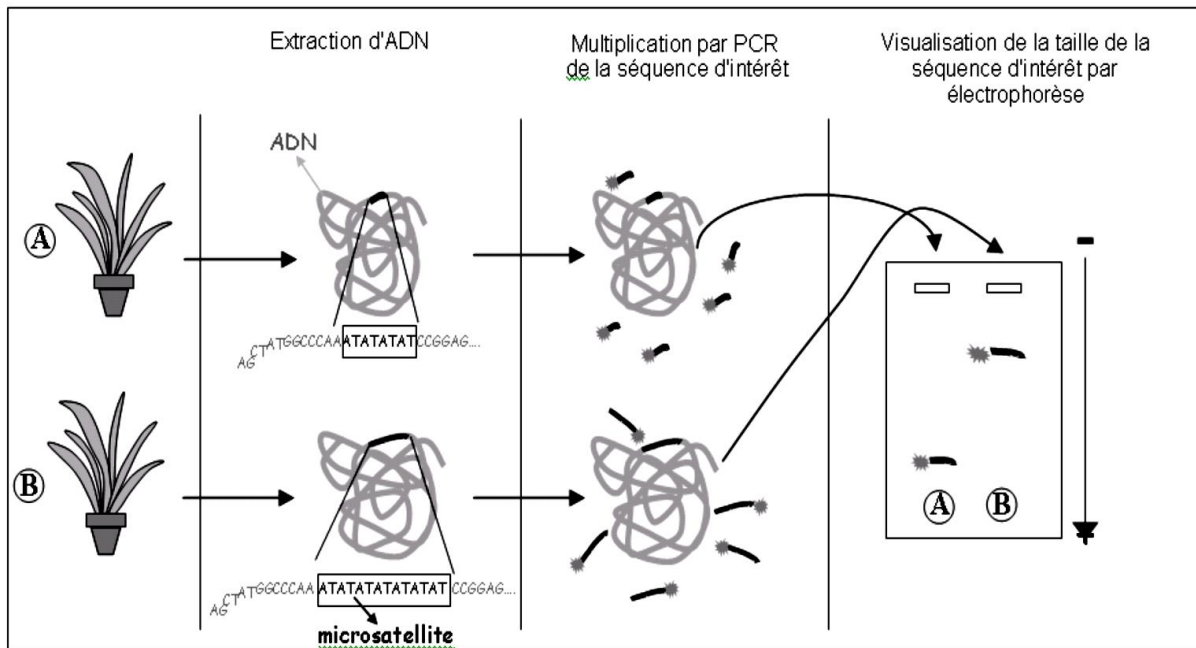
La première étape est d'identifier les marqueurs liés aux traits d'intérêt, leur présence ou leur absence indique la probabilité qu'un individu possède un trait particulier. Par exemple, pour sélectionner des tomates résistantes à un pathogène spécifique, les chercheurs doivent chercher les marqueurs associés à la résistance.

La détection d'un marqueur génétique utilise des techniques de génie génétique pour détecter des séquences d'ADN spécifiques, exemple la PCR et l'électrophorèse permettent de séparer et visualiser ces fragments afin d'établir un profil unique et même il peut s'effectuer par hybridation avec une sonde complémentaire, ou par son expression phénotypique.

**Principe RFLP:** Utilise des enzymes de restriction pour couper l'ADN en fragments de longueurs variables en fonction des différences de séquence entre les individus.

**Principe RAPD:** Amplification aléatoire de plusieurs régions du génome à l'aide d'amorces courtes et aléatoires.

**Principe SSR:** Analyse des variations du nombre de répétitions d'une courte séquence d'ADN (motif de 1 à 6 paires de bases).



**Figure 17 :** Principe d'utilisation d'un marqueur moléculaire de type microsatellite en identification variétale

## I.11.Utilisations des marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires sont utilisés pour cartographier les génomes, le diagnostic de maladies, l'amélioration des plantes et la médecine légale. Ils permettent de sélectionner des caractères désirés en sélectionnant les individus possédant les marqueurs correspondants, d'étudier les relations de parenté et la diversité génétique, et d'identifier et d'authentifier des produits.

Les marqueurs sont utilisés pour décrire la variabilité génétique et sa répartition au sein de populations et d'espèces, ils servent aussi à préciser les mécanismes évolutifs des populations qui rendent compte de cette description. Le choix des marqueurs dépend de l'objectif précis fixé et des moyens des utilisateurs

### I.11.1.Description de la variabilité génétique

Chaque individu d'une espèce donnée peut être identifié rigoureusement par une empreinte génétique. Pour établir une empreinte génétique, une analyse du polymorphisme de l'ADN est

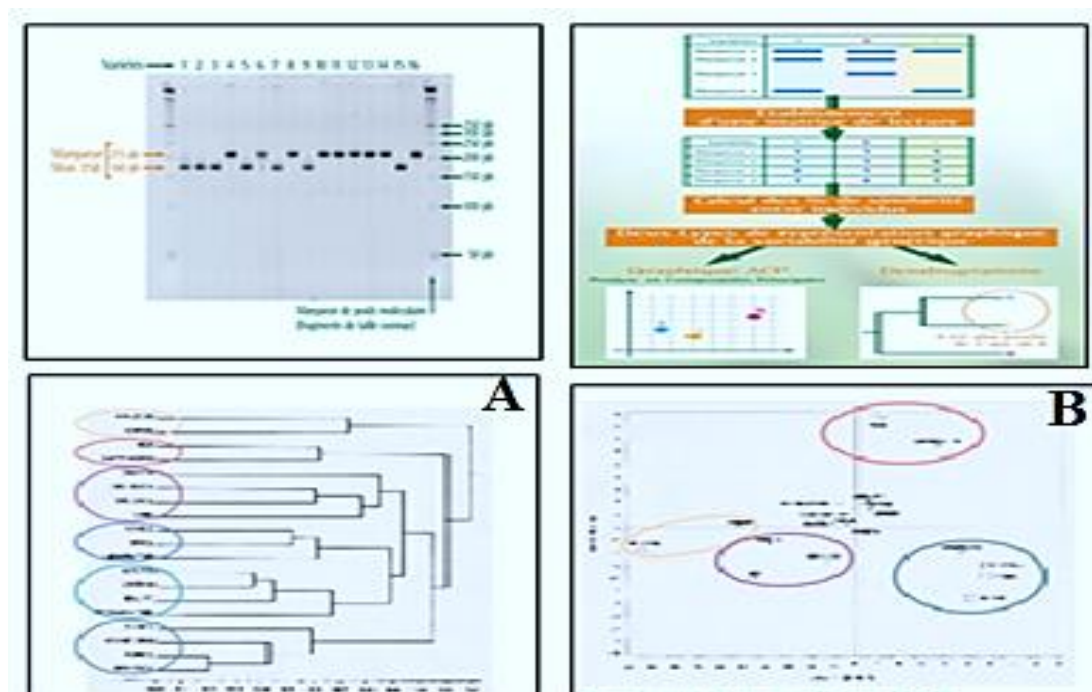
conduite avec un ensemble de marqueurs moléculaires (quelques dizaines à quelques centaines). Le profil de chaque individu est observé pour chacun des marqueurs analysés. C'est la combinaison de ces données qui constitue l'empreinte génétique.

La comparaison des empreintes génétiques au sein de populations ou groupes d'individus permettra une caractérisation plus poussée de la variabilité génétique, et fournira une meilleure connaissance des relations de parenté entre individus.

### I.11.2. Caractérisation et structuration de la variabilité génétique

L'empreinte génétique permet au sélectionneur d'optimiser les décisions stratégiques en ce qui concerne la gestion des ressources génétiques :

- a) Le choix des lignées parentales pour la création d'hybrides ou de populations à sélectionner, le sélectionneur privilégie le croisement entre deux parents complémentaires et suffisamment éloignés pour la production d'hybrides performants
- b) La constitution de la collection variétale assurant la conservation des ressources génétiques à long terme.



**Figure 18 :** (A) représentation graphique (dendrogramme) ; (B) représentation graphique (APC)

### I.11.3. Phylogénie

Les relations de proximité entre différentes espèces ou populations sont abordées de deux façons différentes.

a) **la phénétique** est fondée sur les distances génétiques entre les unités taxonomiques et aboutit à la construction de dendrogrammes.

b) **la cladistique** est fondée sur l'identification des mutations successives et repose sur le principe de parcimonie qui minimise le nombre d'événements pour décrire un arbre phylogénétique.

Pour retracer de façon correcte l'évolution des taxons, les marqueurs utilisés doivent être neutres, plus les taxons ne sont proches génétiquement, plus les marqueurs utilisés doivent avoir un taux de mutation élevé pour révéler suffisamment de polymorphisme exploitable. Les relations entre les taxons sont fondées sur leur divergence qui est croissance au cours du temps. Dans le cas de la phénétique, tout marqueur adapté à la construction d'une matrice de distances entre les unités taxonomiques analysées est utilisable pour la construction des dendrogrammes.

Les marqueurs RFLP permettent de calculer des distances génétiques assez fiables entre groupes d'individus et sont largement utilisés pour la construction des dendrogrammes. Les marqueurs RFLP fournissent des distances peu sensibles aux effets d'un locus particulier. Les marqueurs PCR spécifiques, STS et SCAR sont également préconisés. Les marqueurs microsatellites sont mal adaptés à cause de leur fort taux de mutation et de la possibilité des mutations réverses .

Les dendrogrammes construits avec différents types de marqueurs montrent parfois des regroupements différents. Les marqueurs préconisés par **Karp *et al.* (1997)**, sont les marqueurs RFLP et PCR-RFLP pour lesquels les sites de restriction sont cartographiés de façon à individualiser chaque mutation. Les marqueurs STS et SCAR sont également utilisables si leur polymorphisme est révélé par RFLP et que les sites de restriction sont cartographiés. La mise en évidence du polymorphisme par SSCP ou D/TGGE n'est applicable que pour la phénétique.

Les rétro transposons (marqueurs S-SAP) apporte l'information qui est utilisable pour des constructions de phylogénie du fait de l'accumulation progressive des éléments transposables au cours de l'évolution. Par mutation ces éléments intégrés peuvent évoluer mais ne sont pas éliminés. Ces marqueurs fournissent non une phylogénie chronologique, car l'activité des éléments transposables n'est pas homogène dans le temps, mais une phylogénie ordonnée.

#### **I.11.4. Analyse de la diversité génétique**

##### **I.11.4. 1. Phylogéographie**

La diversité géographique et les relations phylogénétiques des populations sont analysés simultanément par la phytogéographie. Comme pour la construction d'arbres phylogénétiques,

la succession des mutations conduisant aux allèles observés doit pouvoir être retracée. De façon générale les marqueurs RFLP, PCR-RFLP, mrEPIC et cpPCR-RFLP sont adaptés à ces études. Des études conduites sur les arbres forestiers dans ce domaine ont exploité le polymorphisme du génome chloroplastique avec des marqueurs cpPCR-RFLP. Les données paléontologiques, lorsqu'elles existent, apportent un éclairage complémentaire sur l'évolution et les migrations passées des espèces étudiées.

#### **I.11.4. 2. Structure et différenciation**

La variabilité génétique peut être mesurée à l'échelle de la sous-population et de la population totale. La distribution des génotypes dans une sous-population est liée à sa sensibilité à la dérive génétique et à son mode de reproduction. Au niveau de la population totale, ce sont les flux de gènes entre unités qui déterminent l'essentiel de leur niveau de différenciation. Par référence, la structure d'une sous population est analysée à la situation attendue dans une population panmitique (équilibre de Hardy-Weinberg).

Pour rester d'éventuels écarts à cet équilibre, le génotype de tous les individus doit pouvoir être caractérisé aux locus analysés. Seuls les marqueurs codominants sont pertinents. En général, les marqueurs dominants ne sont utilisables que dans des espèces à fort taux de fixation, où les individus hétérozygotes sont presque inexistantes, ou dans des populations donc l'écart à l'équilibre de HardyWeinberg peut être connu de préférence pour les marqueurs analysés.

#### **I.11.4. 3. Flux de gènes, recherche de parenté et introgression**

Les régimes de reproduction et l'estimation du taux d'allo fécondation dans le cas des modèles mixtes décrivent les flux de gènes au niveau d'une sous-population .

L'hybridation entre espèces sympatriques est une source de flux de gènes et éventuellement d'introgression entre espèces. Les outils les plus appropriés ne sont pas les mêmes dans les différents cas. Les taux d'allo fécondation ou d'autofécondation sont correctement estimés à partir des génotypes notés à une dizaine de locus polymorphes, neutres et indépendants. Ces locus sont de préférence codominants.

Des marqueurs cartographiés comme des RFLP, des STS et des microsatellites sont donc intéressants. La recherche de paternité permet de retrouver les sources de pollen et de décrire le flux de pollen effectif. Les marqueurs utilisés doivent être codominants et posséder de nombreuses formes alléliques pour différencier un maximum d'individus.

Les locus microsatellites sont ceux qui ont le plus fort pouvoir d'exclusion grâce au nombre élevé d'allèles par locus. Chez les espèces à transmission paternelle du génome

chloroplastique et pour la recherche de maternité chez les autres espèces, les marqueurs microsatellites chloroplastiques (cpSSR) présentent aussi un intérêt pour la recherche de paternité.

Les techniques d'empreintes génétiques fournissent de nombreux marqueurs dominants dont l'analyse simultanée permet également de mener des recherches de paternité.

#### **I.11.4.4. Identification**

Chez l'orge, l'efficacité des marqueurs AFLP, RAPD, RFLP et microsatellites pour caractériser les variétés a été comparée. L'identification de clones ou de lignées peut être menée avec les différences techniques d'empreinte génétique bien reproductibles et qui fournissent de nombreux marqueurs sur un seul gel : AFLP, RAPD, 5-SAP, ISSR. L'identification de 18 populations de maïs a été conduite à l'aide de marqueurs RFLP grâce à leur nombre d'allèles assez élevé. **Smith et al. (1997)**, utilisent des marqueurs codominants microsatellites pour la caractérisation de variétés de maïs, ces marqueurs se sont avérés plus efficaces que les marqueurs RFLP, tant pour leur reproductibilité. Les marqueurs cytoplasmiques, cpPCRFLP/ SSCP, mtEPIC, dont la variabilité est très structurée géographiquement et/ou dont le polymorphisme caractérise une lignée maternelle, peuvent également servir à identifier des cultivars.

#### **I.11.4.5. Cartographie génétique et applications**

L'établissement des cartes génétiques permettent de représenter la disposition des gènes ou des marqueurs sur un chromosome. Il faut noter cependant que tous les types de marqueurs permettent, potentiellement, de construire des cartes génétiques et établir des associations entre marqueurs et gènes, ainsi de localiser dans le génome, les régions qui sont impliquées dans le déterminisme des caractères quantitatifs (QTL).

La construction de la carte de liaisons génétiques s'appuie sur l'estimation du taux de recombinaison entre tous les locus pris deux à deux et les distances se mesurent en centiMorgans (cM). Quand le taux de recombinaison tend vers zéro, deux marqueurs sont d'autant plus difficilement séparables. Au-delà de 50% de recombinaisons les marqueurs ne sont plus sur le même groupe de liaison (Chromosome).

##### **I.11.4.5. 1. Principe d'établissement de cartes génétiques**

En absence de ségrégation indépendante on dit que les gènes sont « liés ». Des tests statistiques simples permettent de décider si deux marqueurs sont indépendants ou non, ils forment alors un groupe de liaison. Il est ensuite possible d'attribuer chaque groupe de liaison à un chromosome. Lorsque le nombre de marqueurs utilisés est suffisamment élevé, le

nombre de groupes de liaison correspond au nombre de chromosomes. On dit que l'on a saturé le génome

La figure (19), représente une carte génétique de la pomme de terre obtenue à partir de marqueurs RFLP. Les 141 marqueurs RFLP utilisés sont répartis sur les 12 chromosomes de la pomme de terre.

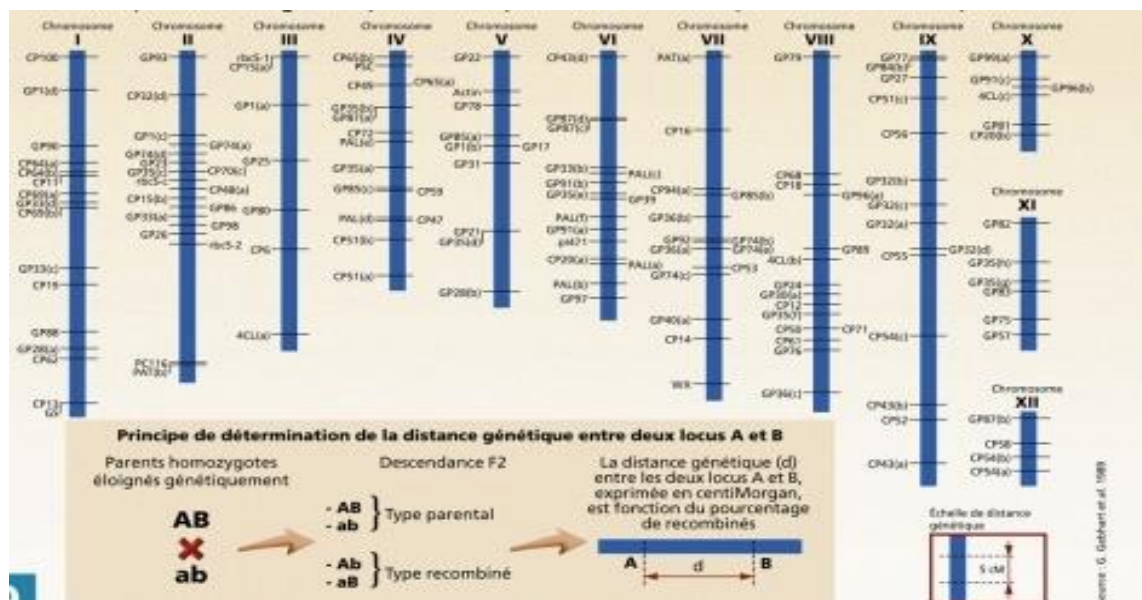


Figure19 : carte génétique de marqueur RFLP chez la pomme de terre

### I.11.4.5. 2. Carte référence, portabilité dans l'espèce

Dans l'établissement des cartes génétiques de référence, tous les marqueurs peuvent être utilisés. La carte doit contenir un maximum de marqueurs et être au moins saturée. La difficulté pour utiliser les informations de la carte de référence en vue d'établir une carte sur une autre population est de retrouver du polymorphisme à chaque locus pour chaque marqueur.

La présence de marqueurs microsatellites, très polymorphes, dans la carte de référence en fait une carte consensus utilisable dans un grand nombre de croisements. Les marqueurs RFLP sont aussi exploitables. L'effort de recherche de polymorphisme peut cependant être important. Intra-espèce, l'homologie et marqueurs est la règle générale. Les marqueurs MAAP ne sont caractérisés que par une longueur de fragment d'amplification, cependant, leur homologie peut être vérifiée, si besoin, par hybridation ou séquençage.

Généralement, à chaque transfert de la carte, seulement une partie des marqueurs de référence montre du polymorphisme et devient utilisable. Les groupes de liaisons risquent

d'être mal définis avec de nombreux marqueurs indépendants. Cette trame de carte génétique doit être alors rapidement complétée avec des marqueurs anonymes propres au croisement analysé(MAAP) très utiles pour saturer une carte génétique.

### **I.11.4.5. 3. Recherche de QTL, gènes candidats**

A cause de la confusion des individus hétérozygotes avec certains individus homozygotes, les marqueurs dominants n'apportent pas une information complète sur l'effet du QTL. Les effets de dominance du QTL (écart à l'additivité) ne peuvent pas être abordés. L'analyse fonctionnelle du génome, menée essentiellement chez les espèces modèles, donne accès à des séquences codantes, de fonction identifiée et intervenant dans divers caractères.

Ces séquences constituent des « gènes candidats » qui peuvent rendre compte de l'effet de certains QTL et remplacer, après validation, le marqueur lié au QTL. Les marqueurs de fonction connue (RFLP avec cDNA, STS) ont l'avantage de permettre de manipuler ces gènes candidats. La technique semi-aléatoire S-SAP présente le grand intérêt de permettre génétique, surtout pour des espèces peu étudiées, où les sondes et les marqueurs PCR n'ont pas été développés. Pour des objectifs de clonage positionnel, ils permettent, dans des dispositifs génétiques adaptés, d'obtenir une forte densité de marqueurs dans une région précise du génome, au voisinage du gène à cloner.

### **I.11.4.5. 4. Cartographie comparée entre espèces**

En exploitant les données disponibles sur une espèce proche la cartographie comparée d'espèces voisines présente un intérêt fondamental pour la connaissance de l'évolution des génomes, mais aussi un intérêt appliqué pour la recherche de gène ou de QTL d'un caractère donné dans une espèce mal connue.

Les marqueurs utilisés doivent être retrouvés dans des espèces voisines. Si les espèces sont un peu trop éloignées, les séquences d'évolution rapide, séquences non codantes comme des microsatellites, ont peu de chances d'être retrouvées. En revanche, les séquences codantes sont très utiles pour la cartographie comparée car leur divergence est assez faible. La technique doit aussi permettre de révéler un polymorphisme dans différents fonds génétiques. En pratique, les marqueurs RFLP, surtout avec des sondes ADNc, sont les mieux adaptés à la cartographie comparée.

Similitudes de séquences codant pour une même protéine et même une similitude de localisation chromosomique de ces gènes semblables entre espèces différentes.

**La figure (20)**, montre la conservation de quelques gènes sur les trois espèces riz, maïs et blé. Par exemple, le gène waxy amylopectine très ramifié, se trouve sur le chromosome 6 du riz, 9

du maïs, et 7 du blé. Il s'agit donc de régions synténiques. On constate également au sein du génome du maïs des homologies. Le chromosome 5 par exemple a une homologie avec le chromosome 1.

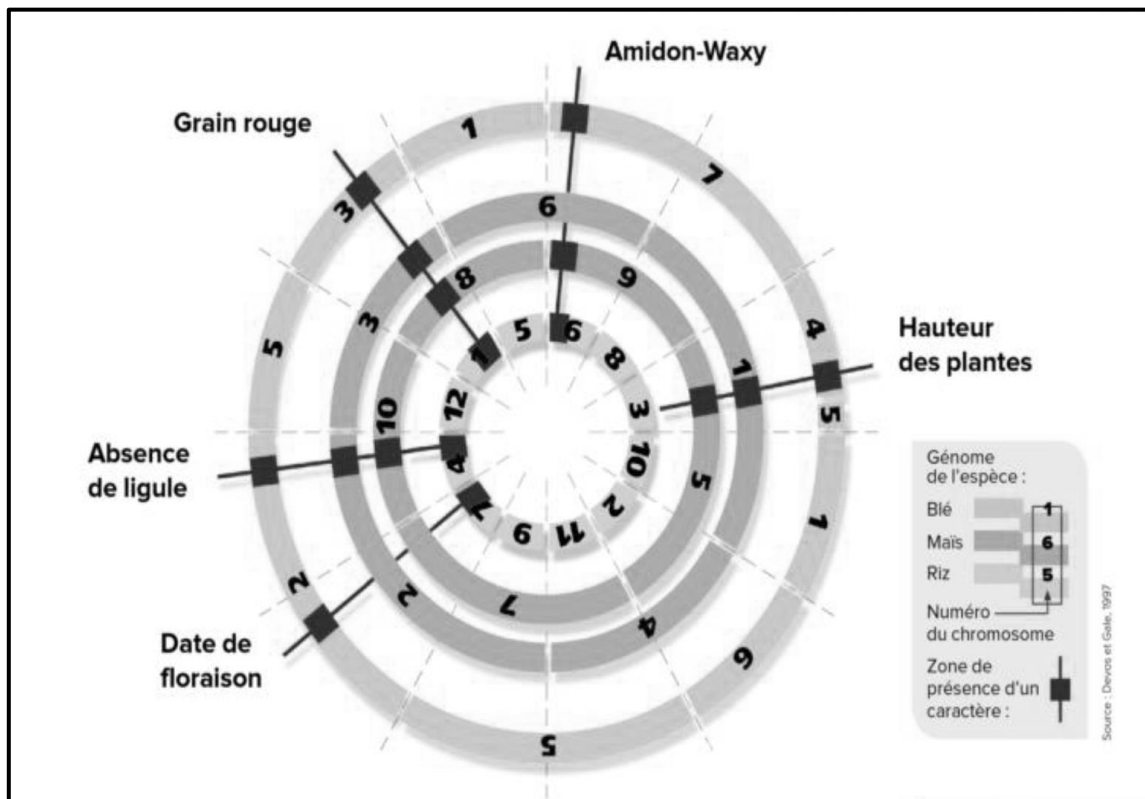


Figure 20 : cartographie comparée

Le génome de la tomate et de la pomme de terre sont colinéaires. Il n'y a aucune inversion de l'ordre des gènes de 9 des 12 chromosomes. Seule une inversion paracentrique des 3 derniers chromosomes est observée. Cette synténie se retrouve aussi avec le piment, toutefois les remaniements sont plus nombreux.

Les sondes hétérologues sont des sondes qui ne proviennent pas de l'espèce étudiée. Sur la base de constatations de synténie, il est possible de marquer le génome d'une espèce en utilisant ces sondes sans avoir à refaire l'effort d'isolement et de criblage de sondes. Elles sont également un outil précieux pour affiner les cartographies comparées.

## II.1. Plantes modèles et l'utilisation des marqueurs

### II.1.1. Introduction

Les plantes modèles sont des espèces végétales utilisées en recherche pour étudier des processus biologiques fondamentaux.

L'amélioration des outils de la biologie moléculaire et l'utilisation de plantes modèles permettent aujourd'hui de travailler au niveau des gènes qui contrôlent les caractéristiques agronomiques, programmes de génomique végétale.

Ces outils permettent une mise en évidence de la diversité des gènes (allèles), leur localisation et l'étude de leur expression dans divers fonds génétiques ou environnements.

La génomique se décline selon :

Comme il y a des similitudes entre les génomes des différentes espèces (cultivées ou non), Les chercheurs ont choisi une plante ayant le plus petit génome possible pour l'analyser et utiliser le séquençage .En effet, les gènes sont souvent organisés de la même manière sur les chromosomes, et placés dans le même ordre (*synténie*).

### II.1.2. Les critères de choix d'une plante modèle

Les critères de sélection d'une plante modèle dépendent de l'objectif visé et incluent des facteurs comme la résistance aux stress (maladies, ravageurs, climat), la productivité et les qualités organoleptiques et nutritives. D'autres critères importants sont l'adaptabilité au sol et à l'eau, la facilité de culture et de conservation, ainsi que la valeur économique et la qualité pour la transformation industrielle.

#### 1. Facilité d'utilisation

Une plante modèle doit être facile à cultiver et à manipuler génétiquement.

#### 2. Disponibilité des ressources génétiques

Il est important d'avoir un accès facile aux séquences génomiques et aux mutants.

#### 3. Adaptabilité expérimentale

La possibilité d'effectuer des expériences variées et de prélever facilement des échantillons est essentielle.

Des plantes modèles représentent les deux grandes divisions chez les plantes supérieures (monocotylédones et dicotylédones). Elles ont été choisies pour étudier de façon systématique la structure et la fonction des génomes végétaux.

Pour les dicotylédones, la plante modèle est *Arabidopsis thaliana* et *Oryza sativa* plante modèle pour les monocotylédones.

### II.1.2.1. *Arabidopsis thaliana*

L'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), avait été choisie comme plante modèle parce qu'elle présente, pour l'expérimentateur, toute une série d'avantages :

- Croissance rapide, cycle reproductif court
- surtout petite taille du génome, possède un génome entièrement séquencé et une facilité de manipulation génétique.
- L'absence d'intérêt économique particulier d'*Arabidopsis*
- existence de très nombreux mutants permettant de disséquer les voies métaboliques
- programmes de développement,
- réponses aux stimuli environnementaux et mécanismes de base de la machinerie cellulaire
- possibilité de mettre en œuvre des approches génétiques directes ou inverses.



Figure 21: *Arabidopsis thaliana*

### II.1.2.2. *Oryza sativa*

Le riz possède le plus petit génome parmi toutes les céréales (430 Mpb).

Le riz, une plante modèle pour l'étude des céréales, caractérisée par son adaptabilité et sa valeur économique. Le choix du riz s'appuie aussi sur des ressources pour l'approche génomique. On dispose d'excellentes cartes génétiques et des techniques de transformation génétique. Le riz est la céréale la plus facile à transformer.



**Figure 22:** *Oryza sativa*

Le riz constitue la base quotidienne de l'alimentation de plus de la moitié de l'humanité, extrêmement précieuse pour les sélectionneurs dans le but d'augmenter le rendement et créer de nouvelles variétés résistantes aux maladies, aux ravageurs, à la sécheresse ou à la salinité.

Une grande quantité de nouveaux marqueurs moléculaires de type microsatellite a été révélée par la séquence du génome du riz (ils affinent l'analyse génétique obtenue avec les marqueurs de type RFLP).

Permet d'identifier des polymorphismes de type SNP sans risque de confusion avec des erreurs de séquençage. Par sélection assistée par marqueurs moléculaires, ces marqueurs facilitent la création de nouvelles variétés par sélection assistée par marqueurs.

### **II.1.2.3. *Medicago truncatula***

Une légumineuse utilisée pour étudier l'interaction entre les plantes et les bactéries fixatrices d'azote. La connaissance de son génome permet d'accéder facilement à la localisation de gènes d'intérêts chez les légumineuses cultivées (le pois, la féverole, la lentille, la luzerne et le trèfle) ce qui facilitera grandement leur amélioration génétique.



**Figure 23:** *Medicago truncatula*

Elle comporte 8 chromosomes ( $2n = 16$ ), son génome est sept fois plus petit que celui du pois. En effet, grâce à la duplication du génome, des gènes impliqués dans une symbiose beaucoup plus ancienne avec des champignons mycorrhiziens ont évolué et donné naissance à des gènes impliqués dans la symbiose fixatrice d'azote.

D'un point de vue phylogénétique *Medicago truncatula* est très proche de la plupart des légumineuses cultivées, comme le pois protéagineux, la féverole, la luzerne ou les trèfles. Il existe une forte conservation de l'ordre dans lequel les gènes sont situés sur les chromosomes de ces espèces (conservation synténique).

La connaissance de la séquence du génome de *Medicago truncatula* (Mt) a permis la détermination de l'ordre de la majorité des gènes sur les huit chromosomes. Ainsi, cette connaissance devrait grandement faciliter la localisation des gènes importants chez les légumineuses cultivées.

#### **II.1.2.4. *Solanum lycopersicum***

La tomate (*Solanum lycopersicum* L.) est une espèce de plantes herbacées de la famille des Solanacées.

Le génome de la tomate comprend 12 paires de chromosomes ( $2n=24$ ).

Sa taille est estimée à 950 Mpb encodant environ 35 000 gènes.

La majorité des séquences géniques, représentant 220 Mpb, est concentrée dans des régions euchromatiques contiguës dans les régions distales de chaque bras des chromosomes.



**Figure 24:** *Solanum lycopersicum* L.

#### **II.1.2.5. *Populus trichocarp***

Les peupliers sont des arbres du genre *Populus* appartenant à la famille des Salicacées. Le genre *Populus* englobe 35 espèces des régions tempérées et froides de l'hémisphère nord. Il comprend aussi de nombreux hybrides naturels ou artificiels (créés par l'homme).

Le peuplier étant un arbre à croissance rapide (d'où une évaluation vite disponible lors de tests) et progressivement entièrement séquencé.

L'autre critère de choix a été la capacité de cet arbre à grandir de 5 m par an, permettant d'évaluer efficacement les modifications génétiques.



**Figure 25:** *Populus trichocarp*

La base d'un quart des matières premières industrielles mondiales est les ressources forestières. Le défi suivant consistera à comprendre comment, à partir d'un génome faiblement plus grand que celui d'*Arabidopsis*, on obtient un arbre au lieu d'une plante herbacée

#### **II.1.2.6. *Vitis vinifera***

Si la biologie de la vigne n'en fait pas une espèce modèle (plante pérenne, très hétérozygote et possédant un cycle de reproduction long), il est rapidement apparu qu'il était non seulement possible, mais aussi nécessaire, de développer des outils génomiques pour accélérer l'acquisition de connaissances sur des caractères agronomiques importants tels que la résistance aux maladies, la tolérance aux stress abiotiques, la maturation.



**Figure 26 :** *Vitis vinifera*

En parallèle, une carte physique et génétique comprenant plus de 1500 marqueurs est construite. Elle permettra d'ancrer et d'orienter les supercontigs de séquence le long des 19 chromosomes.

#### **II.1.2.7. *Brachypodium distachyon***

Monocotylédone modèle, petit génome (272 Mpb en 5 chromosomes) pour une graminée, sa petite taille et son cycle court, sa proximité taxonomique avec des céréales majeures.



**Figure 27:** *Brachypodium distachyon*

#### **II.1.2.8. *Eucalyptus grandis***

Plante à fibres et bois, l'eucalyptus est le feuillu le plus planté dans le monde famille des myrtacées, principalement pour la production de pâte à papier et plus récemment pour les bio-carburants de seconde génération. C'est aussi la seconde espèce forestière pour laquelle le génome a été séquencé.



**Figure 28:** *Eucalyptus grandis*

#### **II.1.2.9. *Zea mays***

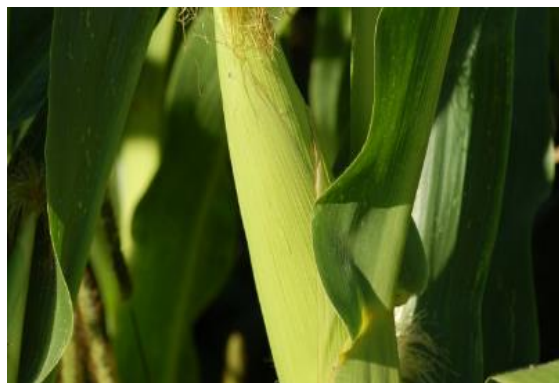
Pour comprendre la biologie des plantes à graines avec une grande diversité génétique, le Maïs étant un modèle. Le Maïs (*Zea mays*) est une plante modèle majeure grâce à sa biologie

bien étudiée et son importance économique et agricole mondiale. *Zea mays* est une espèce de plantes monocotylédones, de la famille des Poacées (sous-famille des Panicoïdées).

C'est une plante tropicale qui constitue l'alimentation de base des anciennes civilisations d'Amérique centrale d'où la plante est originaire.

Aujourd'hui, le maïs est devenu la première céréale cultivée dans le monde, devant le riz et le blé. Récolté en grain ou avec toute la plante, le maïs est largement utilisé dans l'alimentation animale et humaine, et pour des usages industriels.

L'utilisation de marqueurs moléculaires est essentielle pour la sélection variétale, car ils permettent d'identifier et de suivre des gènes d'intérêt pour des caractères comme la résistance aux maladies, l'efficacité de l'utilisation de l'eau (caractéristique de son type C4), ou l'amélioration du rendement. Ces marqueurs facilitent la compréhension de la génétique du maïs et l'accès à ses ressources génétiques pour la création de nouvelles variétés améliorées.



**Figure 29:** Le Maïs (*Zea mays*)

### **II.1.2.9. 1.Importance économique et agronomique du Maïs**

Le Maïs est une culture vivrière mondiale, utilisée pour l'alimentation humaine et animale, ainsi que pour des applications industrielles et comme biocarburant.

#### **Biologie complexe**

Sa morphologie est distinctive, avec des inflorescences mâles séparées (panicule) et femelles (épi) sur la même plante (monoïque).

#### **Physiologie C4**

Son type de photosynthèse C4 lui confère une grande efficacité dans l'utilisation de l'eau et des nutriments.

### **II.2.Légumineuses en Algérie**

En Algérie, les légumineuses sont cultivées sur les zones littorales jusqu'aux plateaux, on y trouve de nombreuses espèces comme le pois chiche, le haricot, la fève, le pois et la lentille.

Actuellement, le nouveau programme de la MADR ambitionne d'éviter l'importation annuelle de 2 millions de quintaux de légumes secs. Le secteur agricole devra alors porter les superficies consacrées aux légumineuses à 218 000 ha, contre 85 000 ha produite actuellement.

Les anciennes variétés issues de multiplications successives ont subies la sélection naturelle chez les paysans qui les détenaient. En 1850, la pépinière centrale du gouvernement à Alger a pu obtenir une collection de variétés de pois destinée à la récolte du grain sec

### **II.2.1.Importance nutritionnelle des légumineuses**

Les légumineuses contiennent une teneur importante en protéines. Elles constituent la principale source des pays en développement.

Les légumineuses sont un excellent complément alimentaire pour les nourrissons et les jeunes enfants, et les aident à atteindre leurs besoins énergétiques quotidiens. Leur teneur élevée en nutriments en fait également un aliment idéal pour les végétariens et les végétaliens, garantissant un apport suffisant en protéines, en minéraux et en vitamines.

Citons quelques avantages des légumineuses (**FAO, 2016**) :

- Dotées d'un faible indice glycémique, à faible teneur en graisse et à haute teneur en fibres, les légumineuses sont adaptées aux personnes atteintes de diabète. Leur teneur élevée en fibres augmente la satiété et aide à stabiliser la glycémie et le taux d'insuline, ce qui réduit les pointes après les repas et améliore la résistance à l'insuline. Cela fait des légumineuses un aliment idéal pour la gestion du poids.
- Les légumineuses peuvent contribuer à réduire les risques de maladies coronariennes. Elles sont riches en fibres solubles, connues pour leurs effets positifs sur le taux du LDL-cholestérol, un facteur de risque reconnu de la maladie coronarienne ;
- Les légumineuses sont de bonnes sources de vitamines, telle que la folacine, qui aide à réduire le risque d'anomalies du tube neural (ATN), comme le spina-bifida chez les nouveau-nés.
- Leur haute teneur en fer fait des légumineuses un aliment excellent pour prévenir l'anémie ferriprive chez les femmes et les enfants, notamment si elles sont accompagnées d'aliments riches en vitamine C qui améliore l'absorption du fer.
- Elles sont sans gluten, ce qui en fait un aliment bénéfique pour les personnes allergiques au gluten ou souffrant de la maladie cœliaque.
- Les légumineuses sont riches en composés bioactifs tels que les composés phytochimiques et les antioxydants qui pourraient contenir des propriétés anti-cancer.

### **II.2.2.Le pois (*Pisum sativum* L.)**

En 1866, Gregor Mendel a publié ses résultats sur le petit pois (*Pisum sativum*) .

Ses découvertes mènent à la formulation des trois principes fondamentaux de lois d'hérédité: (lois de Mendel).

Ils retracent l'histoire génomique de la légumineuse, en pointant les principaux réarrangements subis lors de son évolution. Ils montrent que le genre *Pisum* a énormément évolué depuis sa différenciation des autres membres de la tribu *Fabeae*.

Grâce aux informations apportées par cette étude, une meilleure approche agronomique s'avère désormais possible, en comprenant l'influence des gènes sur les caractéristiques de l'espèce, sélectionner des caractères d'intérêt (rendement, résistances aux maladies et à des conditions climatiques spécifiques) deviendra chose plus aisée.

Le pois est parmi les premières espèces à avoir été domestiquée au néolithique, à côté des céréales et de la lentille.

Il peut être utilisé en ensilage lorsqu'il est cultivé en association avec une céréale qui lui sert de tuteur, et constitue ainsi un aliment de haute valeur nutritive avec des proportions adéquates d'azote et de glucides.

#### **II.2.2.1.Description botanique de *pisum sativum***

Les feuilles normales sont composées à leur base de deux grandes stipules à forme arrondie, puis de paires de folioles.

. Sur ses racines, le pois présente des nodosités fixatrices de l'azote de l'air, développées grâce à des bactéries symbiotiques du genre *Rhizobium*. Le grain présente une grande variabilité génétique pour sa couleur, sa forme et sa taille. La forme et la couleur des grains ont été les premiers caractères étudiés par G. Mendel, qui lui permirent d'établir les premières lois de la génétique (**Fig. 30**).

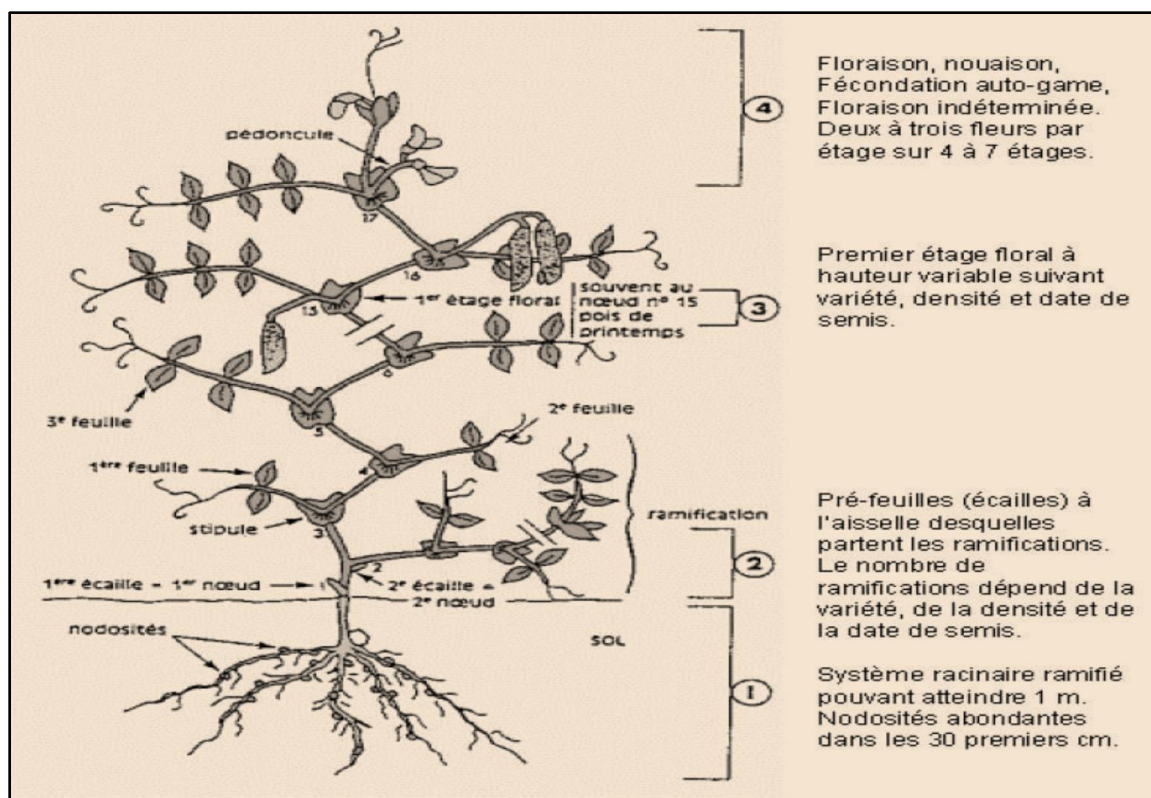


Figure 30 : Organisation d'une plante de pois Boyeldieu, (1991)

### II.2.2.2. Variétés de petit pois

On distingue trois variétés de petit pois :

- a) Les Petits pois à grains lisse : ils sont plus résistants au froid, mais donnant des petit pois moins sucrés et plus farineux.
- b) les Petit pois à grains ridé, ses grains sont plus sucrés que les premiers
- c) les pois Mangetout sont des pois que l'on récolte plus jeune et que l'on mange avec la cosse.

Ces 3 variétés de petits pois peuvent aussi être des variétés « naines » ou « à rames », les pois nains dont les plantes ne dépassent pas 50cm de hauteur et les pois à rames dont les plants peuvent atteindre 2 m 50 et nécessitent plus d'espace.

### II.2.2.3. Importance nutritionnelle du petit pois

Le pois une importante source de protéine de bonne qualité et de moindre coût (21 à 25 %). Il contient également des niveaux élevés d'hydrates de carbone, de minéraux et de vitamines.

Ainsi, il joue un rôle important dans l'équilibre alimentaire des hommes.

Dans l'alimentation humaine, le pois peut être consommé à l'état frais ou encore sous forme de grains secs récoltés à maturité complète. La richesse du petit pois en protéines (20-25%) permet de remplacer certaines protéines animales dans l'alimentation .C'est une plante riche

en fibres et glucides dont le saccharose, qui lui donne son goût sucré, referme aussi des vitamines (A, B1, B2, C, E, PP) et des sels minéraux.

Le pois fourrager (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) est une légumineuse fourragère de grand intérêt nutritionnel et environnemental. Les agriculteurs accordent beaucoup d'intérêt à cette culture en raison de ses effets bénéfiques sur le sol et de la quantité de son fourrage, riche en protéines et bien valorisé en alimentation animale.

Dans le but d'optimiser les rendements et de stabiliser la production du pois fourrager en dépit des fluctuations imprévisibles du climat (séries de froid hivernal, de chaleur printanière et des sécheresses récurrentes), nous avons intégré les facteurs climatiques comme contrainte principale pour l'amélioration génétique du pois.

#### **II.2.2.4. Importance agronomique**

Du point de vue agronomique, le pois comme les autres légumineuses, a la capacité de fixer l'azote atmosphérique grâce à la symbiose (c'est un excellent fourrage, qui se cultive seul ou en association) qui s'opère dans les nodosités entre la plante et les *Rhizobium*, cette fixation se fait concurremment avec l'absorption de l'azote du sol par les racines. Et l'important système racinaire de ces espèces est à l'origine de l'amélioration de la structure du sol

Par ailleurs, la rotation des cultures avec ces plantes permet d'économiser les engrais azotés, très coûteux en énergie fossile et contribuant à l'effet de serre via l'émission de grandes quantités d'oxyde nitrique.

Le petit pois est sensible aux températures élevées, au-delà de 28°C. C'est pendant la phase végétative que le petit pois offre le maximum de résistance au froid, il peut supporter des températures négatives jusqu'à -10°C.

Le petit pois est légèrement sensible à la longueur du jour, car les jours longs favorisent la floraison dans la plupart des cas, sous les tropiques, il peut être considéré comme indifférent à la photopériode. Les principales maladies cryptogamiques qui attaquent le petit pois sont le mildiou (*Peronosporapisi*) par temps humide et nuits fraîches.

##### **II.2.2.4.1. Fixation de l'azote atmosphérique**

Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol du genre *rhizobium*. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie.

Les nodosités ne deviennent efficaces que lorsque l'azote du sol devient limitant (moins de 50 kg/ha).

Une étude réalisée par **N'dayegamiye *et al.* (2012)** a évalué la contribution réelle des légumineuses en considérant les rendements du blé et du maïs dans les sous parcelles non fertilisées en azote. Les parcelles avec légumineuses ont permis des augmentations de rendement de 0.6 à 1 t/ha pour le blé et de 1.3 à 3.2 t/ha pour le Maïs, en comparaison avec celles sans légumineuses. Ces résultats démontrent que les légumineuses ont contribué fortement à la nutrition azotée de la culture suivante.

Si la présence très importante d'azote dans le milieu réduit le fonctionnement de la symbiose, il en est de même pour d'autres facteurs parmi lesquels on peut citer la salinité du milieu, l'acidité, la pauvreté en phosphore, la sécheresse, les basses températures, la limitation en nutriments ou le manque d'oxygène.

#### **II.2.2.5. Les caractères d'intérêt chez le pois (*Pisum sativum* L.)**

Il s'agit des caractéristiques botaniques comme la hauteur de la plante (grande ou petite) et l'aspect des graines (lisses ou ridées), des qualités nutritives et agronomiques telles que son rôle de source de protéines et sa capacité à fixer l'azote atmosphérique, ainsi que sa résistance à des contraintes environnementales comme le gel.

L'espèce est également intéressante pour les études génétiques grâce à son cycle de vie rapide et sa grande production de graines, ce qui fut particulièrement utile pour les travaux de Gregor Mendel.

Chez le pois (*Pisum sativum* L.) la tolérance au gel est contrôlée par un nombre relativement restreint de loci quantitatifs (QTL), mis en évidence par analyse de liaison dans des populations biparentales de cartographie.

Le critère de sélection des nouvelles variétés de pois le plus important est le rendement. D'autres paramètres sont également évalués, telle la précocité de la floraison, la hauteur à la récolte, la résistance à l'anthracnose, la verse et la teneur en protéines des grains.

La variabilité du rendement est probablement aujourd'hui l'un des critères majeurs utilisés par les agriculteurs pour renoncer à la culture du pois. C'est donc un facteur important sur lequel peut s'appuyer l'agriculteur pour déterminer le risque qu'il aura à introduire ces nouveaux types de variétés dans son assolement et donc qui peut conditionner la réussite de leur adoption.

##### **II.2.2.5.1. Identification des caractères d'intérêt chez le pois (*Pisum sativum* L.)**

Différentes technologies complémentaires au séquençage ont été utilisées pour aider à reconstituer les sept chromosomes du pois. Des cartes physiques, chromosomiques et génétiques ont ainsi été

réalisées. Le séquençage puis l'assemblage du génome ont pris au total cinq années. La séquence que nous avons assemblée représente 88 % du génome et contient 44 756 gènes.

Comment la séquence du génome de pois peut-elle aider au développement de cette espèce à la fois maraîchère et de grande culture ?

Cette séquence constitue un outil extrêmement précieux pour identifier les gènes qui contrôlent les caractères d'intérêt chez le pois, notamment les gènes de résistance aux maladies, aux insectes, au froid ou à la sécheresse, Cette connaissance constitue le socle du développement de la sélection génomique, méthode qui devrait permettre des gains de temps dans la sélection de nouvelles variétés productives, résistantes aux bio-agresseurs et adaptées aux aléas climatiques.

Le développement récent de SNP en grand nombre et d'outils de génotypage à haut débit offre la possibilité d'approfondir les études du déterminisme génétique responsables de la variation phénotypique du caractère d'intérêt chez le pois (*Pisum sativum* L.)

L'expérimentation est le moyen le plus utilisé actuellement en sélection pour évaluer les génotypes d'intérêt.

### **II.3. Application des marqueurs dans l'étude de la diversité génétique chez *Vigna sinensis***

#### **-Les marqueurs microsatellites (SSR) :**

Ces marqueurs sont très utilisés pour étudier la diversité génétique. Ils sont très polymorphes et permettent de différencier les variétés de manière .Chaque marqueur peut être marqué avec un fluorochrome, permettant une détection sur un gel d'agarose.

#### **Autres marqueurs moléculaires :**

#### **-Les marqueurs RAPD, ISSR et AFLP :**

Peuvent également être utilisés pour analyser le génome de *Vigna sinensis*. Ces techniques se basent sur des différences d'ADN pour créer des profils génétiques. Ils permettent de caractériser les ressources phylogénétiques et de faciliter la sélection des variétés face aux changements climatiques.

#### **-Utilité des marqueurs dans l'amélioration génétique**

- **Identification variétale :** L'utilisation de marqueurs moléculaires, en particulier les microsatellites, est cruciale pour l'identification précise des variétés de niébé.
- **Présélection :** Les marqueurs moléculaires permettent de faciliter la présélection de variétés prometteuses, notamment pour s'adapter à des conditions environnementales changeantes.
- **Gestion de la diversité :** L'étude de la diversité génétique à l'aide de ces marqueurs est fondamentale pour la conservation des ressources génétiques et pour l'amélioration des programmes de sélection.

### III.1. L'amélioration des plantes

L'objectif de l'amélioration des plantes est de créer de nouvelles variétés combinant un certain nombre de caractères définis par le sélectionneur pour répondre aux besoins des agriculteurs et des consommateurs.

L'amélioration des plantes est basée sur une large utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiable de cette diversité dans les programmes de sélection. La sélection a joué un rôle déterminant dans l'accroissement de la production agricole au cours du siècle dernier, tant dans les pays développés que dans les pays en développement. Les sélectionneurs mettent l'accent sur l'amélioration simultanée du comportement agronomique, de la résistance aux contraintes environnementales et aux maladies.

#### III.1.1. Les bases théoriques de l'amélioration des plantes

##### La notion de l'espèce végétale

L'espèce est une population ou un ensemble de populations dont les individus peuvent potentiellement se reproduire entre eux et engendrer une descendance viable et féconde, dans des conditions naturelles. Ainsi, l'espèce est la plus grande unité de population au sein de laquelle le flux génétique est possible et les individus d'une même espèce sont donc génétiquement isolés d'autres ensembles équivalents du point de vue reproductif.

La spéciation résulte de la sélection naturelle qui est le moteur de l'évolution. C'est la conséquence de l'évolution. Les espèces s'individualisent à partir d'une population appartenant à la même espèce.

La génétique quantitative s'oppose (comme concept) à la génétique mendélienne

**Lignée pure:** Population dont les individus donnent des descendants identiques à eux-mêmes (qui ne présentent aucune variation) en ce qui concerne le caractère considéré.

**Phénotype:** La forme adoptée par un caractère (ou un groupe de caractères) chez un individu spécifique. Il s'agit également des manifestations extérieures détectables d'un génotype spécifique.

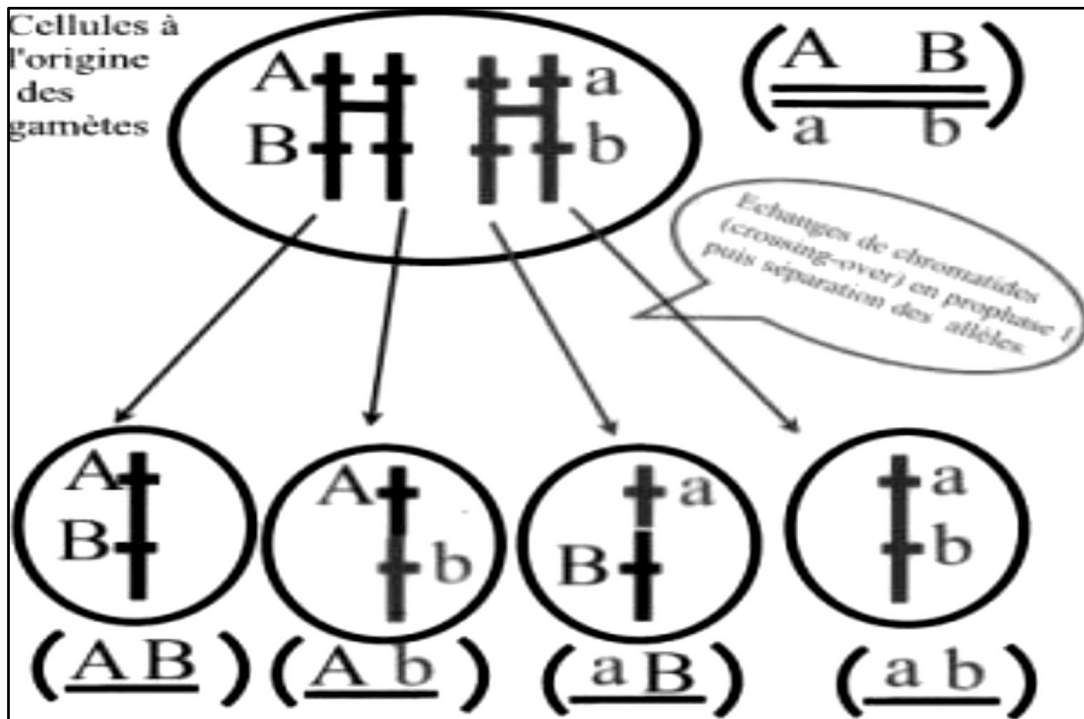
**Génotype:** La constitution allélique spécifique d'une cellule, soit de l'ensemble de la cellule, ou, ce qui est le plus courant, d'un certain gène ou groupe de gènes.

##### La liaison génétique

Deux gènes portés par le même chromosome ont tendance à ne pas se dissocier à la méiose. On dit qu'ils sont liés. La liaison peut être considérée comme établie quant à l'issue d'un test

cross, les proportions respectives des 4 catégories d'individus sont significativement différentes des proportions 1/4, 1/4, 1/4,1/4.

Les gamètes parentaux sont plus fréquents que les gamètes recombinés. Ceux-ci résultent de crossing over intéressant deux chromatides non sœurs et situées entre les deux loci.



**Figure 31:** Schéma montrant la liaison entre les gamètes. Deux gamètes parentaux et deux autres recombinés.

Plus la distance entre deux points d'un chromosome est grande plus la probabilité qu'un crossing over ait lieu entre ces deux points est grande

Distance génétique entre deux loci= Nbre de gamètes recombinés x100/ Nbre totale des gamètes

Une fréquence de 0,01 (ou 1%) est définie comme 1. unité cartographique de carte génétique (UC). L'unité est également parfois exprimée en centimorgan (cM)

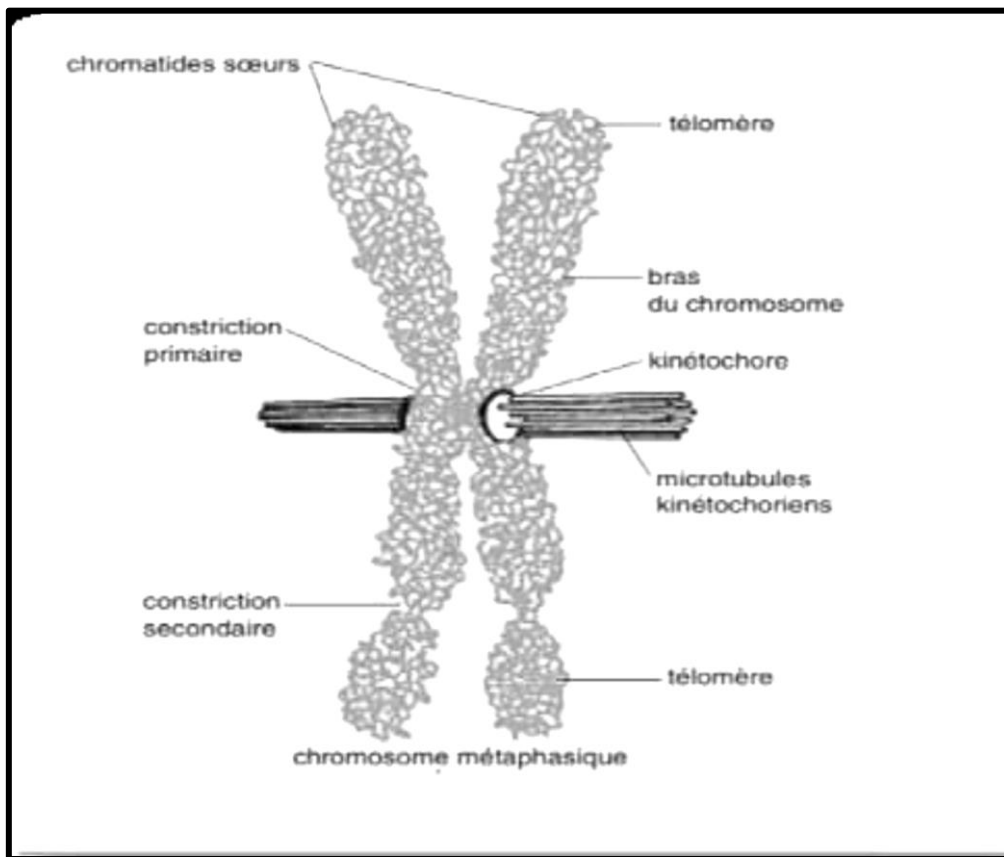
### Caractéristiques de cytogénétique

La cytogénétique est l'une de nombreuses disciplines sur lesquelles s'appuie l'amélioration des plantes. Elle participe à la connaissance du nombre de chromosomes matériel végétal utilisé, l'établissement des cartes génétiques, L'exploitation de la variabilité intra spécifique, interspécifique ou induite et l'amélioration des plantes.

### Chromosome métaphasique :

Le caryotype ainsi que l'idiogramme s'établissent à partir de chromosomes métaphasiques qui comportent une zone de constriction primaire dénommée centromère qui est un point de liaison des deux chromatides sœurs qui contient le kinétochore, centre d'organisation des

microtubules, responsable de la fixation des chromosomes au fuseau mitotique lors de la mitose. La position du centromère permet de distinguer un bras court (BC).



**Figure 32:** Chromosome métaphasique

### Caryotype

L'étude de paramètres caryologiques et de l'organisation des chromosomes, peut fournir des indications évolutives. L'étude des caryotypes se fait généralement en métaphase mitotique où les chromosomes sont bien individualisés et présentent la meilleure morphologie.

Différents paramètres interviennent dans la description de la morphologie des chromosomes : la taille, la position du centromère, la présence de satellites et les constriction secondaire.

Le caryotype qui consiste, à partir d'une photographie d'une cellule en métaphase à juxtaposer les chromosomes homologues par ordre décroissant de longueur. **(Fig 33)**.

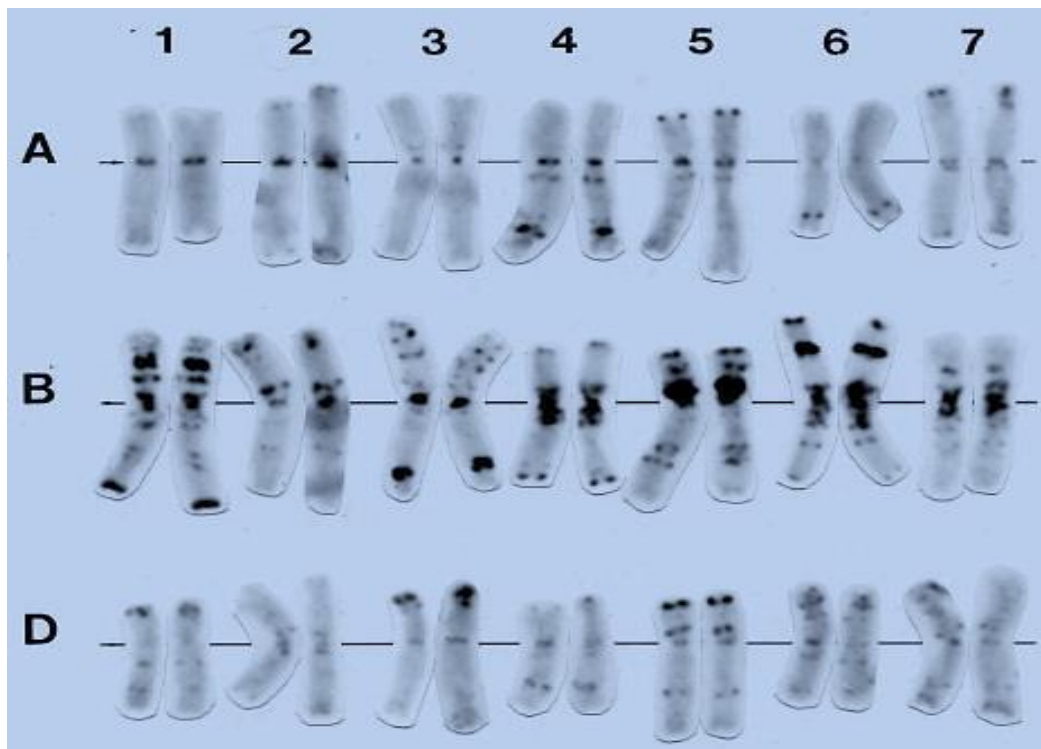


Figure 33 : exemple caryotype 21 paires de chromosomes

### III.2. La génétique quantitative

La génétique quantitative est la génétique des caractères qui peuvent donner lieu à des mesures, que ce soient des caractères à variation continue ou discontinue, c'est-à-dire résultant de plusieurs facteurs génétiques ou non ou bien partie de la génétique qui étudie la transmission des différences individuelles à l'aide de modèles mathématiques qui font appel à la biométrie.

A partir de l'estimation des variances imputables aux effets des gènes et à ceux de l'environnement, les modèles permettent d'estimer l'influence respective de l'hérédité et du milieu. La génétique quantitative est une extension de la génétique mendélienne, qui demeure basée sur les lois de Mendel, elle s'appuie également sur la génétique des populations et les statistiques. L'analyse de locus de caractères quantitatifs (QTL) est un ajout plus récent à l'étude de la génétique quantitative.

#### Quelques exemples de caractères à variation continue

##### Caractères biométriques

– Taille des individus, poids, croissance

##### --Caractères agronomiques

– Teneur en huile chez le Maïs

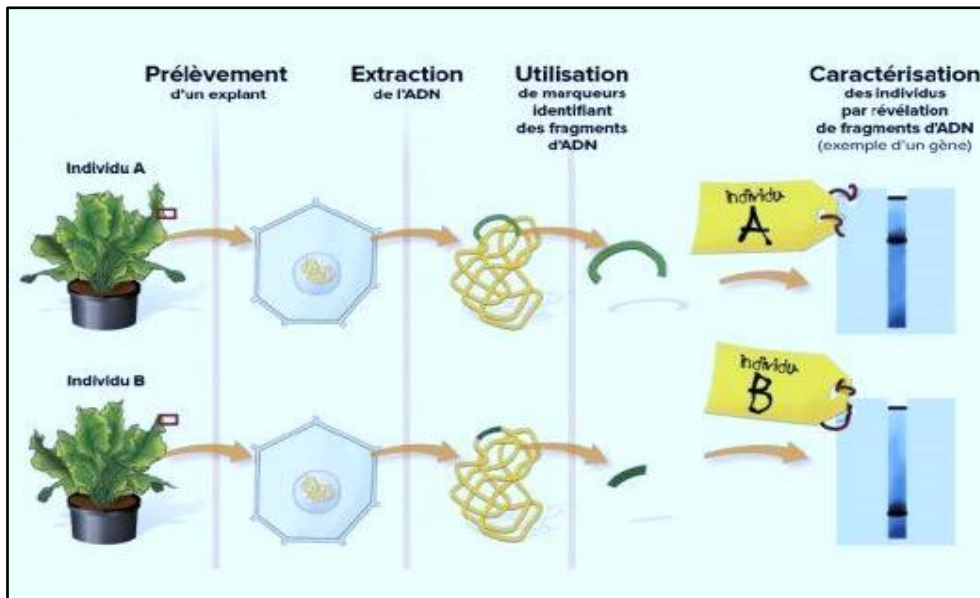
- Nombre de grains par épi de Blé
- Date de floraison chez le Blé
- Maladies multifactorielles / maladies "monogéniques«
- Caractères impliqués dans l'adaptation
- Précocité floraison, fertilité, tolérance facteurs du milieu

### III.3. Les marqueurs moléculaires et l'amélioration des plantes

Ces dernières années, l'utilisation de marqueurs moléculaires en identification variétale a connu un développement spectaculaire. Les marqueurs moléculaires offrent en effet l'opportunité de contourner les difficultés liées aux observations morphologiques en identifiant des variétés directement à partir de leur ADN (empreintes génétiques).

L'analyse d'un minuscule fragment de tissus végétal, par exemple d'un jeune plant d'une nouvelle variété en cours d'évaluation, révèle alors-grâce à l'emploi de marqueurs en guise de repères-si le gène recherche est présent ou non dans la nouvelle plante.

Si ce n'est pas le cas, le spécialiste de la reproduction peut passer rapidement à l'analyse d'une autre plante.



**Figure34** : Marqueurs moléculaires et étude de la diversité génétique au niveau du génome

L'amélioration du rendement et de la qualité passe donc par la création variétale et le choix de critères fiables pour l'identification de mécanismes d'adaptations aux contraintes environnementales.

Parmi ces critères, la stabilité du rendement, la tolérance aux stress abiotiques, la résistance aux maladies en plus d'une bonne qualité technologique. Cependant les exigences en termes de qualité technologique du sont parfois difficiles à concilier avec les contraintes des producteurs.

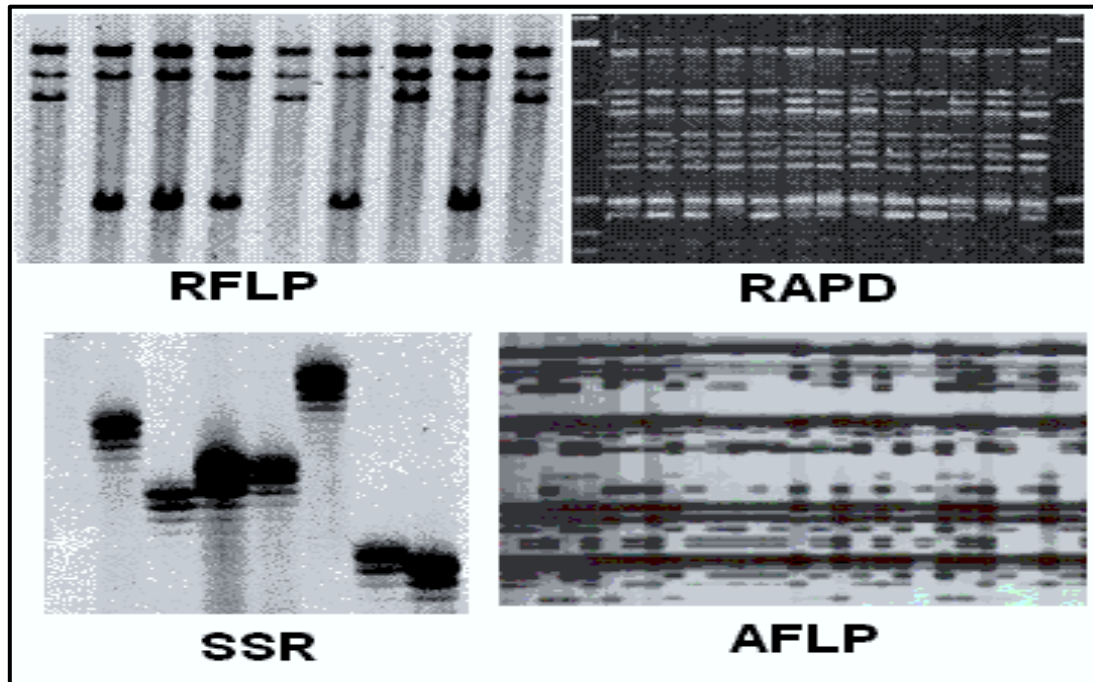
Il s'agit principalement des techniques suivantes

- a) Les marqueurs RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- b) Les marqueurs dérivés de la PCR: 1- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
- c) AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- d) SSR (Simple sequence repeat)
- e) SNP (Single Nucleotide Polymorphism)

Autres types de marqueurs en plus des marqueurs moléculaires sont utilisés dans les travaux d'amélioration des plantes, parmi eux: les marqueurs biochimiques (isoenzyme, protéine).

Les protéines étudiées sont généralement les protéines constitutives de la plante, elles peuvent être facilement extraites et analysées.

Les iso enzymes correspondent aux différentes formes d'une enzyme représentée par les différents allèles, ce qui permet de révéler le polymorphisme entre individus.



**Figure 35** : marqueurs moléculaires utilisés dans l'amélioration des plantes

### III.3.1. Le cas de la Luzerne (*Medicago sativa* L)

La luzerne, espèce allogame et autotétraploïde, est une légumineuse fourragère dont l'intérêt connaît un renouveau certain grâce à ses atouts pour le développement durable de l'agriculture.

La luzerne (*Medicago sativa* L) est une culture fourragère largement cultivée dans le monde entier en raison de sa haute teneur en protéines, de sa capacité à fixer l'azote atmosphérique et de sa résistance face à des conditions environnementales variées.

Ce sont des plantes herbacées vivaces, largement cultivées comme plantes fourragères pour leur productivité, leur grande résistance à la sécheresse et leur richesse en protéines, en vitamines et en sels minéraux.

L'espèce a été introduite par la culture dans toutes les régions tempérées du monde notamment dans toute l'Europe, en Afrique du Nord et du Sud, en Amérique du Nord et du Sud et Australie et Nouvelle-Zélande et en Asie de l'Est.

Elle est très cultivée pour sa richesse en protéines (pour un taux compris habituellement entre 15 et 25 %) et ses qualités d'amélioration des sols. Abondamment répandue dans les contrées tempérées, tant à l'état sauvage que cultivée.

La luzerne est une des espèces fourragères les plus utilisées pour l'alimentation du bétail. Elle est aussi cultivée comme source industrielle de protéines et de carotène, et utilisée en diététique.

L'amélioration des variétés nécessite de mieux connaître les ressources génétiques, pour les exploiter, Les marqueurs moléculaires ont émergé comme un outil puissant dans ce processus, permettant une sélection plus rapide et précise des variétés améliorées.

#### III.3.1.1. La description botanique de la luzerne *Medicago sativa*

C'est une plante herbacée de 30 à 80 cm de hauteur, vivace par sa grosse souche ligneuse.

**Le système racinaire :** Très développé et lui permet d'atteindre des profondeurs importantes (plusieurs mètres). Cette particularité lui confère une excellente résistance à la sécheresse ainsi qu'une certaine capacité à décolmater les sols et à améliorer leur perméabilité. En outre les nodosités qui se forment sur ses racines, comme pour les autres légumineuses, lui confèrent la capacité de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir ainsi le sol.

**La tige :** très ramifiée est pleine, avec une consistance plutôt coriace, à section ronde. Chaque pied peut comporter de 5 à 15 tiges. Les tiges sont dressées, ascendantes et très ramifiées, d'une hauteur de 30 à 80 cm.

**Les feuilles :** sont alternes, avec une base simple, munie de stipules acuminées et dentées à la base. Composées, elles sont formées de trois folioles oblongues à sommet présentant des dents mucronées, sont pubescentes, d'un vert gris. Le pétiole de la foliole centrale est relativement plus long. Elles sont composées de trois folioles obovales ou oblongues, dentées au sommet, portées par des stipules dentées à la base.

**Les fleurs :** sont de couleur violacée à bleuâtre, regroupées en grappes oblongues terminales, avec une corolle typique des légumineuses (étendard, ailes, carène). La Fleuraison : Les fleurs apparaissent généralement de juin à septembre.

**Le fruit** est une gousse glabre, recourbée en spirale sur 2 à 3 tours, ouverte au centre, abritant plusieurs graines ovales.

### **III.3.1.2. Systématique**

**Règne:** Plantae

**Sous-règne:** Tracheobionta

**Division:** Magnoliophyta

**Classe:** Magnoliopsida

**Sous-classe:** Rosidae

**Ordre:** Fabales

**Famille:** Fabaceae

**Sous-famille:** Faboideae **Tribu:** Trifolieae

**Genre:** *Medicago*

**Espèce:** *Medicago sativa* L.

### **III.3.1.3. Le cycle de la luzerne**

La luzerne nécessite un sol sain, au pH neutre. La luzerne est semée soit en culture pure, on parle de luzernière (on disait aussi autrefois prairie artificielle), soit en association avec une graminée comme le dactyle (prairie temporaire de longue durée).

L'inoculation des semences avec une bactérie du type *Rhizobium* (par exemple *Rhizobium meliloti*) est recommandée dans les sols lourds, battants, mal drainés ou encore trop acides (pH6).

La luzerne assurant la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique, un apport d'azote minéral ou organique est inutile et sans effet, ou peut être négatif (sur-fertilisation) sur le rendement, ni sur la teneur en protéines de la plante. Par contre, la luzerne a besoin d'un sol contenant phosphates, potasse, calcium, magnésium et soufre : l'apport d'engrais contenant ces minéraux peut être nécessaire. Le semis se fait en automne ou vers le mois d'avril pour une première coupe en juillet (première floraison), et pour une deuxième coupe en septembre

(deuxième floraison). Le semis sous couvert de céréales ou tournesol est possible au printemps.



**Figure 36:** La luzerne

#### **III.3.1.4. Utilisation de la luzerne *Medicago Sativa* dans alimentation animale**

La luzerne est la plante fourragère susceptible de produire le plus de protéines par hectare jusqu'à 2,5 tonnes de protéines (mais 9 tonnes pour un étang de culture de spiruline) contre 0,8 tonne pour le soja, qui présente une composition en acides aminés intéressante. La production de matière sèche peut atteindre 16 tonnes par hectare en agriculture irriguée. Cependant, sa valeur énergétique est modeste, s'élevant à environ 0,5 unité alimentaire par kilogramme.

C'est une plante cultivée principalement pour nourrir le bétail, mais aussi pour ses protéines et carotènes industriels et en diététique et elle est distribuée soit fraîche, pâturée ou coupée, soit séchée sous forme de foin soit séchée. Les opérations nécessaires au massage doivent être effectuées avec soin afin de ne pas perdre les feuilles, qui représentent l'essentiel de la valeur alimentaire

#### **III.3.1.5. Utilisation de la luzerne *Medicago Sativa* dans alimentation humaine**

Nourriture humaine sous forme de graines germées ou de petites pousses: La consommation de graines germées ou de jeunes pousses vertes de luzerne est très courante dans les aliments biologiques.

De toutes les graines germées couramment consommées par les humains, les graines de luzerne germées sont celles qui contiennent le plus grand nombre de vitamines. Elle est souvent présentée sous l'appellation « luzerne » pour éviter que le consommateur ait l'impression qu'il mange une plante fourragère.

### **Modification de l'alimentation humaine sous forme d'extrait de feuilles (EFL)**

L'extrait de feuille de trèfle », parfois appelé « fromage de trèfle », est le résultat de l'élimination des fibres qui empêchent l'absorption des composants dans les feuilles, puis de la coagulation du jus obtenu puis de son séchage. La vitamine C est parfois ajoutée à la fin du processus. Cet extrait de feuille apporte des protéines (EFL) contient 55 % de protéines et du fer aux populations qui n'ont pas accès à ces protéines. En 2006, les ONG hésitaient à y recourir.

### **III.3.1.6. Quelques atouts agronomiques de la luzerne**

#### **III.3.1.6.1. Favorise la biodiversité:**

Implantation sans labour, couverture permanente du sol pendant 3 à 4 ans, quasi absence de traitement phytosanitaire, fleurissement au moins partiel 4 fois par an, la luzerne a tout du refuge idéal pour la faune.

Après une expérimentation réunissant plusieurs acteurs de la filière luzerne et des associations environnementales, il a été prouvé que ces bandes biodiversités apportaient :

- a) Pour les papillons, un effet très positif pour la richesse spécifique et l'abondance des populations. Cette luzerne est une ressource alimentaire en nectar très fortement exploité par les papillons favorisant leur reproduction.
- b) Concernant les oiseaux, plusieurs observations ont mis en évidence que la luzerne permettait à des nichées d'être sauvées de la destruction mécanique liée au passage de la faucheuse, et que cet habitat fleuri constituait une source alimentaire en insectes pour les oiseaux.
- c) Pour l'abeille domestique, les bandes biodiversités sont une source privilégiée de nectar, permettant aux colonies de réaliser des réserves plus importantes que dans un paysage dépourvu de ces bandes fleuries. Le fort intérêt mellifère de la luzerne, qui se traduit directement pour l'apiculteur par des récoltes de miel plus importantes, a clairement été retrouvé.

#### **III.3.1.6.2. Économie d'azote**

La luzerne est capable de fixer l'azote atmosphérique, grâce à une symbiose entre la plante et une bactérie (*Rhizobium meliloti*) qui se fixe dans des nodosités de ses racines. La plante fournit aux bactéries des sucres et de l'énergie issus de la photosynthèse en échange de quoi les bactéries lui fournissent l'azote. La luzerne, en tant que légumineuse, ne nécessite aucun apport d'engrais azoté minéral pour sa croissance.

### **III.3.1.6.3.Érosion et sols**

La luzerne est une espèce pérenne, implantée pour 3 années au minimum. Elle assure ainsi une couverture des sols pendant l'hiver, ce qui joue un rôle très important dans la lutte contre l'érosion. Le système racinaire de la luzerne est très développé, composé d'un pivot profond et de racines secondaires ramifiées. Le pivot a un effet sur la structure du sol en le décompactant et permet à la plante d'aller puiser de l'eau et des nutriments dans des couches du sol inaccessibles pour les autres cultures.

### **III.3.1.6.34.Qualité de l'eau**

La luzerne joue un rôle dans la préservation de la qualité de la ressource en eau grâce à ses qualités épuratrices. Par son enracinement profond et sa pérennité, ses besoins en eau et l'utilisation privilégiée de l'azote minéral présent dans le sol, la luzerne installée limite sensiblement le lessivage des nitrates.

En cas de présence d'azote minéral ou de nitrates dans le sol, la luzerne va l'assimiler préférentiellement car cela lui coûte moins cher énergétiquement, ce qui réduit d'autant la fixation symbiotique. Elle joue ainsi un rôle épurateur très important. Son implantation pluriannuelle peut être assimilée à un dispositif enherbé temporaire et joue ainsi un rôle dans la diminution de la circulation superficielle de l'eau

## IV.1.La sélection végétale

### Historique

La première sélection remonte à 10 000 ans avec la domestication. L'homme a toujours utilisé, sans même s'en rendre compte, la sélection massale. Par la suite, divers travaux ont fait considérablement avancer les choses (**Fig. 37**)

1676 : découverte du rôle des organes reproducteurs

1845 : premiers travaux sur l'hybridation du Maïs par Henri Lecoq

1863 : premières hybridations entre espèces par Charles Naudin

1865 : début de la sélection généalogique grâce à Louis l'Evêque (Louis de Vilmorin) en démontrant l'intérêt de la sélection sur la descendance de la betterave

1866 : Lois de Mendel

1902 : découverte de la totipotence des cellules par Gottlieb Haberlandt

1908 : base de la sélection des hybrides sur Maïs par Shull

1912 : première sélection de blé par la méthode Bulk par Nilsson

1933 : premières variétés de Maïs hybride sont cultivées aux États-Unis

1935 : première carte génétique de certains gènes du Maïs par Emerson

1939 : nouvelle méthode, SSD (single seed descent), appliquée sur le blé par Golden

1950 : Technique de la culture *in vitro* (multiplication végétative sur la pomme de terre par Morel et Martin)

1953 : Watson et Crick arrivent à décrire la structure de l'ADN

1975 : premier hybride de tournesol obtenu par stérilité mâle génétique

1977 : découverte du transfert de gène sur bactérie par Schell

1983 : développement de la PCR par Kary Mullis, premières plantes transgéniques obtenues à partir du tabac grâce à des équipes belge et américaine

1985 : première variété de blé issue de la technique d'haplodiploïdation

2000 : séquençage du génome sur une brassicacée (*Arabidopsis thaliana*)

2002 : séquençage du génome du riz

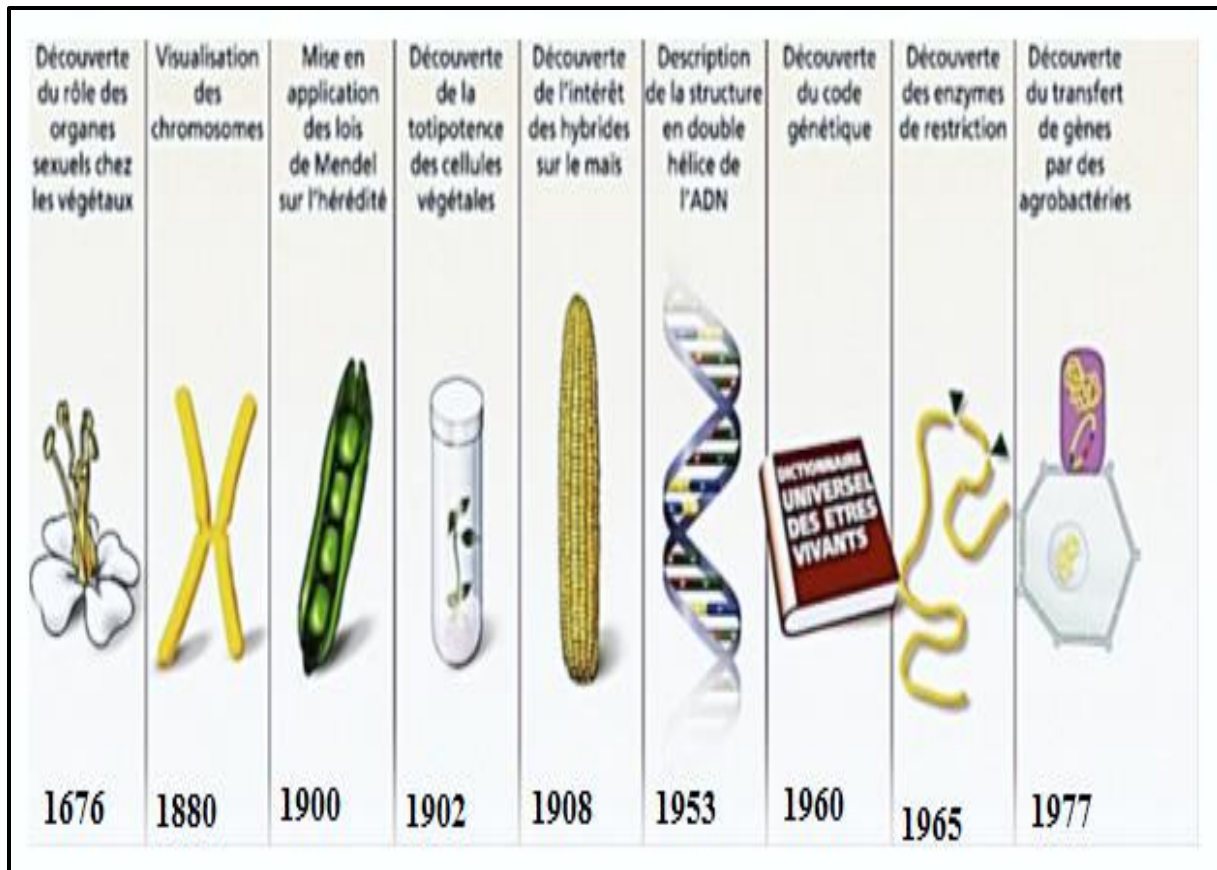


Figure 37 : Les repères historiques de la sélection

#### IV.1.1. Le principe de la sélection végétale

L'amélioration des plantes a pour but de créer de nouvelles variétés à partir de la diversité existante. Elle consiste à croiser deux plantes choisies pour leurs caractères intéressants et complémentaires afin de les réunir dans une seule. Par le choix des meilleures plantes dans la descendance, les sélectionneurs aboutissent après un long travail d'épurations successives à la création d'une nouvelle variété.

La sélection végétale est un processus utilisé pour améliorer les caractéristiques des plantes en choisissant et en croisant les variétés avec des traits désirables, comme la résistance aux maladies ou un rendement accru. Elle joue un rôle essentiel dans l'agriculture moderne, car elle permet de développer des cultures plus résistantes au changement climatique et adaptées aux besoins alimentaires mondiaux croissants. Grâce à des techniques avancées telles que la sélection génomique, la sélection végétale continue d'évoluer pour répondre efficacement aux défis agricoles contemporains

**IV.1.2. Les objectifs de la sélection végétale**

Les techniques de sélection artificielle ont pour objectif de créer des variétés correspondant aux besoins de l'homme pour les cultures, la consommation, l'état sanitaire ou encore l'impact environnemental. Les nouvelles variétés sont créées pour divers objectifs (**Tab. 04**).

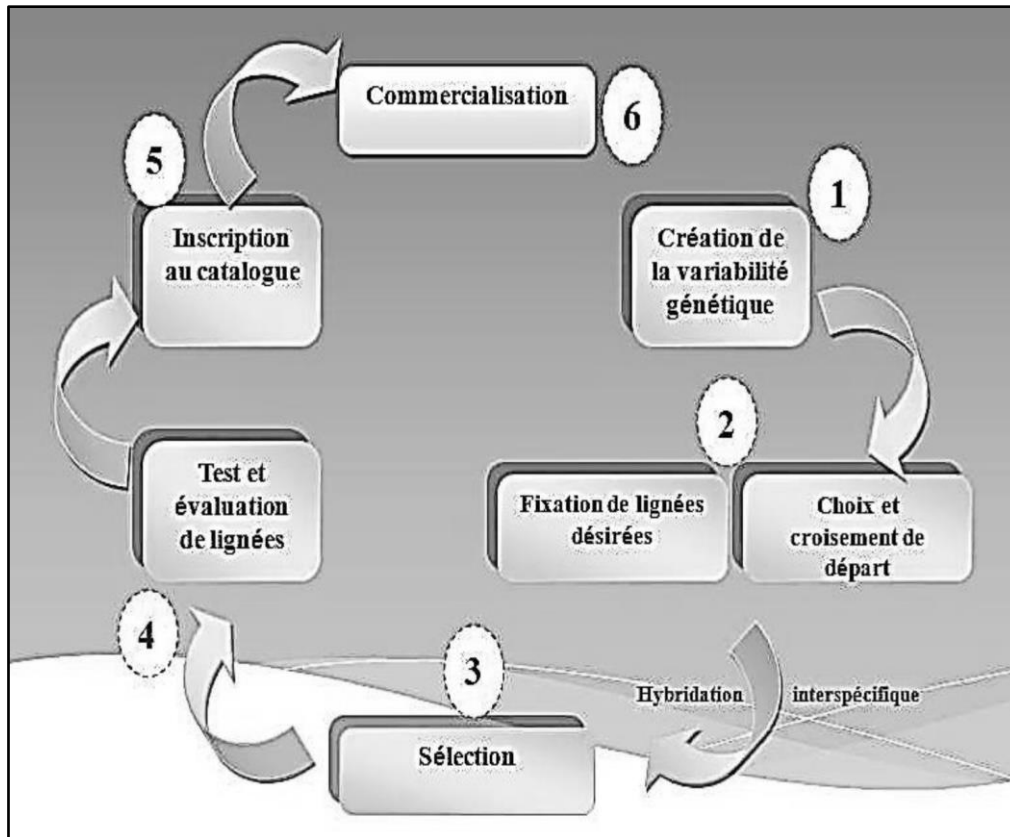
**Tableau 04:** les buts réalisés par la sélection végétale dans différents domaines

<b>Objectifs de cultures</b>	<b>Objectifs de consommation</b>	<b>Objectifs sanitaires</b>	<b>Objectifs environnementaux</b>
Augmenter la productivité	Augmenter les qualités nutritionnelles, gustatives et visuelles	Augmenter leur résistance aux maladies, parasites, agents infectieux	diminuer l'utilisation des produits phytosanitaires
Augmenter la durée de conservation	Stabiliser la sécurité alimentaire	Augmenter la production des molécules pouvant être utilisées dans l'industrie pharmaceutique	Lutter contre le changement climatique : réduire la stabilité au stress hydrique, améliorer l'adaptation aux sols et aux climats
<b>Objectifs de cultures</b>	<b>Objectifs de consommation</b>	<b>Objectifs sanitaires</b>	<b>Objectifs environnementaux</b>
Augmenter la productivité	Augmenter les qualités nutritionnelles, gustatives et visuelles	Augmenter leur résistance aux maladies, parasites, agents infectieux	diminuer l'utilisation des produits phytosanitaires
Augmenter la durée de conservation	Stabiliser la sécurité alimentaire	Augmenter la production des molécules pouvant être utilisées dans l'industrie pharmaceutique	Lutter contre le changement climatique : réduire la stabilité au stress hydrique, améliorer l'adaptation aux sols et aux climats

**IV.1.3. Les étapes de la sélection artificielle**

Les étapes de la sélection sont représentées dans le schéma suivant (**Fig. 38**).

- 1- Création de la variabilité génétique
- 2- Fixation de lignées désirées et choix de croisement de départ
- 3- Sélection
- 4- Test d'évaluation de lignées
- 5- Inscription au catalogue
- 6- Commercialisation



**Figure 38:** Les différentes étapes de la sélection artificielle

L'expérimentation au champ est indispensable pour évaluer les nouvelles variétés en conditions réelles de culture : diversité des conditions climatiques, pédologiques, compétition entre plantes, pression de maladies et de parasites.

De nombreuses disciplines, les biotechnologies, le traitement de l'information, la biologie, l'agronomie et la biochimie, offrent des outils précieux aux sélectionneurs et permettent d'accroître l'efficacité des programmes de sélection. L'expérimentation au champ ne prend donc en compte que des plantes dont le potentiel génétique est important. Ceci renforce l'efficacité du travail d'expérimentation, et peut également l'alléger en écartant des plantes de moindre intérêt.

Parmi ces techniques, les biotechnologies rassemblent : la biologie cellulaire dont la base est la culture *in vitro* de cellules végétales, la biologie moléculaire qui permet d'analyser et de caractériser l'information génétique par marquage moléculaire et de la modifier par génie génétique.

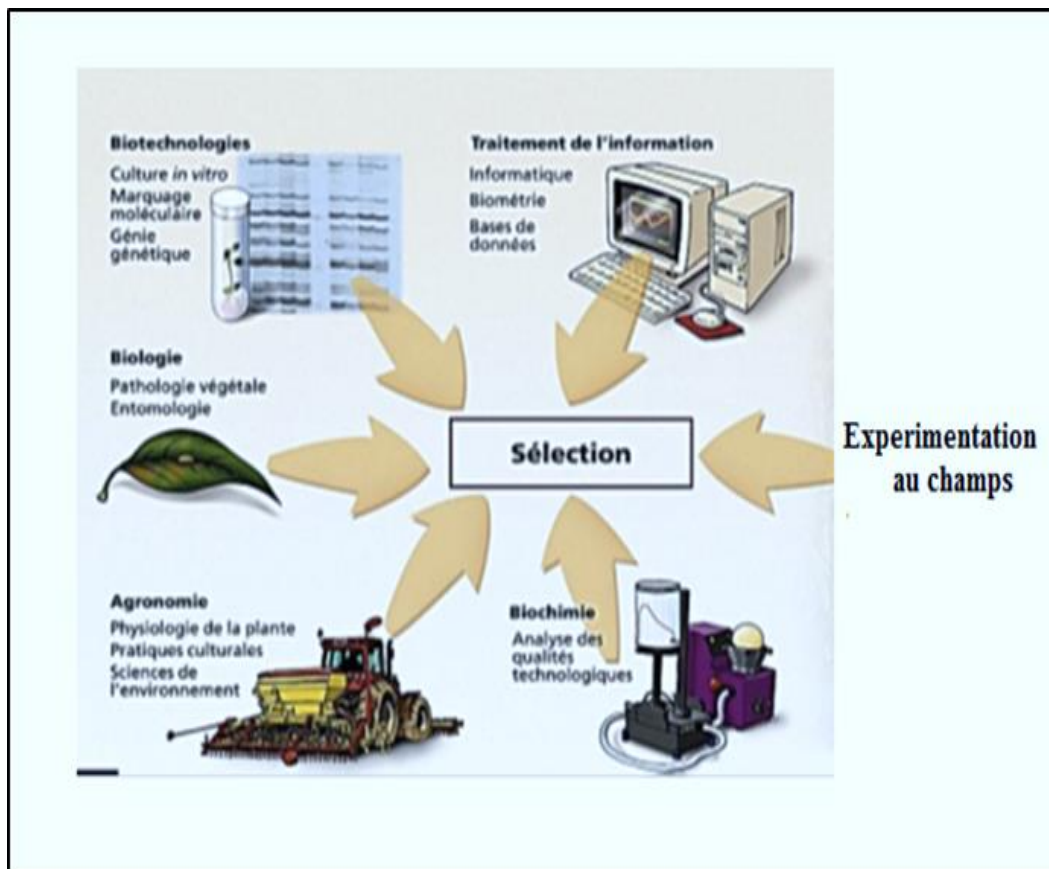


Figure 39: La sélection est une activité pluridisciplinaire.

#### IV.1.4.Sélection récurrente phénotypique

Il s'agit d'une méthode d'amélioration des plantes, cette fois les croisements sont contrôlés, ce qui conduit à la sélection de lignées ou d'hybrides. C'est l'aptitude d'une population à bien se croiser avec un testeur (Fig. 40). Il faut noter cependant que la sélection récurrente phénotypique malgré qu'elle soit bien convenue pour l'amélioration de caractères complexes mais elle est rarement utilisée en raison de la longueur de cycle.

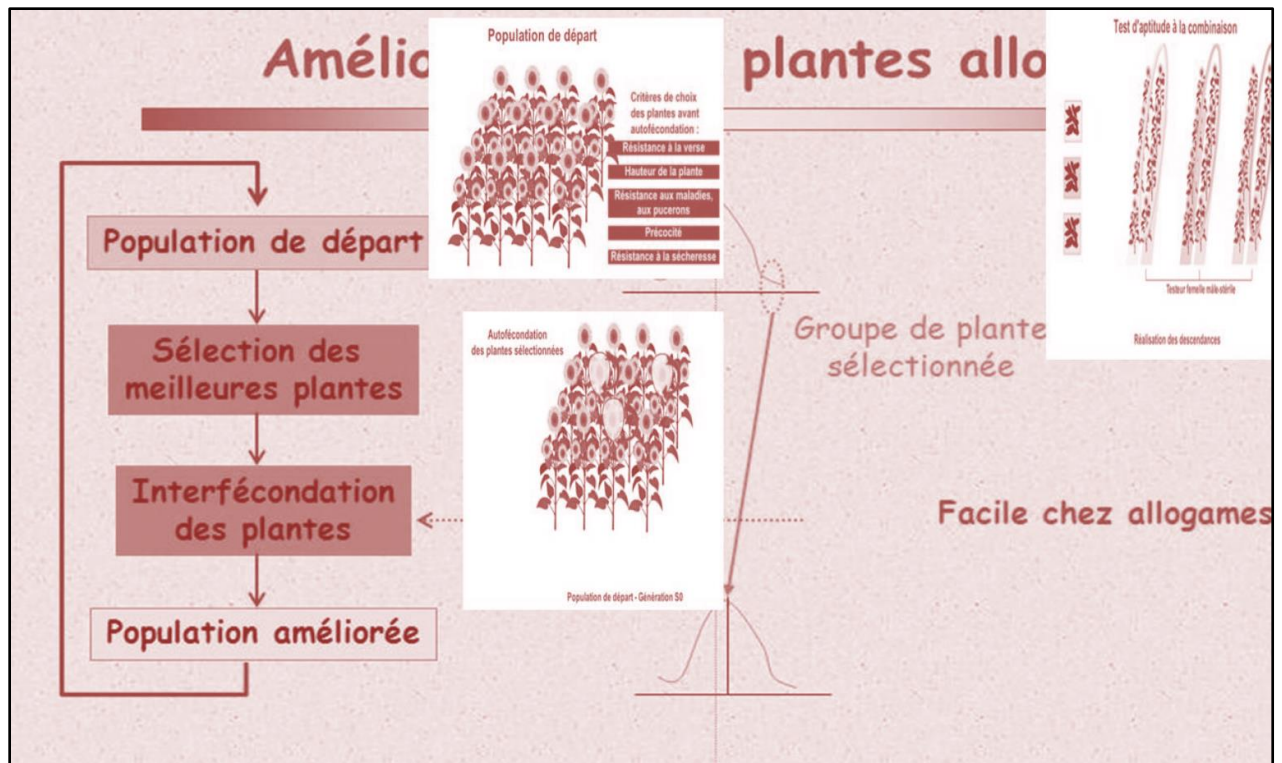


Figure 40: Les étapes de la sélection récurrente

#### IV.1.5. Le rétrocroisement

Le rétrocroisement ou back-cross est une des techniques de base de l'amélioration des plantes. Elle est utilisée pour introduire un gène qui code pour un caractère intéressant d'un parent dit donneur, dans le génome d'une variété existante élite de bonne valeur agronomique dite le parent récurrent (receveuse) mais il est déficient dans seulement quelques caractéristiques. Pour cela, on réalise une série de croisements entre la lignée receveuse (élite) et la plante donneuse du caractère. Les descendants ayant le caractère désiré sont ensuite croisés pendant plusieurs générations par la lignée élite receveuse (récurrente). Après le 7ème rétrocroisement, la part de la lignée élite receveuse est de 97%, c'est-à-dire que la lignée obtenue est quasiment identique ou isogénique de la lignée élite receveuse, mais contenant en plus le caractère désiré.

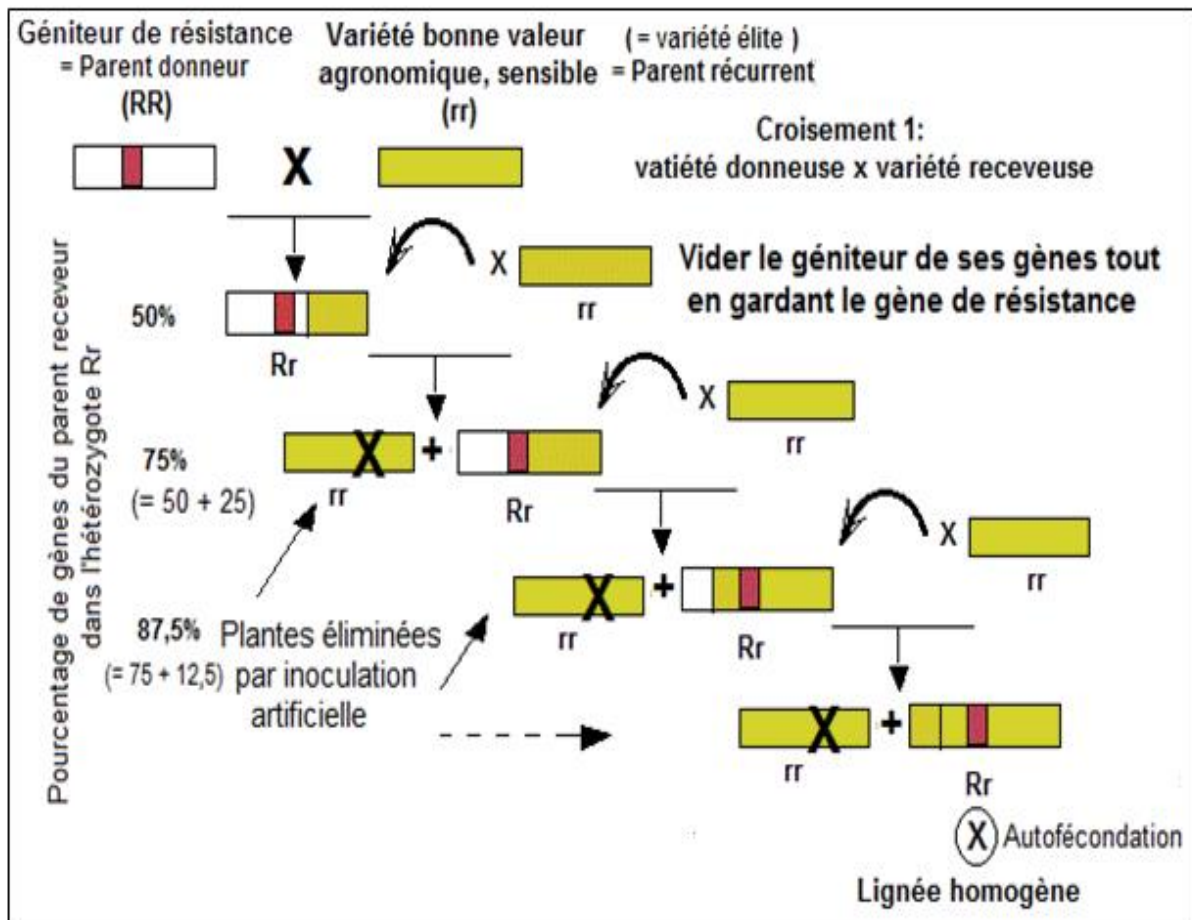


Figure 41: Rétrocroisement (back-cross) dans le cas d'un gène de résistance dominant

#### IV.2.La Sélection assisté par marqueurs moléculaires (SAM)

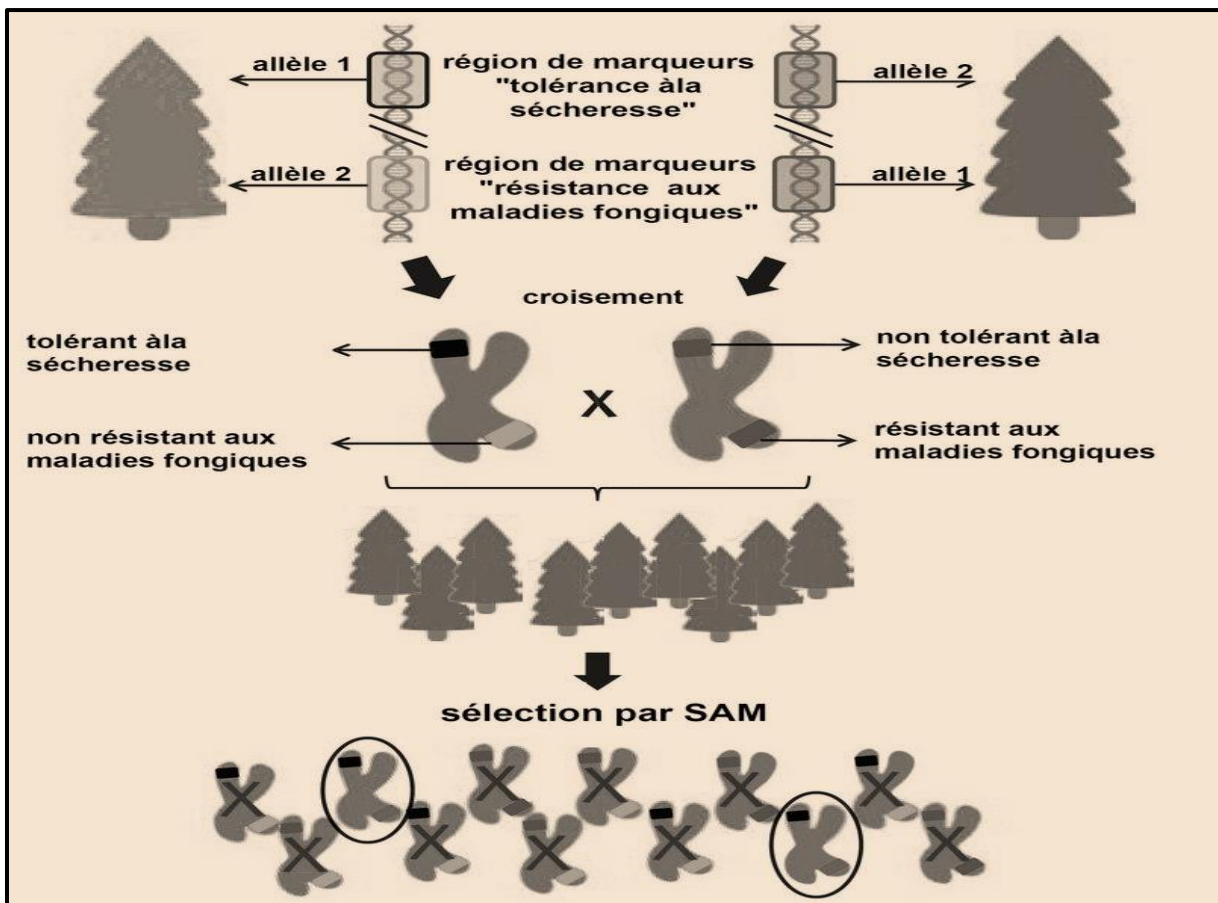
La sélection assistée par marqueurs (SAM) est une technique biotechnologique qui utilise des marqueurs génétiques pour identifier et sélectionner d'une manière efficace des caractères souhaités dans le génome des plantes ou des animaux. En facilitant le croisement d'individus porteurs de ces marqueurs, la SAM accélère le processus de sélection, permettant de développer des variétés améliorées plus rapidement que les méthodes conventionnelles.

Elle est largement utilisée en agriculture pour améliorer des traits comme la résistance aux maladies, le rendement et l'adaptation climatique. Il faut noter qu'il est nécessaire d'explorer les sources naturelles de résistance chez la plante pour déterminer le nombre, l'organisation et la nature moléculaire des gènes qui sont à l'origine de cette résistance. Cela implique également une bonne connaissance de l'organisation génomique des espèces naturellement résistantes, pour exploiter au mieux leurs facteurs de résistance en sélection.

SNPs ou SSRs sont les marqueurs utilisés dans la sélection assistée par marqueur moléculaire, ils sont situés près des gènes d'intérêts qui contrôlent les caractéristiques souhaitées .

**IV.2.1.Principe de sélection assistée par marqueurs (SAM)**

Le principe de la sélection assistée par marqueurs (SAM) est basé sur l'exploitation du déséquilibre de liaison (DL) entre des marqueurs moléculaires et le QTL afin de pouvoir transférer celui-ci dans des lignées de sélection (dites « élites »). Contrairement à la sélection traditionnelle basée uniquement sur le phénotype, la SAM est plus rapide, fiable (si les marqueurs sont proches du gène d'intérêt), précise (marqueur présent ou absent), souple (besoin de peu de matériel) et peu onéreuse. D'une manière générale la sélection assistée par les marqueurs moléculaires (SAM) présente un réel avantage sur la sélection phénotypique si le coût du phénotypage est supérieur à celui du génotypage et si la variation expliquée par les marqueurs est élevée. Il a été montré que la SAM est plus efficace à court terme et moins à long terme car elle sélectionne davantage les QTL à effet fort que les QTL à effet faible.



**Figure 42:** Sélection par marqueurs moléculaires

La sélection assistée par marqueurs s'appuie sur la recherche de marqueurs moléculaires tels que les SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) ou les microsatellites associés à des gènes

d'intérêts. Elle consiste à repérer des marqueurs dont la présence chez un individu peut être associée à la présence d'un gène (fort déséquilibre de liaison).

Et par la suite ces gènes permettent de faciliter la pratique des rétrocroisements, de mieux connaître le potentiel génétique de l'individu (prédit par exemple par un modèle de sélection génomique) ou encore de mieux prédire le résultat d'un croisement.

Cette sélection est particulièrement avantageuse lorsque le gène cible est récessif et/ou lorsque son expression est tardive ou influencée par les conditions de l'environnement.

Contrairement aux méthodes de sélection traditionnelles basées uniquement sur l'observation des phénotypes, la SAM permet une sélection plus rapide, fiable, souple et peu onéreuse et plus précise en se concentrant directement sur les informations génétiques car ces marqueurs permettent non seulement d'avoir une bonne idée de la valeur génétique d'individus sans avoir à appliquer de schémas de sélection coûteux en temps et en argent mais aussi peuvent servir à repérer la présence de certains gènes ayant un impact significatif sur les performances de l'organisme, appelés QTL (quantitative trait locus).

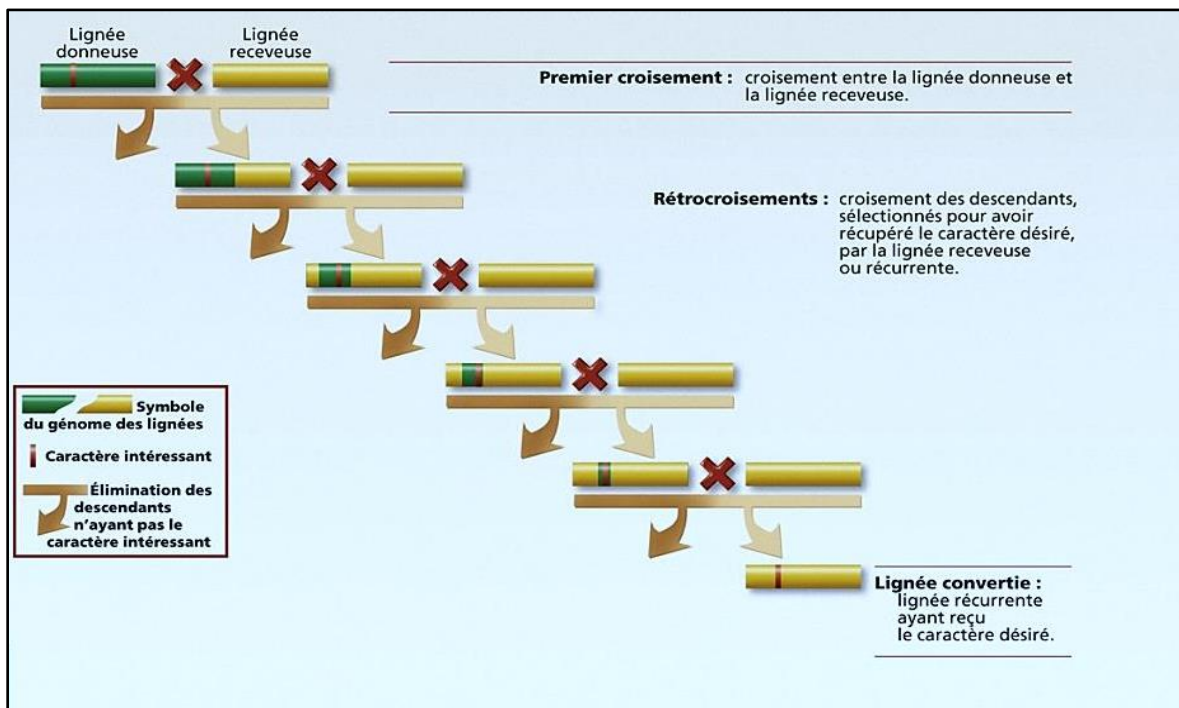


Figure 43: Introduction dans une lignée d'un caractère intéressant

#### IV.2.2.Méthodes de la SAM

Il s'agit d'une méthode basée sur l'association entre les marqueurs moléculaires et les gènes responsables des caractères d'intérêt. Elle réduit le besoin de cycles de sélection basés uniquement sur des observations phénotypiques, ce qui est avantageux pour préserver la

biodiversité tout en optimisant l'adaptation aux conditions locales ,utilisation des marqueurs pour identifier les individus adaptés à des milieux particuliers, sélection efficace des traits critiques tels que la tolérance à la sécheresse ou la résistance aux maladies.

### IV.2.3. Les étapes clés de la technique SAM

Le protocole de sélection assistée par marqueurs comprend plusieurs étapes clés visant à maximiser l'efficacité du processus de sélection :

**1. Cartographie Génétique** : La première étape de la SAM implique la création d'une carte génétique détaillée de l'organisme d'intérêt, mettant en évidence l'emplacement des marqueurs génétiques associés aux traits souhaités.

**2. Sélection** : Une fois que les marqueurs sont identifiés, les individus portant ces marqueurs peuvent être sélectionnés pour la reproduction, accélérant ainsi la fréquence des gènes désirés dans la population.

**3. Évaluation et validation** : Les progrès de la sélection sont évalués régulièrement pour confirmer l'efficacité des marqueurs choisis dans l'amélioration des caractéristiques cibles.

Cette méthode diminue énormément le temps nécessaire pour obtenir des générations avec les caractéristiques souhaitées.

Par exemple, si tu cherches à améliorer la résistance d'une variété de blé à une certaine maladie, tu peux utiliser des marqueurs liés aux gènes de résistance. En génotypant tes plants de blé, tu sélectionnes ceux qui possèdent ces marqueurs et donc, potentiellement, le gène de résistance.

### IV.2.4. Applications de SAM

Une des applications intéressantes de cette méthode est la conservation des espèces menacées. En utilisant les marqueurs, les gestionnaires d'environnement peuvent s'assurer que les espèces maintiennent la variabilité génétique nécessaire pour surmonter les défis futurs, tels que le changement climatique.

### IV.2.5. SAM et programmes d'introgession

Dans les programmes d'introgession, la sélection assistée par marqueurs permet un gain significatif en termes de nombre de générations nécessaires pour réduire le génotype donneur à un minimum dans la lignée introgressés.

Les marqueurs moléculaires sont souvent utilisés pour conduire la conversion car ils permettent de réduire les temps de sélection.

En effet, par sélection classique, un minimum de 7 backcross est nécessaire afin d'obtenir un retour vers le parent récurrent de 97%. Avec l'aide des marqueurs moléculaires, 4 rétrocroisements suffisent pour arriver au même résultat car on peut à chaque génération choisir les plantes ayant recombinaison le plus petit segment chromosomique.

Donc la technique du SAM, a pour principe est d'éliminer (vider) progressivement tous les gènes d'un géniteur donné comme un géniteur de résistance (parent donneur), sauf celui qui confère la résistance à une maladie

Les marqueurs moléculaires sont ainsi beaucoup utilisés pour les conversions de lignées pour un transgène. A chaque génération, les plantes ayant récupéré le transgène sont sélectionnées sur la base de caractérisation à l'aide de marqueurs moléculaires.

### **IV.2.5. Les programmes d'introgession assisté par marqueurs**

Ils sont destinés à modifier de manière ciblée un matériel génétique existant, en remplaçant un segment chromosomique initial par un segment porteur de caractéristiques favorables provenant d'un autre matériel. Le programme d'introgession est une approche avantageuse dans le cas de l'amélioration des résistances aux maladies et aux insectes.

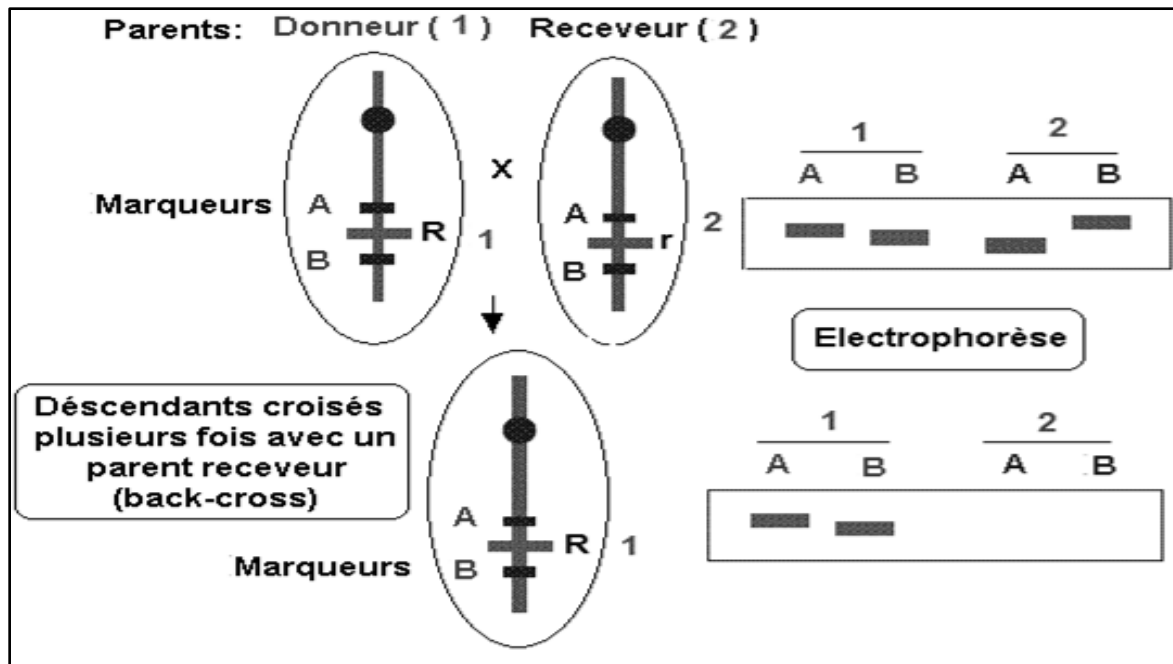
Elle peut se faire sans avoir recours aux tests d'inoculation, permettant ainsi d'éviter les erreurs associées à l'utilisation de ces procédures et de mener à l'amélioration de la résistance même dans les aires où le pathogène n'existe pas.

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.

L'utilisation des marqueurs dans des schémas de rétrocroisement est certainement la forme de SAM la plus utilisée actuellement en amélioration des plantes. L'objectif de ce type de schéma est de transférer un ou plusieurs allèles favorables provenant d'un individu dit « donneur » (souvent, par ailleurs, de mauvaise valeur agronomique) dans le fond génétique d'un individu dit « receveur » (souvent une lignée élite). Le principe général est de croiser durant plusieurs générations les descendants de l'hybride entre les deux parents avec le parent « receveur », de façon à réduire à chaque génération la proportion de génome « donneur » en dehors des zones cibles. À chaque cycle de rétro-croisement, les marqueurs peuvent être utilisés pour :

- sélectionner les individus qui possèdent les allèles « donneurs » que l'on souhaite transférer ;
- accélérer le retour au fond génétique « receveur » en sélectionnant les individus de génotype « receveur » à l'extérieur des zones chromosomiques cibles (**Fig. 44**).



**Figure 44 :** Marquage l'introgession d'un gène R provenant d'un parent donneur dans le génome d'un receveur à l'aide des marqueurs A et B mis en évidence par électrophorèse

Les marqueurs sont dans ce cas utilisés pour suivre l'introgession des allèles favorables au gène d'intérêt et accélérer le retour au fonds génétique élite souhaité (en utilisant des marqueurs moléculaires neutres répartis sur tout le génome).

Grace aux marqueurs moléculaires, qui permettent l'étiquetage de régions chromosomiques favorables à l'expression de caractères d'intérêt, la sélection assistée par marqueurs rend possible la construction des meilleures combinaisons de gènes.

#### IV.2.5.1. Exemple de l'introgession du gène Bt chez le Maïs

On réalise une série de back-cross ou rétrocroisement entre la lignée élite et la lignée génétiquement modifiée (OGM). Cette dernière est caractérisée par une insertion unique du gène Bt (transgène de résistance à la pyrale provoquant des ravages dans la culture du maïs) sur le chromosome1. Au cours des rétrocroisements, on peut sélectionner les individus porteurs du gène Bt, et ayant recombinaé le plus petit fragment de la lignée donneuse autour du gène Bt.

En effet, grâce aux marqueurs moléculaires, on sélectionne les individus ayant pour les marqueurs proches du gène, le génotype de la lignée élite. De plus, il est également possible d'accélérer le retour vers le parent élite grâce aux marqueurs moléculaires répartis sur l'ensemble du génome.

A chaque rétrocroisement, seront choisis les individus ayant le plus de fragments issus du parent élite récurrente. A la quatrième génération, on obtient une lignée quasi isogénique de la

lignée élite, c'est-à-dire identique à la lignée élite de départ, mais ayant intégré le gène Bt. Il y a donc bien gain de temps, donc d'efficacité.

La création de variétés résistantes par des rétro-croisements 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 et 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.

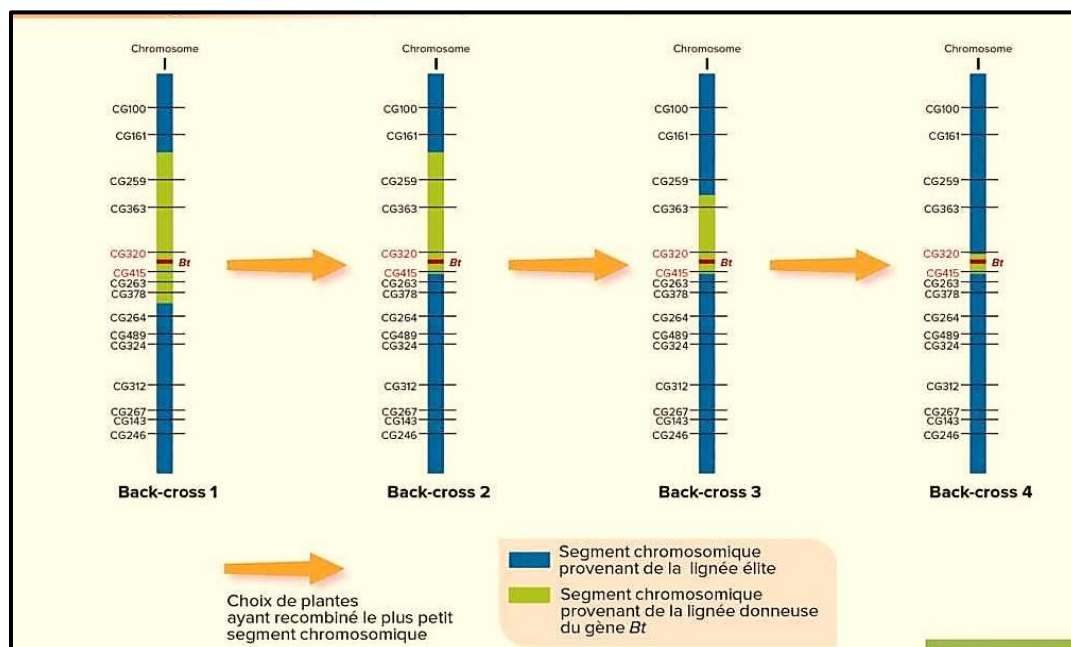


Figure 45: Introgression du gène Bt chez le Maïs

#### IV.2.6. Conversion assistée par marqueurs

Les rétrocroisements sont utilisés pour réaliser l'introgression d'un gène dans une variété élite. Cette approche est appelée également conversion. Mais en dépit d'un grand nombre de rétrocroisements, il reste toujours dans la lignée receveuse un plus ou moins grand segment du parent donneur autour du gène d'intérêt.

#### IV.2.7. Domaines d'application de la SAM

**1. Agriculture :** Dans le domaine agricole, la SAM est utilisée pour améliorer les cultures en ciblant des traits tels que la résistance aux maladies, la tolérance au stress environnemental et la qualité des récoltes.

**2. Élevage :** Dans l'élevage, la SAM est appliquée pour accélérer la sélection d'animaux présentant des caractéristiques souhaitables telles que la croissance rapide, la qualité de la viande, la résistance aux maladies, etc.

**3. Médecine :** En médecine, la SAM est utilisée pour la détection précoce de prédispositions génétiques à certaines maladies et pour la sélection d'embryons présentant des caractéristiques spécifiques, contribuant ainsi aux progrès de la médecine personnalisée.

### IV.2.7.1.Exemples de sélections assistées par marqueurs

C'est le cas des études de **Kölliker *et al.* (2005)** et de **Ghesquiere *et al.* (2011)** qui ont évalué l'application des marqueurs moléculaires pour optimiser la diversité génétique au sein d'un polycross issu d'un programme de sélection sur le ray-grass anglais. Dans les deux études, la sélection de parents génétiquement différents a conduit à de meilleures performances agronomiques lors des premières générations de multiplication grâce à une bonne exploitation de l'hétérosis.

L'utilisation de quelques marqueurs moléculaires permet donc de déterminer le père de chaque descendant afin de faire une sélection à la fois sur la mère et sur le père. Dans une étude sur le trèfle violet (*Trifolium pratense* L.), Il a été montré que les gains d'une sélection sur les deux parents étaient plus de deux fois plus grandes que les gains d'une sélection maternelle seule.

### IV.2.8.Sélection assisté par marqueur SAM en amélioration du blé

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 monogéniques favorise le développement de nouveaux biotypes capables de contourner cette résistance, 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.

Récemment, plusieurs gènes de résistance aux insectes et aux maladies ont été localisés dans le génome du blé dur par l'établissement de liaisons entre ces derniers et des marqueurs moléculaires sur les différentes cartes génétiques.

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. L'approche de cartographie des RGA (Resistance Gene Analogs)/ gènes candidats ouvre potentiellement la voie à l'identification gènes de résistance chez le blé. Cette caractérisation devrait permettre de

comprendre les mécanismes de défense mis en place par la plante lors de l'interaction avec le pathogène ou l'insecte.

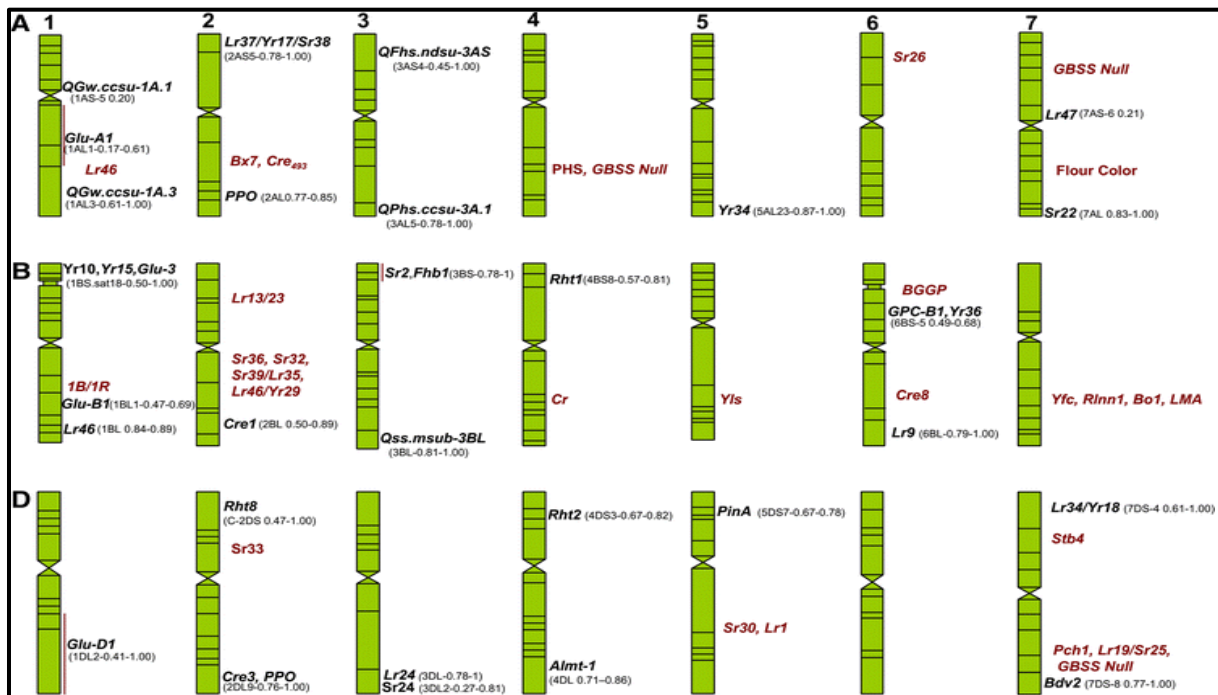


Figure 46: Localisation des gènes les plus utilisés dans l'amélioration du blé (Gupta *et al.*, 2010)

#### IV.2.9. Avantages et défis de la SAM

**Plus rapide :** quelques jours d'analyses au laboratoire suffisent pour établir un diagnostic de la présence ou de l'absence des gènes d'intérêt dans les plants en cours de sélection, donc elle réduit les coûts et le temps de développement des nouvelles variétés et améliore l'efficacité de la sélection en permettant la détection de caractères difficiles à observer, même à un jeune stade de développement.

La sélection assistée par les marqueurs moléculaires permet de trier rapidement un grand nombre de plantes à un stade précoce du processus de sélection afin de recommencer rapidement un nouveau cycle de sélection (Fig 47). Cette méthodologie de sélection permet de cumuler le plus vite possible le maximum de gènes favorables dans un même génotype donc elle permet de réduire considérablement le temps nécessaire à l'introduction de nouvelles variétés. Plusieurs années de travail de sélection peuvent ainsi être économisées pour chaque nouvelle variété produite.

**Plus précise :** détection fiable de la présence ou de l'absence du gène recherché, les marqueurs sont associés à des caractères tels que la résistance aux maladies, permettant une

sélection précise sans attendre la maturation de la plante, optimisant ainsi les programmes d'amélioration génétique.

**Non destructive** car l'analyse des plants est réalisée sur une très faible quantité de matériel végétal

**Non influencée** par des facteurs environnementaux

### Défis

Elle n'est pas compétitive en termes de coût et de temps par rapport aux méthodes de sélection traditionnelles, lorsque le phénotype peut être déterminé facilement exemple hauteurs des plantes, précocité, résistance à certaines maladies dont l'observation est facile, elle est souvent inefficace pour la sélection de caractères agronomiques à déterminisme génétique complexe comme le rendement, par exemple, gouvernés par un grand nombre de gènes ou de QTL (Quantitative Trait Loci) qui interagissent et dont la plupart sont encore inconnus.

Les défis de la sélection assistée par marqueurs incluent également la complexité de l'intégration de données génétiques, et les limitations des marqueurs disponibles pour certaines espèces. De plus, elle peut nécessiter une expertise technique considérable et les marqueurs identifiés peuvent ne pas être universellement applicables.



**Figure 47 :** La S.A.M permet le trie d'un grand nombre de plantes en sélection à un stade développement très précoce.

### IV.2.10. Comparaison entre méthodes de sélection traditionnelle et SAM

Par sélection classique, 6 rétrocroisements sont nécessaires pour obtenir un retour vers le parent receveur de 97 % alors qu'avec les marqueurs moléculaires 2 rétrocroisements

seulement suffisent. La conversion assistée par marqueurs permet un gain de temps de 2 à 3 ans.

Un des principaux objectifs des sélectionneurs est d'améliorer les cultivars existants qui manquent d'une ou de plusieurs caractéristiques désirées, en les croisant avec des lignées qui possèdent ces caractéristiques. Dans les schémas conventionnels de sélection, cette opération implique le croisement de génomes entiers, suivi de la sélection des meilleurs recombinants parmi les nombreux produits en ségrégation. Une telle procédure est très longue et laborieuse. Elle demande plusieurs croisements, plusieurs générations et une minutieuse sélection phénotypique. De plus, la liaison étroite entre les loci d'intérêt et des caractères indésirables rend ardue la réussite de ces schémas de sélection.

La sélection sur les seuls critères observables (phénotype) peut être longue et complexe pour les espèces à un cycle long, lorsque les caractères sont nombreux ou difficiles à évaluer, qu'ils s'expriment tardivement (longue phase juvénile) ...

Elle peut également être limitante car seule une partie du patrimoine génétique (génotype) d'un individu s'exprime. Ainsi si un individu a deux allèles, l'allèle dominant s'exprimera mais pas le récessif, or si c'est le récessif qui confère le caractère intéressant, savoir le repérer est utile pour l'exploiter à la génération suivante par exemple.

A l'inverse, la sélection sur le génotype grâce à la SAM peut être plus avantageuse dans de nombreux cas : espèces à croissance lente ou fort encombrement (arbres), caractère contrôlé par un allèle récessif, d'expression tardive (qualité du fruit chez les espèces à phase juvénile longue), difficile ou long à évaluer (résistance à certaines maladies) ...



**Figure 48:** prélèvement d'une très faible quantité de matériel végétal pour la réalisation de S.A.M au laboratoire.

#### **IV.2.11. Quels types de cultures bénéficient le plus de la sélection assistée par marqueurs**

Les cultures qui bénéficient le plus de la sélection assistée par marqueurs sont celles sujettes à des problèmes de maladies, de stress environnemental, ou nécessitant des améliorations rapides en qualité et rendement, comme les céréales (blé, riz), les plantes légumineuses, les fruits et légumes, ainsi que les cultures industrielles comme le coton.

#### **IV.3. Sélection pour la résistance au mildiou (*Erysiphe pisi* Syd.)**

##### **Introduction**

L'agriculture joue un rôle crucial dans notre société en fournissant une source essentielle de nourriture. Cependant, les maladies fongiques telles que le mildiou peuvent causer d'importants dommages aux cultures, entraînant des pertes économiques considérables.

La sélection pour la résistance aux maladies fongiques est un domaine de recherche et de développement crucial pour l'agriculture, visant à produire des variétés de plantes plus résistantes et à réduire les pertes de rendement causées par ces infections.

La sélection pour la résistance au mildiou (*Erysiphe pisi* Syd) est un sujet important dans le domaine de l'agriculture et de la génétique des plantes.

La résistance au mildiou peut être obtenue par le biais de programmes de sélection de plantes. Ces programmes visent à identifier et à cultiver des variétés de plantes qui présentent une résistance naturelle ou une tolérance accrue à la maladie. La sélection de plantes résistantes au mildiou implique souvent des croisements entre différentes variétés de plantes pour introduire et combiner des gènes de résistance.

##### **IV.3.1. Définition**

Le mildiou est une maladie fongique qui affecte un certain nombre de cultures, y compris les pois, et qui peut causer des pertes importantes de rendement si elle n'est pas contrôlée



**Figure 49 :** taches blanches sur les feuilles causées par le mildiou

### **IV.3.2.Mildiou de la tomate**

Le mildiou de la tomate, également connu sous le nom d'*Erysiphe pisi* syd, est une maladie cryptogamique qui affecte les tomates. Il est causé par le champignon *Erysiphe pisi*. Cela provoque des taches brunes sur les feuilles et les fruits, ce qui peut entraîner leur pourrissement. C'est important de prendre des mesures pour prévenir et contrôler le mildiou dans les cultures.



**Figure 50:** Symptôme de mildiou de la tomate

La résistance fait référence à la capacité d'une plante à se défendre contre les attaques de maladies ou de ravageurs. Dans le cas il existe deux principaux types de résistance au mildiou de la tomate

### **IV.3.3.Types de résistance au mildiou**

#### **A.La résistance verticale**

Est une résistance spécifique à une souche ou à un type de mildiou. Ce type de résistance est généralement efficace pendant une courte période, car le champignon peut évoluer et développer des souches capables de surmonter la résistance.

#### **B.La résistance horizontale**

Est une résistance qui est efficace contre un large éventail de souches ou de types de mildiou. Ce type de résistance est généralement plus durable que la résistance verticale

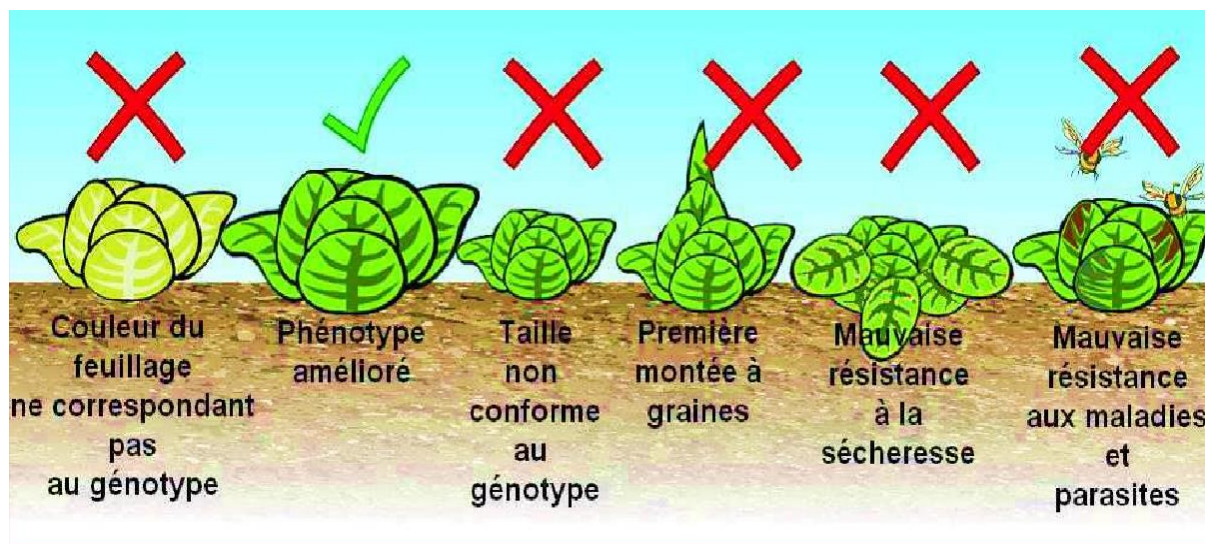
### **IV.3.4.Méthodes de sélection au mildiou**

La sélection pour la résistance au mildiou de la tomate est une approche prometteuse pour développer des variétés plus résistantes. Cela permet de réduire les pertes de récolte et de

promouvoir une agriculture plus durable. Cependant, il est important de prendre en compte les limites et de trouver un équilibre avec d'autres méthodes de gestion des maladies. C'est passionnant de voir comment la science peut aider à protéger nos cultures.

#### **IV.3.4.1. La sélection massale**

Consiste à sélectionner les plantes les plus résistantes à partir d'une population de plantes.



**Figure 51 : Sélection massale**

#### **IV.3.4.2. La sélection généalogique**

Consiste à croiser des plantes résistantes entre elles pour produire des descendants qui héritent de la résistance

##### **Exemples de variétés résistantes**

Le Défiant est une variété de tomate hybride qui a été développée pour être résistante au mildiou. Elle est une bonne variété pour les jardiniers débutants et expérimentés, car elle est facile à cultiver et résistante aux maladies.



**Figure 52 : Le Défiant (tomate hybride résistante au mildiou)**

L'Early Girl est une variété de tomate hybride qui a été développée pour être précoce et résistante au mildiou. Elle est une variété indéterminée, ce qui signifie que les plantes continuent et produisent des fruits pendant toute la saison.



**Figure 53 :** Early Girl (Tomate hybride résistante au mildiou)

La Mountain est une série de variétés de tomates développées par le Dr Randy Gardner. Ces variétés sont connues pour leur résistance au mildiou, ainsi qu'à d'autres maladies et insectes courants. Cette série comprend les variétés suivantes : *Mountain magic* ; *Deflant PHR*; *Plum regal*; *Mountain mertz*



**Figure 54:** variétés résistantes de tomates

**A:** *Mountain magic* ; **B :** *Deflant PHR*; **C:** *Plum regal*; **D:** *Mountain mertz*

### IV.3.4.3. Les avantages de la sélection pour la résistance au mildiou de la tomate

La sélection pour la résistance au mildiou de la tomate permet de réduire la réduction des pertes de récolte, aussi l'amélioration de la qualité des récoltes et la réduction de l'utilisation

de pesticides. Cependant, il y a aussi des limites à la sélection. Parfois, la résistance peut être spécifique à un certain type de mildiou, de plus, les exigences agronomiques. En fin de compte, la sélection pour la résistance est une stratégie prometteuse, mais elle doit être utilisée de manière équilibrée avec d'autres méthodes de gestion des maladies.

### IV.4. Mildiou de la vigne

La plante et l'agent pathogène se livrent en permanence une lutte acharnée, de laquelle dépendent leurs survies respectives. Dans ce combat naturel, l'homme est obligé d'intervenir en faveur de la plante pour ne pas voir ses cultures ravagées par les maladies. Il développe pour cela des moyens de lutte pour enrayer le développement des parasites nuisibles.

Les variétés traditionnelles de vigne nécessitent de très nombreux traitements phytosanitaires pour lutter contre les maladies cryptogamiques qui touchent leurs parties herbacées, comme le mildiou et l'oïdium, causés par *Plasmopara viticola* et *Erysiphe necator* respectivement.

En théorie, ces moyens doivent rassembler un maximum de qualités et démontrer leur efficacité, et dans le même temps avoir un impact négatif minimum sur les plantes et l'environnement.

La réalité en est souvent éloignée, néanmoins si aucune solution n'est parfaite, il est important de réfléchir aux meilleurs moyens d'y parvenir.

Ces traitements, coûteux et préjudiciables pour l'environnement, pourraient être réduits par l'emploi de variétés résistantes.

Dans ce sens, de nombreux travaux de recherche menés dans les espèces d'intérêt agronomique, dans le but de contrôler le développement des maladies, visent à introgresser des gènes de résistance issus de variétés sauvages résistantes, dans les variétés élites cultivées sensibles.

La présence de ces régions peut protéger intégralement et efficacement contre plusieurs souches d'agents pathogènes en présentant des effets collatéraux mineurs.

Chez la vigne, plusieurs programmes d'amélioration et de sélection variétale par croisements ont déjà été engagés, ouvrant une voie prometteuse à la commercialisation de variétés résistantes conservant des qualités agronomiques et œnologiques de très haut niveau.

La création de nouvelles variétés résistantes nécessite une bonne connaissance des mécanismes de défense de la plante lors d'une attaque pathogène, et du déterminisme génétique de ces défenses.

Afin d'optimiser la gestion des résistances provenant de cette espèce dans les programmes d'amélioration variétale, il est nécessaire de comprendre l'organisation génétique et

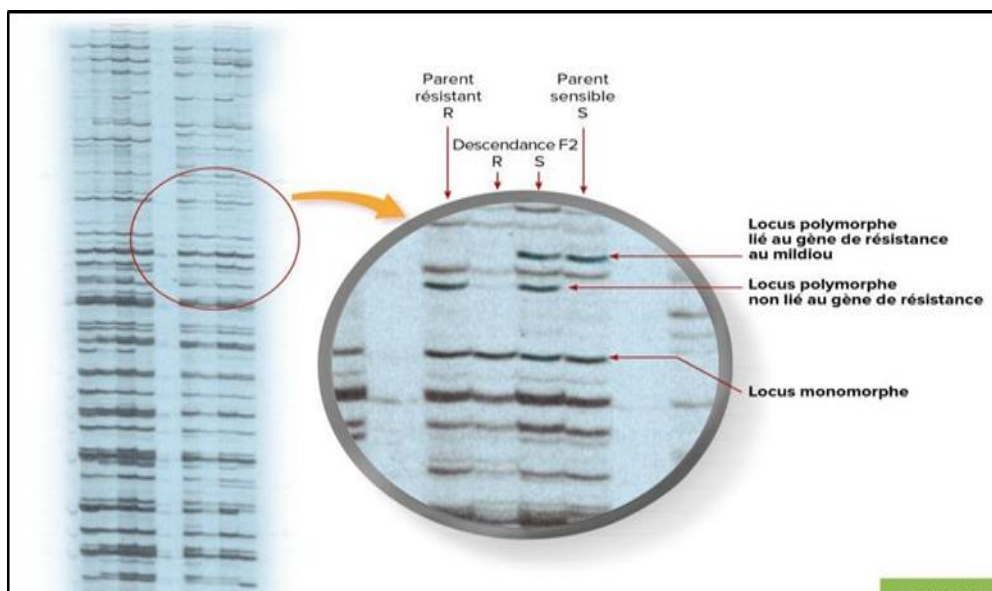
génomique de *M. rotundifolia*, et de compléter la connaissance des facteurs de résistance issus de cette espèce.

#### IV.5. La résistance du tournesol au mildiou

Sur les quatre pistes est mise en évidence la ségrégation pour la résistance du tournesol au mildiou. Sur la piste de gauche, c'est le parent résistant (R), sur la piste de droite le parent sensible (S). Sur les deux pistes centrales figurent les individus F2 : la deuxième piste en partant de la gauche correspond à l'ADN en mélange des descendants F2 résistants et la troisième piste à l'ADN en mélange des descendants F2 sensibles. Parmi la centaine de fragments d'amplification séparés par électrophorèse, on peut visualiser des locus polymorphes. Il est notamment possible de mettre en évidence des bandes présentes chez le parent sensible et absentes chez le résistant, et inversement. Cette distinction se retrouve également dans la descendance. Ces locus sont donc liés au gène de résistance par absence ou présence de bande. Les autres locus soit ne révèlent pas de polymorphisme, soit révèlent des marqueurs polymorphes mais ne permettent pas de faire la distinction entre les individus sensibles et les individus résistants, ils ne sont donc pas liés à la résistance. (Fig. 55).

##### IV.5. 1. Utilisation de la technique

Elle est utilisée notamment pour la sélection de lignées, et pour la saturation d'une région du génome au voisinage d'un gène en vue de son clonage, c'est-à-dire pour positionner dans cette région un grand nombre de marqueurs.



**Figure 55:** Analyse d'un profil AFLP (Caractéristique du polymorphisme): exemple ségrégation pour la résistance au mildiou chez le tournesol

### IV.6. La sélection pour la résistance à la fusariose (*Fusarium oxys purum* F.S.P)

#### Introduction

La fusariose vasculaire est un terme générique qui désigne un groupe de maladies fongiques causées par une grande diversité de champignons de l'espèce *Fusarium oxysporum*. Ce nom est en lien direct avec la forme en fuseau des spores. L'agent pathogène envahit les vaisseaux du xylème et bloque rapidement la circulation des éléments nutritifs, dont les plantes flétrissent et meurent brutalement.

Une fusariose causée par *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (FOV), constitue une menace croissante pour la production cotonnière mondiale. Développer des variétés résistantes/tolérantes au FOV4 est devenu une urgence.

#### Définition

Les champignons *Fusarium* sont un grand genre de champignons du sol répandus dans le monde. La plupart des espèces sont des saprophytes inoffensifs et sont des membres relativement abondants de la communauté microbienne du sol. Cependant, certaines espèces de *Fusarium* sont économiquement importantes en raison de leur effet dévastateur sur les cultures, les champignons *Fusarium* provoquent le flétrissement vasculaire, la pourriture des racines, la pourriture du pied et de la tige, la brûlure vasculaire des feuilles, la pourriture des fruits, la brûlure de l'épi des grains et la pourriture après la récolte.

#### *Fusarium oxysporum*

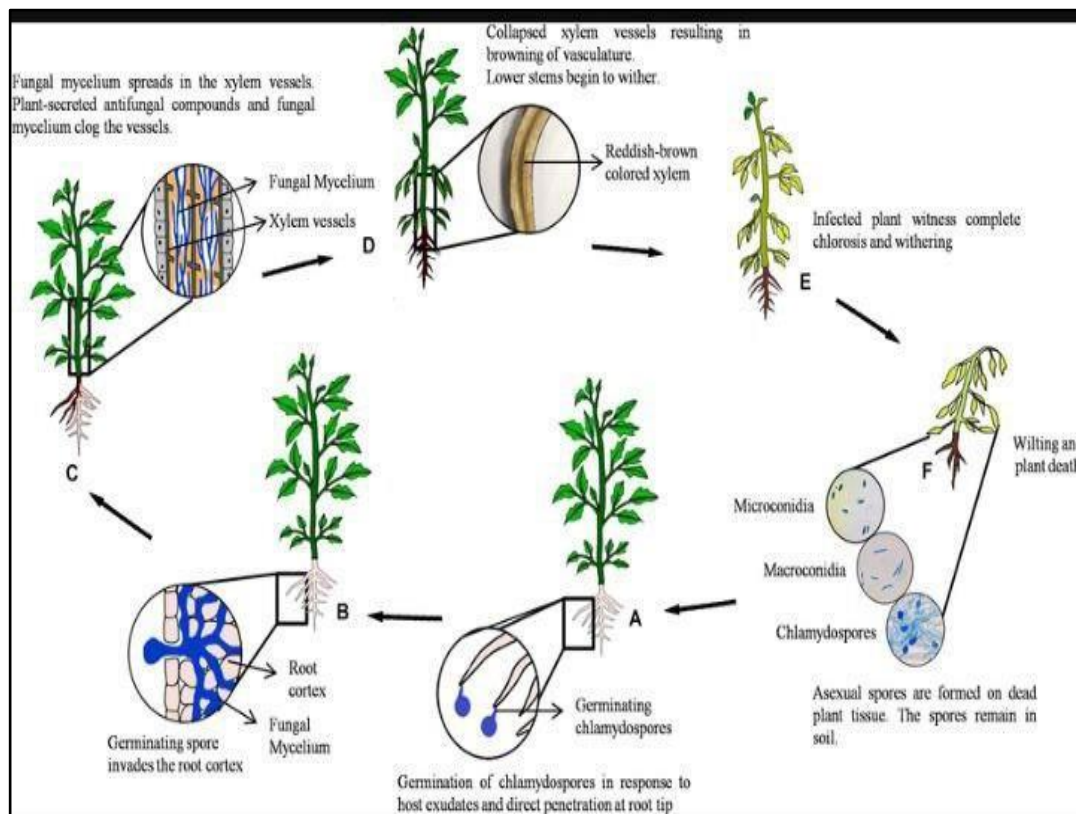
C'est le type qui provoque le flétrissement vasculaire. Tout d'abord, les feuilles jaunissent et flétrissent, principalement sur un côté de la plante, puis la plante entière se flétrit. D'autres symptômes sont une décoloration brune des vaisseaux du xylème, qui on peut le voir en coupant les tiges des bananes. Elles peuvent mourir. Des feuilles entières et le sol peuvent ne plus être adaptés à l'agriculture pendant de nombreuses années.

#### Quelles plantes attaque-t-il ?

Par le sol il attaque les plants de pomme de terre, de tomate, d'aubergine et de poivron, par les racines.

#### IV.6.1. Cycle de vie du champignon

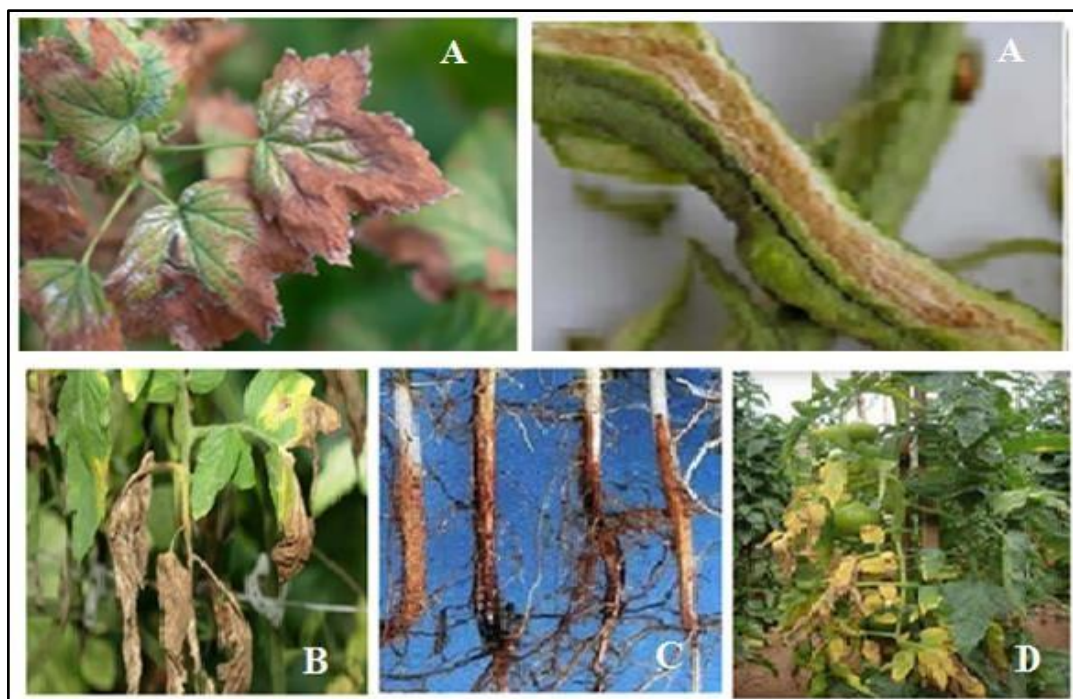
- a) Survie dans le sol : sous forme de chlamydospores résistantes.
- b) Germination : en présence d'humidité et de racines hôte
- c) Pénétration : via les poils absorbants ou les blessures des racines.
- d) Colonisation : le champignon envahit le xylème.
- e) Production de toxines : empêchant le transport de la sève brute
- f) Flétrissement et mort : due au manque d'eau.



**Figure 56:** Cycle de vie du champignon *Fusarium oxysporum*

#### IV.6.2. Les symptômes de la fusariose

- a-** apparition de taches brunes sur les feuilles et les tiges
- b-** la chute des feuilles
- c-** des gonflements et des dommages aux racines
- d-** le jaunissement de feuilles intérieures



**Figure 57** : symptômes de la fusariose. **A** : apparition de taches brunes sur les feuilles et les tiges ; **B** : chute des feuilles ; **C** : gonflements et des dommages des racines ; **D** : jaunissement des feuilles intérieurs

### IV.6.3. La lutte contre la fusariose

#### IV.6.3.1. La lutte chimique

La fumigation du sol avec un fongicide à large spectre, est une méthode de lutte potentielle qui fournit un bon contrôle préventif mais ce n'est pas une méthode de combat infaillible en raison de son impact négatif sur les organismes vivants.

A l'heure actuelle, outre le phylloxera qui est maintenant parfaitement enrayé grâce au processus de greffage, le principal moyen de lutte contre les maladies qui touchent le plus sévèrement les vignobles par exemple est l'utilisation de pesticides et fongicides en grande quantité.

#### IV.6.3.2. Lutte biologique

Le bio contrôle consiste à utiliser des champignons antagonistes tels que les souches non pathogènes de *F. oxysporum*, *Trichoderma* spp, et des bactéries telles que *Pseudomonas fluorescens* et *Burkholderia cepacia*. Bien que promettant, aucun de ces microorganismes n'a été utilisé pour contrôler la fusariose en pratique jusqu'à présent.

Dans certains cas, la lutte biologique peut s'avérer efficace contre les agents pathogènes nuisibles chez la vigne.

. Un exemple est présenté dans les travaux de Musetti *et al.* (2006), qui démontrent que l'endophyte de la vigne *Alternaria alternata* induit des modifications de l'ultrastructure du mycélium de *F. oxysporum*.

### **IV.6.3.2.1. Les stimulateurs de défense naturelles (SDN)**

Un moyen d'améliorer la lutte de la plante contre les attaques des agents pathogènes est de stimuler ses propres défenses. Ce phénomène d'activation d'un processus de défense suite à la reconnaissance d'une molécule liée à l'agresseur (produite par l'agresseur ou résultant de l'agression) est appelé « élicitation ». En d'autres termes, on stimule le potentiel immunitaire des plantes par des substances ou produits biologiques appelés « stimulateurs de défense naturelle » ou SDN.

Ces molécules activent la défense systémique induite de la plante. L'utilisation de ces SDN en champ peut être couplée à l'utilisation de fongicides et permet ainsi d'améliorer la défense de la plante, tout en diminuant les quantités de fongicides appliquées.

### **IV.6.3.3. La lutte génétique**

La résistance génétique au *Fusarium* chez les tomates est une caractéristique héritée présente dans certaines variétés de tomates. Ces variétés contiennent des gènes qui les aident à résister à l'infection par la maladie de *Fusarium*.

La résistance au *Fusarium* est complexe et partielle. Un grand nombre de locus quantitatifs (QTL) ont été associés à la résistance.

Chez le blé par exemple il a été constaté que plusieurs QTL ont démontré un effet important quant à la résistance à la maladie, dont le QTL-Fhb2, localisé sur le chromosome 6BS .

## **IV.7. Méthodes de sélection de la fusariose**

### **IV.7.1. La sélection classique**

La méthode du "backcross" peut être utilisée pour sélectionner des tomates résistantes à la fusariose en croisant des plantes de tomates résistantes avec d'autres plantes ayant des caractéristiques spéciales. Les plantes résistantes sont sélectionnées et croisées ensemble pour obtenir des plantes exceptionnelles qui combinent la résistance à la fusariose avec d'autres caractéristiques désirables. Cette méthode nécessite de l'expérience et des efforts.

### **IV.7.2. La sélection par marqueurs**

La sélection par les marqueurs moléculaires pour la fusariose est une méthode utilisée dans le processus de sélection des plantes résistantes à cette maladie. Les chercheurs identifient des marqueurs génétiques spécifiques liés à la résistance à la fusariose. En utilisant ces

marqueurs, ils peuvent détecter plus précisément les gènes de résistance dans les plantes en développement, accélérant ainsi le processus de sélection des variétés résistantes. Cela permet d'améliorer la précision et l'efficacité de la sélection des plantes résistantes à la fusariose.

### **Comment se propage le parasite et son cycle de vie**

Le champignon peut bien survivre dans le sol, parfois pendant plus d'un an, et peut également survivre dans d'autres objets tels que des pots, des bancs, du matériel d'irrigation, des réservoirs de solution nutritive et des débris végétaux. Il peut vivre à une grande profondeur de 100 à 150 cm. et tolère la sécheresse et l'engorgement important. Il se propage par l'eau et les insectes.

### **IV.8. Les étapes de la sélection pour la résistance à *Fusarium oxysporum* f. sp.**

Elle implique généralement les étapes suivantes :

**A-** Collecte de la diversité génétique : Il est important de rassembler une large variété de plantes pour évaluer leur résistance à la fusariose.

**B-** Inoculation et évaluation : Les plantes sont exposées au champignon *Fusarium oxysporum* f. sp. pour évaluer leur degré de résistance. Cela peut se faire en laboratoire ou sur le terrain.

**B-** Sélection des individus résistants: Les plantes qui présentent une résistance plus élevée aux maladies sont sélectionnées pour la reproduction.

**D-** Croisements sélectifs : Les individus résistants sont croisés pour augmenter la fréquence des gènes de résistance dans la population.

**E** - Tests de descendance: Les plantes issues des croisements sont à leur tour évaluées pour leur résistance à la fusariose.

### **Technologie d'édition du génome CRISPR Cas9**

Sert à remplacer le gène défectueux (sensible) au même endroit dans le génome par un gène qui confère une résistance à la fusariose, c'est-à-dire transférer (conjuguer) un gène de la même espèce. Elle sert également à :

- a) identifier les gènes qui ont été activés par le champignon, c'est-à-dire vérifier la fonction des gènes en les faisant taire
- b) Utiliser les méthodes d'hybridation classiques

## **IV.9. Sélection pour la précocité de floraison**

### **IV.9.1.Introduction**

La sélection pour la précocité de floraison est une méthode utilisée en amélioration variétale pour développer des variétés plus précoces. Une floraison précoce constitue donc une stratégie d'évitement dans les milieux peu favorables et instables.

La précocité de floraison est un trait agronomique important pour de nombreuses espèces cultivées. Pour les plantes annuelles, la date de floraison est un compromis entre la croissance végétative et la reproduction. Une floraison précoce permet de profiter d'une période de croissance plus courte, mais peut limiter le développement de la plante et donc sa production.

La date de floraison est un trait majeur qui permet aux plantes de s'adapter à leur environnement. Elle est particulièrement déterminante pour le succès reproducteur des plantes annuelles, qui meurent après un seul épisode de floraison et de fructification.

Dans les milieux naturels, la précocité de floraison des plantes annuelles varie selon les espèces, mais aussi entre les populations d'une même espèce croissant dans différents environnements.

Cette variation répond à ce que les biologistes des populations appellent un « compromis évolutif ». En effet, lorsque le milieu est favorable, une floraison tardive permet une longue période de développement et de croissance des organes végétatifs (racine, tiges, feuilles) et donc une forte production de biomasse qui permet à son tour de produire beaucoup de graines. Au contraire, une durée de vie brève associée à une floraison précoce diminue le risque d'exposition à des attaques d'herbivores et de pathogènes dans des conditions climatiques défavorables.

La floraison est le processus biologique de développement des fleurs, contrôlé par l'environnement et les phytohormones.

### **IV.9.2.Importance de la précocité de floraison**

La précocité de floraison est importante pour plusieurs raisons. Elle permet d'adapter les plantes à des conditions climatiques défavorables, comme les gelées précoces ou les sécheresses. Elle permet également de réduire le risque d'attaques par les ravageurs et les maladies. Dans le contexte du changement climatique. Les variétés précoces sont donc mieux adaptées à ces conditions nouvelles.

#### **IV.9.2.1. Importance agronomique de la précocité de floraison**

La précocité de floraison est également un trait important dans l'évolution des plantes cultivées. Elle conditionne en effet directement les zones de cultures possibles de nombreuses espèces et constitue un critère majeur de sélection en amélioration variétale.

Un bon exemple est celui du Maïs, une plante d'origine tropicale pour laquelle la sélection de variétés précoces, moins exigeantes en températures élevées pour leur développement, a rendu possible la culture dans les régions tempérées.

Dans le cas du blé tendre, une graminée d'origine tempérée, il existe des variétés de printemps à cycle court, cultivées dans les régions froides du globe ou la mortalité hivernale des variétés d'hiver serait trop élevée (Canada, Russie).

On peut encore citer un exemple le pois protéagineux, pour lequel les variétés tardives permettent une meilleure adaptation de la culture aux climats froids par évitement des gelées de fin de printemps (une plante qui n'a pas encore initié sa floraison est plus résistante au froid).

#### **IV.10. Les facteurs influençant la précocité de floraison des fruits et légumes**

La précocité de floraison des fruits et légumes est influencée par plusieurs facteurs, notamment :

##### **-Conditions environnementales**

Les conditions environnementales telles que la température, la lumière, l'humidité et la disponibilité de l'eau peuvent influencer la précocité de floraison des plantes.

##### **-Génétique**

La précocité de floraison est un trait polygénique, c'est-à-dire qu'elle est contrôlée par de nombreux gènes. Ces gènes agissent en synergie pour déterminer le moment de la floraison. Certains gènes de la précocité de floraison sont liés à la sensibilité aux températures, ces gènes contrôlent la vitesse à laquelle les plantes accumulent les degrés-jours, c'est-à-dire la somme des températures supérieures à un seuil donné. Les plantes qui accumulent les degrés-jours plus rapidement fleurissent plus tôt. D'autres gènes de la précocité de floraison sont liés à la synthèse des hormones végétales. **(Fig. 58)**

Les caractéristiques génétiques des plantes jouent un rôle important dans la régulation de la floraison. Les variétés sélectionnées pour leur précocité de floraison peuvent présenter des gènes spécifiques qui favorisent ce trait.

### **-Pratiques culturales**

Les pratiques culturales telles que la fertilisation, l'irrigation et la gestion des mauvaises herbes peuvent également influencer la précocité de floraison. Des pratiques culturales appropriées peuvent favoriser une floraison plus précoce.

### **-Stress environnementaux**

Les stress environnementaux tels que la sécheresse, les températures extrêmes et les maladies peuvent retarder ou accélérer la floraison des plantes, ce qui peut affecter la précocité de floraison des fruits et légumes.



**Figure 58 :** Précocité de floraison

### **IV.11. Les indicateurs de précocité**

Les indicateurs de précocité utilisés pour la sélection varient selon les espèces et les objectifs de la sélection. Les indicateurs les plus courants sont :

- a) la date de floraison,
- b) la somme de températures cumulées à la floraison
- c) le nombre de jours de croissance

### **IV.12. Les étapes impliquées dans la sélection pour précocité de floraison**

La sélection pour la précocité de floraison est un processus de sélection des plantes qui fleurissent plus tôt que d'autres. Ce processus est important dans l'agriculture pour améliorer la productivité des cultures. Elle se réfère à la période de temps entre le semis d'une plante et le moment où elle fleurit. C'est une caractéristique importante pour les agriculteurs, car elle peut influencer le rendement des cultures. Est souvent mesurée en degrés-jour, qui représente le cumul des températures au-dessus d'un seuil nécessaire pour le développement de la plante.

La sélection pour la précocité de floraison implique plusieurs étapes clés dans le processus d'amélioration variétale. Ces étapes peuvent varier en fonction de la culture et des objectifs spécifiques, Ces derniers sont les suivantes :

### **A. Collecte de données**

Les plantes en floraison sont collectées à partir de différentes sources, telles que des essais sur le terrain, des expériences en serre et des observations phénotypiques.

### **B. Analyse des données**

Les données collectées sont analysées pour identifier les plantes qui présentent une précocité de floraison supérieure à la moyenne et d'autres caractéristiques souhaitables.

### **C. Sélection des parents**

Les plantes sélectionnées sont utilisées comme parents pour produire une nouvelle génération de plantes

### **D. Croisement**

Les plantes sélectionnées sont croisées pour produire une nouvelle génération des plantes qui héritent des caractéristiques souhaitables

### **E. Sélection massale**

Les plantes de la nouvelle génération sont évaluées pour leur précocité de floraison et d'autres caractéristiques souhaitables, et les plantes les plus performantes sont sélectionnées pour la génération suivante.

### **F. Tests de performance**

Les plantes sélectionnées sont soumises à des tests de performance pour évaluer leur rendement et leur adaptation aux conditions environnementales.

### **G. Sélection finale**

Les plantes les plus performantes sont sélectionnées pour la production de semences commerciales

## **IV.13. Méthodes de sélection**

La sélection pour la précocité de floraison peut être réalisée par différentes méthodes:

### **IV.13. 1.Méthodes directes**

Elles sont les plus simples et les plus intuitives. Elles consistent à sélectionner les plantes les plus précoces sur la base de leur date de floraison. Cette méthode est souvent utilisée pour les cultures à cycle court, telles que les légumes ou les fleurs.

La sélection directe pour la précocité de floraison peut être réalisée par différentes techniques, telles que :

### **IV.13. 1.1.La sélection généalogique**

La sélection généalogique est la méthode de sélection la plus traditionnelle pour la précocité de floraison. Elle consiste à sélectionner les plantes les plus précoces d'une population et à les croiser entre elles.

Cette méthode est efficace pour améliorer la précocité de floraison, mais elle est également longue et coûteuse. Elle nécessite en effet de cultiver des populations de plantes pendant plusieurs générations et de sélectionner les plantes les plus précoces à chaque génération.

### **IV.13. 1.2.La sélection massale**

La sélection massale est une méthode de sélection plus rapide que la sélection généalogique mais elle est également moins efficace. Elle consiste à sélectionner les plantes les plus précoces d'une population et à les mélanger entre elles. En effet, elle ne permet pas de sélectionner les plantes les plus précoces de la population, mais seulement celles qui sont les plus précoces parmi les plantes qui ont été sélectionnées lors de la génération précédente

### **IV.13.2.Méthodes indirectes**

Sont plus complexes que les méthodes directes, mais elles peuvent être plus efficaces. Elles consistent à sélectionner les plantes pour d'autres traits liés à la précocité, tels que la tolérance au froid ou la résistance aux maladies.

Les méthodes indirectes de sélection pour la précocité de floraison peuvent être réalisées par différentes techniques, telles que :

- a) la sélection assistée par marqueur (SAM)
- b) la sélection génomique
- c) la génétique d'association
- d) les biotechnologies comme l'édition génomique (CRISPR)
- e) la mutagenèse et la transgénèse
- f) ainsi que les techniques traditionnelles comme : la sélection récurrente ou la sélection massale en utilisant des descripteurs indirects (comme la photopériode ou la vernalisation) pour accélérer le processus.

### **IV.13.3.La sélection par marqueurs moléculaire de la précocité de floraison**

La sélection par marqueurs est une méthode de sélection plus récente. Elle consiste à identifier des marqueurs génétiques associés à la précocité de floraison.

Cette méthode est la plus rapide et la plus efficace des deux méthodes décrites ci-dessus. Elle permet de sélectionner les plantes les plus précoces de la population, sans avoir à les cultiver pendant plusieurs générations.

### IV.13.3.1. La sélection assistée par génotype-environnement

Cette technique utilise des modèles statistiques pour identifier les plantes qui sont les plus précoces dans différents environnements. Les plantes sélectionnées sont ensuite multipliées et utilisées pour la génération suivante.

#### Exemples

La sélection pour la précocité de floraison a permis d'obtenir des progrès importants dans de nombreuses cultures comme :

##### Le Maïs

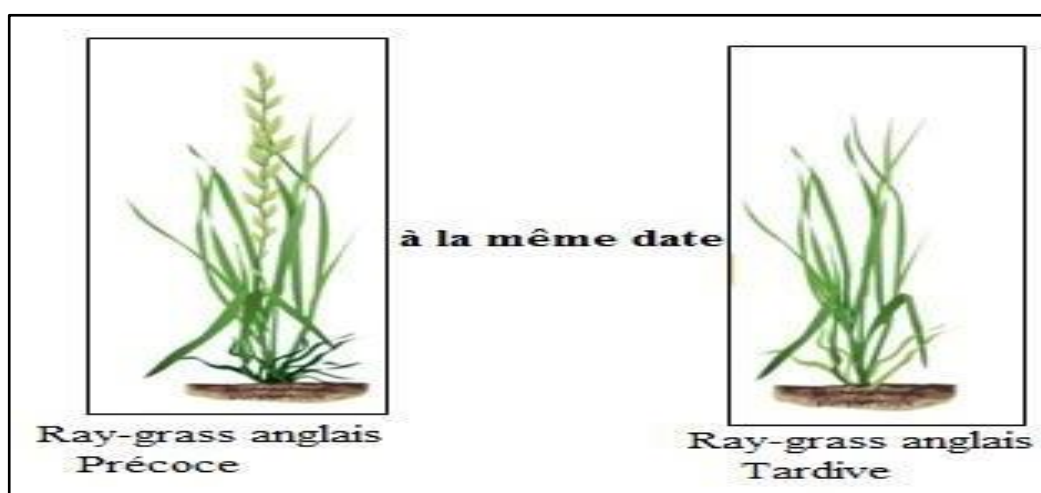
La sélection pour la précocité de floraison a permis de développer des variétés de Maïs précoces a permis de prolonger la zone de culture de cette céréale dans les régions tempérées adaptées aux régions tempérées. Ces variétés permettent aux agriculteurs de cultiver le Maïs dans des zones où les conditions climatiques sont plus difficiles.

##### Le Riz

La sélection pour la précocité de floraison a également permis de développer des variétés de riz précoces adaptées aux régions tropicales. Ces variétés permettent aux agriculteurs de cultiver le riz dans des zones où les périodes de culture sont courtes.

### IV.14. Précocité de floraison pour les légumineuses

Plus une graminée est précoce, plus elle épie. Le choix d'une variété selon sa précocité est important surtout dans les régions à hiver doux.



**Figure 59** : La précocité d'épiaison pour les graminées. Exple : ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.)

Pour chaque espèce, l'écart entre les dates de précocité des variétés les plus précoces et les plus tardives est le suivant (**Tab 05**).

**Tableau 05:** écart entre dates de précocité des variétés précoces et tardives

<b>Espèces</b>	<b>Ecart</b>
Luzerne	1 semaine
Ray-grass d'Italie et hybride	1 semaine
Brome	2semaine
Fléole	2 semaines
Dactyle	3 semaines
Trèfle violet	3 semaines
Ray-grass anglais	5 semaines
Fétuque élevée	6 semaines

#### **IV.15. Les avantages et les inconvénients de la sélection pour la précocité de floraison**

##### **A. Les avantages**

1. Adaptation aux conditions climatiques changeantes.
2. Réduction du risque de stress thermique et hydrique.
3. Tolérance aux maladies.
4. Amélioration de la vigueur au départ et de régularité de la production.
5. Lente sénescence foliaire.

##### **B. Les inconvénients**

- 1- Rendement inférieurs
- 2- Perturbation de la fécondation

**En conclusion**, la sélection pour la précocité de floraison est un processus important dans l'amélioration variétale des plantes. Elle permet de développer des variétés qui peuvent mieux s'adapter aux conditions environnementales changeantes, réduire le risque de stress thermique et hydrique, améliorer la vigueur au départ et la régularité de la production, et être plus tolérantes aux maladies. Les facteurs qui influencent la précocité de floraison des fruits et légumes comprennent les conditions environnementales, les caractéristiques génétiques, les pratiques culturales et les stress environnementaux. La précocité de floraison peut également affecter la qualité des fruits et légumes en modifiant la durée de la période de maturation, le rendement et la teneur en éléments nutritifs.

## **IV.16. Les perspectives de la sélection pour la précocité de floraison**

La sélection pour la précocité de floraison est une méthode efficace pour améliorer la productivité et l'adaptabilité des plantes cultivées à leur environnement. Elle est utilisée depuis de nombreuses années et a permis d'obtenir des progrès importants dans l'amélioration variétale de nombreuses espèces.

Les progrès de la recherche en génétique végétale devraient permettre d'améliorer encore l'efficacité de la sélection pour la précocité de floraison.

La sélection pour la précocité de floraison est une pratique importante dans l'amélioration des plantes. Elle permet aux sélectionneurs de développer des plantes qui peuvent profiter d'une saison de croissance plus longue et réduire le risque de gelées tardives.

## **IV.17. Quel type de marqueurs pour la sélection SAM**

### **IV.17.1. SAM pour les caractères quantitatifs**

#### **Introduction :**

En dehors de l'introgession, qui est l'application la plus couramment répandue, il est possible d'utiliser cette technique pour la construction de génotypes. Dans cette approche, on ne s'intéresse pas à des caractères majeurs, mais à des QTLs. Avec les QTL, il devient possible d'associer pour chaque individu une valeur à un segment chromosomique sur la base de la valeur génétique du QTL. Ainsi, une des premières applications est donc de prédire la valeur génétique d'une descendance, d'un croisement, grâce à la corrélation entre les marqueurs et le caractère quantitatif. On évalue donc plus précisément la valeur des individus candidats à la sélection.

Une autre application repose sur la mise en évidence d'allèles favorables au QTL. Il est alors possible de cumuler ces allèles dans un individu soit par backcross, soit en pilotant des croisements. C'est le génotype aux marqueurs flanquants des QTLs qui permettra d'orienter la sélection et d'évaluer la valeur des individus candidats à la sélection.

La sélection assistée par marqueurs ou SAM s'appuie sur les recherches d'amont et sur des techniques permettant le génotypage à haut débit d'un grand nombre d'individus. Elle est déjà exploitée pour des caractères à hérédité simple dans plusieurs programmes de sélection variétale, notamment pour le pêcher. Cependant, bien que son développement et sa mise en œuvre soient plus complexes lorsqu'il s'agit de caractères à effet quantitatif ou lorsque l'on désire cumuler plusieurs caractères d'intérêt, elle permet une réelle amélioration de la sélection classique. La SAM apparaît donc une approche prometteuse pour l'innovation variétale.

Le clonage du gène et l'analyse de son mode d'action par les techniques de biologie moléculaire, permet de faciliter une sélection précoce. L'isolement de ce gène rend aussi possible son transfert par génie génétique vers d'autres espèces ce qu'on appelle transgénése. .

#### **IV.17.2.La notion QTL et la sélection assisté par marqueur**

##### **IV.17.2.1.Définition d'un QTL**

De très nombreux caractères sont des caractères mesurables comme le rendement, la précocité, la taille, la qualité des fruits. On observe une variation continue de leur valeur. Dans ce cas, il n'y a plus d'opposition absolue entre deux phénotypes comme par exemple : résistant/sensible. On admet que plusieurs secteurs chromosomiques, portant un ou plusieurs gènes, sont impliqués dans le contrôle de ces caractères dits quantitatifs, et que de nombreux allèles sont responsables de la variabilité. Ces locus sont appelés (QTL) : Quantitative Trait Loci (Locus de Caractères Quantitatifs). Ces variations sont souvent mesurées de manière continue et dépendent de l'accumulation d'effets génétiques multiples.

Il s'agit des caractères qui s'expriment par un nombre entier mais présentant plusieurs valeurs possibles comme la fécondité ou le nombre d'écailles, on considère alors ces mesures comme correspondant à un caractère dont la variation est continue mais s'exprimant par un nombre entier. L'expression de ces caractères résulte généralement d'interactions complexes entre de nombreux facteurs de l'environnement et le programme génétique de l'individu, lui-même constitué d'un grand nombre de gènes s'exprimant successivement ou simultanément. L'observation d'un caractère donné chez un individu ou une population (le phénotype) ne permet pas de déduire simplement la " valeur génétique" (le génotype) de cet individu.

##### **IV.17.2.2.Fonctionnement des QTL**

Les QTL agissent en influençant la variation phénotypique par l'intermédiaire de gènes candidats qui se trouvent à proximité de ces régions. Les gènes candidats peuvent être impliqués dans la régulation de processus biologiques liés au trait en question. Les variations dans ces gènes peuvent entraîner des différences observables dans le phénotype, contribuant ainsi à la diversité des caractéristiques quantitatives.

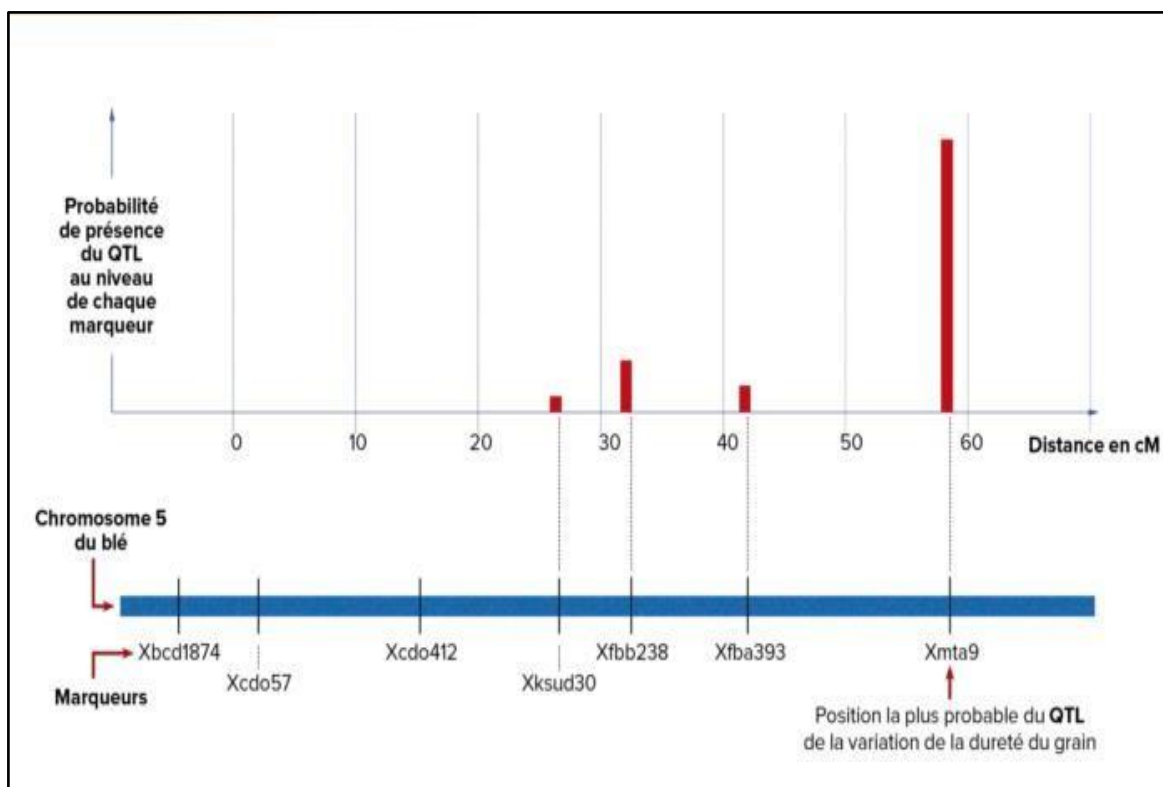
##### **IV.17.2.3.Localisation d'un QTL**

Prenons l'exemple où l'on croise deux individus différents pour la taille et considérons un marqueur quelconque présentant un polymorphisme chez ces deux parents. Dans la génération F2, il existe trois génotypes pour ce marqueur : un quart de chaque homozygote et la moitié de plantes hétérozygotes. L'idée est de réaliser trois classes d'individus sur la base du génotype à ce marqueur, et de comparer les moyennes des tailles des individus de ces trois classes. Si les moyennes sont déclarées significativement différentes, cela signifie que, sur la

base du génotype au marqueur, il est possible de différencier trois classes d'individus pour le QTL. Ainsi est mise en évidence la présence d'un QTL.

**Exemple de la localisation de QTL impliqués dans la variation de la dureté du grain de blé**

Un des facteurs affectant la qualité boulangère des blés cultivés est la dureté des grains. L'établissement de cartes génétiques sur le blé a permis d'identifier plusieurs QTL impliqués dans la variation de la dureté du grain. Un des QTL majeurs est situé sur le chromosome 5. L'infographie associée représente une carte génétique d'une partie du chromosome 5. En abscisse sont données les distances entre les marqueurs RFLP le long de ce bras de chromosome. A la taille des barres est associé un test de présence du QTL : la barre la plus grande correspond à la position statistique la plus probable du QTL. Ainsi, un QTL de la dureté du grain a été trouvé à proximité du marqueur Xmta9. C'est un marqueur du QTL. (Fig 60).



**Figure 60 :** La cartographie d'un caractère quantitatif (exemple de la localisation d'un QTL impliquée dans la variation de la dureté du grain de blé)

#### **IV.17.2.4. Cartographie des QTL**

La plupart des caractères d'intérêt agronomiques (caractères quantitatifs) sont polygéniques (plus complexes) comparés aux caractères mendéliens (caractères qualitatifs) qui sont contrôlés par un gène ou deux. Ils existent des interactions fortes entre ces gènes, soit entre des allèles du même locus (dominance) soit entre différents loci épistasie. Les méthodes classiques de sélection ont révélé que la tolérance au stress hydrique est exprimée par des caractères quantitatifs, ce qui rend la sélection génétique vis-à-vis du stress hydrique très complexe.

L'identification des QTL implique généralement des études de cartographie génétique. Ces études utilisent des populations d'individus génétiquement variés pour analyser les corrélations entre les marqueurs génétiques connus et les variations phénotypiques observées. Les marqueurs génétiques peuvent inclure des SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) ou des microsatellites. Les analyses statistiques sophistiquées sont alors employées pour détecter les régions du génome associées à la variation du trait.

##### **IV.17.2.4.1. Le principe de la cartographie**

Est de localiser un locus (ou groupe de locus) dont la variation allélique est associée à la variation d'un caractère quantitatif. Ce locus (ou loci) s'appelle locus de caractère quantitatif ou QTL. La présence d'un QTL est conclue quand sont observées des différences phénotypiques significatives entre individus qui ont hérité différents allèles, liées à des marqueurs, de leurs parents.

Le principe de base de la cartographie des QTL est relativement simple et consiste en deux étapes :

1. Construire une carte génétique dense de l'ensemble du génome, en se basant sur les fréquences de recombinaison entre les différents marqueurs moléculaires répartis sur les chromosomes (groupes de liaisons).
2. Rechercher la présence de corrélations significatives entre les valeurs phénotypiques (enregistrées) du caractère et l'état allélique de chaque marqueur moléculaire (neutre). Si la corrélation est positive cela indique qu'une région du chromosome qui est proche du marqueur doit contenir un loci à effet quantitatif (QTL). Cette corrélation sera d'autant plus forte, que :
  - i) le QTL recherché est proche du marqueur moléculaire, c'est à dire en fort déséquilibre de liaison avec le marqueur.
  - ii) le QTL a un effet important sur le caractère.

La cartographie des QTL nécessite donc 4 « ingrédients » :

- 1) des marqueurs moléculaires polymorphes couvrant, si possible, tout le génome pour construire une carte génétique et pour établir des liaisons avec des QTL.
- 2) des mesures d'un caractère phénotypique recherché,
- 3) une population d'étude en ségrégation pour le caractère recherché et les marqueurs moléculaires,
- 4) des outils statistiques pour trouver des associations entre les états alléliques liées aux marqueurs et les valeurs du caractère phénotypique.

Depuis une dizaine d'années, le développement important de la biologie moléculaire chez les plantes pérennes et en particulier celui de la cartographie génétique et des techniques d'analyse des caractères quantitatifs a permis de développer une nouvelle approche.

L'analyse des locus de caractères quantitatifs (QTL) est une méthode statistique qui relie deux types d'informations (données phénotypiques (mesures de caractères) et données génotypiques (généralement des marqueurs moléculaires)) pour tenter d'expliquer la base génétique de la variation des caractères complexes

### **IV.17.2.5.Applications des QTL**

#### **1. Amélioration des cultures**

Les QTL sont largement utilisés dans l'agriculture pour sélectionner des caractéristiques agronomiques souhaitables, telles que la productivité, la résistance aux maladies et la qualité des cultures.

#### **2. Élevage Sélectif**

Dans le domaine de l'élevage, les QTL sont utilisés pour améliorer les traits économiquement importants chez les animaux d'élevage, comme la croissance, la qualité de la viande et la résistance aux maladies.

#### **3. Médecine Génétique**

Les QTL jouent un rôle crucial dans la recherche médicale, en particulier pour comprendre les bases génétiques des maladies complexes telles que le diabète, l'hypertension et certaines maladies mentales.

**En résumé,** les QTL sont des outils puissants permettant de comprendre la complexité des caractéristiques quantitatives héritées. Leur identification et leur utilisation dans des domaines tels que : l'agriculture, l'élevage et la médecine ont des implications significatives pour l'amélioration de la productivité, de la santé et de la qualité de vie. La recherche continue dans ce domaine contribuera à une meilleure exploitation des ressources génétiques pour répondre aux défis actuels et futurs.

#### **IV.17.2.6. Identification des QTL**

Les QTL peuvent être identifiés « moléculairement » (par PCR, par exemple) pour aider à cartographier des régions du génome qui contiennent des gènes impliqués dans la spécification d'un caractère quantitatif. Ceci contribue à l'identification, l'annotation et le séquençage de ces gènes ou de gènes dits « gènes d'intérêt ».

Contrairement aux caractères à déterminisme simple, les caractères quantitatifs polygéniques sont soumis aux influences conjointes de différents facteurs génétiques (QTL) et de facteurs environnementaux.

#### **IV.17.2.7. L'analyse QTL**

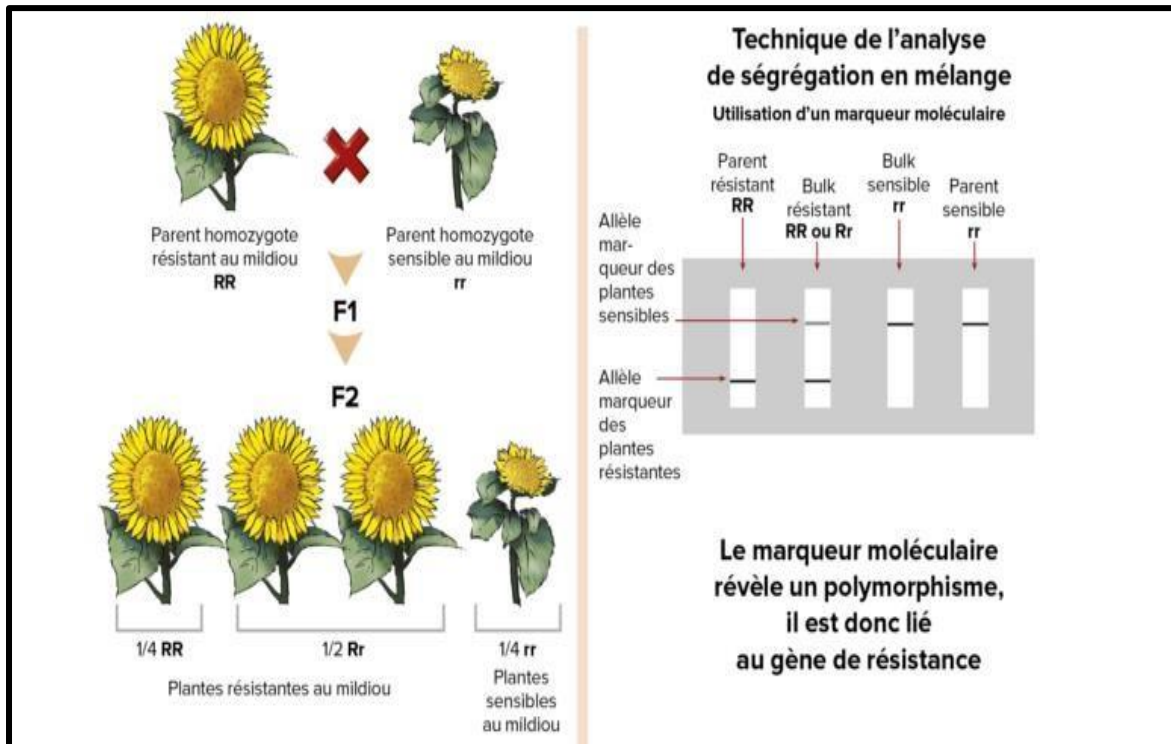
L'analyse QTL cherche à caractériser l'architecture génétique d'un type de caractère : c'est-à-dire à déterminer le nombre de régions du génome impliquées ainsi que leurs positions et leurs effets. Cette approche se base sur l'analyse combinée de l'information moléculaire et d'un caractère quantitatif dans une descendance en ségrégation. Elle permet de tester statistiquement le lien entre variation génétique (comme celle de marqueurs moléculaires) et variation phénotypique. Si ce test est significatif, on met en évidence un QTL.

### **IV.18. La cartographie d'un gène majeur**

#### **IV.18. 1. Localiser les gènes majeurs**

Quand un caractère est dû à l'effet d'un gène principal, on parle de gène majeur. L'apparition des marqueurs moléculaires a permis l'élaboration de méthodologies pour localiser ces gènes. Le principe est le même que celui servant à l'élaboration des cartes génétiques. Plus la distance qui sépare un marqueur moléculaire et un gène d'intérêt sur la carte génétique est faible, plus la probabilité qu'ils soient transmis ensemble à la descendance est grande.

**Exemples :** De nombreux gènes majeurs ont déjà été localisés. On peut citer par exemple : des gènes de qualité codants une protéine de réserve du blé, des gènes codants le taux en acide érucique chez des oléagineux, des gènes de nanisme chez le Maïs ou le colza, des gènes de résistance aux champignons chez la tomate, la laitue, le blé, le tournesol, dont le gène P11 impliqué dans la résistance à la race 1 du mildiou, des gènes de résistance aux virus chez la pomme de terre, l'orge, des gènes de résistance aux nématodes chez la betterave, des gènes de restauration de la stérilité mâle cytoplasmique chez le colza et le tournesol.



**Figure 61:** Identification d'un gène par un marqueur moléculaire (exemple de la résistance à la race 1 du mildiou chez le tournesol)

#### IV.18. 2.Détection de la liaison

La Détection de la liaison consiste à choisir des parents suffisamment polymorphes pour le caractère agronomique et à observer dans la descendance la ségrégation des caractères phénotypiques et du génotype des marqueurs moléculaires. Une des populations qui peut être retenue pour l'analyse de la ségrégation pour un gène majeur est une descendance F2 issue de deux parents homozygotes. Dans le cas d'un gène de résistance, il s'agit du croisement d'un parent sensible et d'un parent résistant. Ainsi en F2, on observe un quart d'individus sensibles et trois quarts de résistants. L'idée qui a été émise par Michelmore et *al.* (1991) est de regrouper l'ADN des individus F2 sensibles et l'ADN des individus F2 résistants. Cette technique est appelée BSA, Bulk Segregant Analysis, c'est l'analyse de ségrégation en mélange. Le génotype du marqueur est ensuite déterminé. Si le marqueur testé est lié au gène de résistance, les plantes sensibles portent l'allèle marqueur caractéristique des plantes sensibles. En revanche, les individus résistants sont soit homozygotes pour le gène de résistance, soit hétérozygotes, il en va donc de même pour leur génotype du marqueur. Ainsi,

en mélange, les individus résistants présentent au moins l'allèle marqueur caractéristique des plantes résistantes

### **IV.18. 3. Apport à la sélection**

La mise en évidence est une aide précieuse pour le sélectionneur. Comme un fragment de feuille suffit à obtenir l'ADN nécessaire pour établir l'empreinte génétique d'une plante, un tri précoce et précis peut être envisagé dès le début de la croissance des plantes. Ceci permet un gain de temps, il n'est pas nécessaire d'attendre la visualisation phénotypique du gène. On peut ainsi cribler une collection de géniteurs et déterminer si par exemple des plantes possèdent une source de résistance. D'autre part, par le biais de marqueurs moléculaires, il est possible d'identifier les plantes hétérozygotes, donc porteuses d'un gène récessif dont le phénotype n'est pas observable.

Avec les QTL, il devient possible d'associer pour chaque individu une valeur à un segment chromosomique sur la base de la valeur génétique du QTL. Ainsi, une des premières applications est donc de prédire la valeur génétique d'une descendance, d'un croisement, grâce à la corrélation entre les marqueurs et le caractère quantitatif. On évalue donc plus précisément la valeur des individus candidats à la sélection. Une autre application repose sur la mise en évidence d'allèles favorables au QTL. Il est alors possible de cumuler ces allèles dans un individu par rétrocroisement notamment. On parle alors de construction de génotypes

### **IV.18. 4. Analyse fine de la structure du gène**

L'objectif final est le clonage du gène et l'analyse de son mode d'action. Ceci fait appel à des techniques de biologie moléculaire, appelées clonage positionnel. Cette caractérisation fine de la structure du gène permet également de faciliter une sélection précoce. L'isolement de ce gène rend aussi possible son transfert par génie génétique vers d'autres espèces.

## **IV.19. SAM pour pyramider les gènes**

### **IV.19.1. Pyramidage des gènes.**

#### **Introduction**

Pour répondre aux enjeux d'une agriculture compétitive et durable, il est nécessaire d'adapter les futures variétés à des systèmes «écologiquement intensifs», permettant d'optimiser le rendement et la qualité des produits tout en réduisant les impacts négatifs sur l'environnement.

Les résistances génétiques aux maladies sont un élément clef pour maintenir le potentiel de rendement avec des conduites culturales ayant recours à une protection chimique réduite et raisonnée. Cependant, ce type de conduite nécessite que les variétés utilisées présentent des résistances efficaces et durables.

Le cumul dans un même génotype de plusieurs sources (gènes ou QTLs) de résistance, de préférences ayant des modes d'action complémentaires (par exemple stade jeune/stade adulte, résistance vertical/résistance partielle) permet d'obtenir une résistance efficace et durable, c'est-à-dire ayant moins de risque d'être contournée par mutation du pathogène.

Un autre domaine d'intérêt des marqueurs moléculaires dans l'amélioration des plantes aux résistances aux maladies et insectes est le pyramidage de plusieurs gènes de résistance au même pathogène ou insecte dans une seule variété.

Avec le développement rapide de nouveaux biotypes, les méthodes traditionnelles de la sélection deviennent lourdes et compliquées lorsque deux gènes ou plus sont à identifier simultanément.

Le cumul de plusieurs gènes de résistance dans un seul cultivar, *via* les marqueurs moléculaires, permettrait l'obtention d'une résistance multigénique que l'on peut espérer être difficilement contournée par le pathogène ou l'insecte.

Pyramidage est une nouvelle stratégie de sélection pour l'obtention de lignées élites cumulant des résistances aux principales maladies fongiques

Autrement dit, une fois le cumul de résistance réalisé dans une variété élite, cette variété risque d'être dépassée, pour d'autres caractères comme le rendement, par les nouvelles variétés inscrites entre temps.

### **Définition du pyramidage**

Le pyramidage est le processus par lequel un ensemble de gènes codant pour le même caractère est combiné dans un seul génotype. Le pyramidage peut être possible par la méthode conventionnelle mais il n'est pas d'habitude facile à identifier les plantes contenant plus qu'un gène. Contrairement 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

#### **.IV.19.1.1.Exemples de pyramidage**

Chez le blé, le cumul de résistances partielles à la rouille noire a permis d'obtenir des lignées possédant un haut niveau de résistance au champ avec une faible probabilité de contournement. Quelques exemples peuvent néanmoins être mentionnés, notamment le travail de **Dweikat et al. (1997)** qui ont pu suivre le pyramidage dans des variétés de blé sensibles à la mouche de Hesse. D'autres travaux ont confirmé la validité de marqueurs liés à des gènes de résistance à l'oïdium chez le blé après leur transfert dans différents fonds génétiques et ont pu exploiter ces marqueurs avec succès dans les programmes d'amélioration du blé pour la résistance à cette maladie. L'utilisation de ces marqueurs dans les programmes d'amélioration

du blé pour la résistance aux nématodes à kystes a montré une grande fiabilité que ce soit lors de la sélection des plantes portant ces gènes ou lors du pyramidage de ces gènes dans une même variété. Le même travail serait très difficile, voire impossible avec les méthodes de sélection phénotypique.

### **IV.19.2. Comment faire le pyramidage**

Dans un premier temps on réalise :

- a) la cartographie génétique de populations ségrégantes pour les caractères de résistance au mildiou et à l'oïdium permet d'identifier les régions chromosomiques (QTL) contenant des gènes majeurs de résistance.
- b) Puis, des marqueurs moléculaires encadrant ces régions sont utilisés pour déterminer si un individu donné contient ou non l'allèle de résistance recherché

### **IV.20. SAM et les stratégies de sélection**

#### **Introduction**

Le développement des marqueurs moléculaires durant les dernières années offre la possibilité d'établir de nouvelles approches pour améliorer les stratégies de sélection qui incluent l'utilisation de ces marqueurs pour l'introgession de gènes spécifiques (greffe d'un gène d'intérêt dans une lignée élite) et le cumul de multiples gènes bénéfiques. Cette méthode permet une sélection plus précise, plus rapide et non destructive, offrant un avantage significatif par rapport aux méthodes traditionnelles.

Donc les stratégies de sélection assistée par marqueurs sont :

#### **IV.20.1. Introgession de gènes (Rétrocroisement)**

Son objectif est de greffer un gène ou une région génétique intéressante (par exemple, la résistance à une maladie) d'une lignée donneuse dans une lignée élite. En utilisant les marqueurs moléculaires qui permettent de suivre la transmission des fragments de gènes de la lignée donneuse lors des croisements successifs, assurant un retour rapide au fond génétique élite de la lignée récurrente.

#### **IV.20.2. Le cumul de multiples gènes bénéfiques (pyramidage)**

Il permet de cumuler plusieurs gènes (ou QTLs) bénéfiques dans un même individu, comme plusieurs gènes de résistance à des maladies différentes à l'aide des marqueurs pour à identifier et à combiner des QTLs pour obtenir des génotypes plus performants.

Le cumul permet une sélection plus précise, plus rapide et non destructive, offrant un avantage significatif par rapport aux méthodes traditionnelles.

**IV.20.3. Stratégie de sélection par seuil**

La stratégie la plus simple consiste à sélectionner les individus ou les échantillons qui ont les valeurs les plus extrêmes des marqueurs.

**IV.20.4. Stratégie de sélection par classification.**

Une autre sélection consiste à utiliser une régression logistique ou une autre méthode de classification pour prédire la variable cible à partir des marqueurs. Les individus ou les échantillons qui sont prédite avec le plus de probabilité d'appartenir à la classe cible sont alors sélectionnés. Cette stratégie est appelée sélection par classification.

**IV.20.5. Stratégie de sélection par renforcement**

Enfin; il également possible d'utiliser une méthode d'apprentissage par renforcement pour sélectionner les individus ou les échantillons qui sont les plus prometteurs pour l'analyse ultérieure. Cette stratégie est appelée sélection par renforcement.

**IV.20.6. Stratégie de sélection SLS-SAM**

Elle a été proposée pour le développement de lignées élites combinant des allèles favorables présents dans les parents élites. Chaque individu de l'ensemble des lignées élites ayant le caractère d'intérêt est croisé avec un testeur, qui lui-même est une lignée élite déficiente de ce caractère. Une population appropriée de chaque croisement est analysée pour identifier l'allèle/QTL présent dans la lignée élite concernée pour le caractère cible.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**Agri-bio. (2016).** Les légumineuses pour apporter de l'azote dans la rotation. Document issu du projet Agri-Bio : de la connaissance à la performance. 2p.

**Anonyme. (2002)** .Conseil international des céréales. International Grains Council.*World Grains Statistics*, p13-17.

**Bartels D. and Sunkar. (2005).** Drought and Salt tolerance in plants. *Critical Reviews in plant Science*. 24: 23-58.

**Belaid, (1996).** Aspect de la céréaliculture algérienne ed. Office des publications universitaires, ben-aknoun (alger), 206p.

**Bohn M., Utz HF. and Melchinger AE. (1999).**Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance. *Crop Science*.39 : 228-37.

**Botstein. D., R L White ., Skolnick M. and Davis R W. (1980).**Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32(3):314–331.

**Boyeldieu J. (1991).** Produire des grains oléagineux et protéagineux. Edition Tec et Doc Lavoisier-Paris. 256 p.

**Byrne M., Marquez-Garcia ML, Uren T., Smith DS. and Moran GF. (1996).** Consevation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany*. 44: 331 -41.

**Crow J.F. and Dove W.F. (1988).** Anecdotal, historical and critical commentaries on genetics: the ultra-selfish gene. *Genetics*. 118 : 389-391.

**De Vienne D. (1998)** .Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Edition. INRA. p195.

**Demesure B., Comps B and Petit RJ. (1996).**Chloroplast DNA phylogeography of the common beech (*Fagus sylvatica* L.) in Europe. *Evolution*.50: 2515-20. .

**Devos KM . and Gale MD.(1997).** Comparative genetics in the grasses. *Plant Molecular Biology* . 35: 3-15.

**Dubreuil P. and Charcosset A. (1998).** Genetic diversity within and among maize populations: a comparison between isozyme and nuclear RFLP loci. *Theoretical and Applied Genetics*.96: 577-87.

**Dubreuil P., Rebourg C., Merlino M. and Charcosset A. (1999).** Evaluation of a DNA pooled sampling strategy for estimating the RFLP diversity of maize populations. *Plant Molecular Biology Reporter*. 17: 123-138.

**Dweikat H., Ohm F., Patterson and. Cambron S. (1997).** Identification of RAPD markers for 11 Hessian fly resistance genes in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* .94 :419–423.

**Echt CS., Harry DE. and Nelson CD. (1996).** PCR-based co-dominant markers in forest genetics. In : Novel applications of molecular markers in forest trees, SRIEG Workshop, Houston, Texas, 23-26, 4 p.

**FAO. (2006).** Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques. INRAA. 68p.

**Francia E., Tacconi G., Crosatti C., Barabaschi D., Bulgarelli D., Dall'Aglio E. and Valè G. (2005).** Marker assisted selection in crop plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 82:317- 342

**Gawel E. (2012).** Chemical composition of luzerne leaf extract (EFL) and its applications as a phytobiotic in human nutrition. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*,11 (3) : 303–310

**Ghesquiere A, Muylle H, Baert J (2011).** Use of molecular marker information in the construction of polycrosses to enhance yield in a *Lolium perenne* breeding programme. Ireland, pp 88-

**Gupta P. K., Langridge P. and Mir R.R. (2010)** .Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities. *Molecular Breeding* .26: 145–161.

**HalldénC., Hansen M., Nilsson N.O., A Hjerdin A., Säl T. (1996).** Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 93(8):1185-92.

**Harmankaya M., Özcan M.M., Karadas S. and Ceyhan E. (2010).** Protein and mineral contents of pea (*Pisum sativum* L.) genotypes grown in Central Anatolian region of Turkey. South Western *.Journal of Horticulture, Biology and environment*. 1 (2): 159-165.

**Hernandez P., Martin A. and Dorado G. (1999)** .Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker assisted selection of wheat. *Molecular Breeding*. 5: 245–253.

**Hospital F. (2009).** Challenges for effective marker-assisted selection in plants. *Genetica* .136:303-310

**Hospital F and Charcosset A (1997)** .Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*. 147:1469-1485

**Hospital F. (2005)** .Selection in backcross programmes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B.Biological Sciences* .360:1503–1511

**Jarne P. and Lagoda P. (1996)**.Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*. 11: 424-9.

**Karp A., Kresovich S., Bhat KV., Ayad WG. and Hodgkin T. (1997)**. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin .2 : 47.

**Keim P., Paige KN., Whitham TG. and Lark K1G. (1989)**. Genetic analysis of an interspecific hybrid swarm of *Populus*: occurrence of unidirectional introgression. *Genetics*. 123: 557-65.

**Kijas JMH., Fowler JCS., Garbett CA. and Thomas MR. (1994)**. Enrichment of microsatellites from citrus genome using biotinylated olig onucleotide sequences bound to streptavidin-coated magnetic particles. *Bio Techniques*. 16: 656-62.

**Kölliker R, Boller B, Widmer F (2005)**.Marker assisted polycross breeding to increase diversity and yield in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Euphytica* .146:55-65

**Krauss SL R. (1998)**.An evaluation of the AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* (*Proteaceae*). *American Journal of Botany*.46: 533- 46.

**Lazali M. (2014)**. Etude des mécanismes agro physiologiques et moléculaires d'adaptation à la déficience en phosphore chez la symbiose rhizobienne du haricot (*Phaseolus vulgaris* L). Thèse de doctorat en sciences agronomique. ENSA-Alger, 152p.

**Lecomte C. (2005)**.L'évaluation expérimentale des innovations variétales: proposition d'outils d'analyse de l'interaction génotype x milieu adaptés à la diversité des besoins et des contraintes des acteurs de la filière semences, Thèse de Doctorat, Institut National Agronomique Paris-Grignon.France . 263p

**Litt M. and Luty J.A. (1989)**. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics* .44 : 397-401

**Liu J., Liu D., Tao W., Li W., Wang S., Chen P., Cheng S., Gao D. (2000).** Molecular marker- facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant Breeding*. 119: 21–24

**Loridon K., McPhee K., Morin J., Dubreuil P., Pilet-Nayel M. L., Aubert G., Rameau C., Baranger A., Coyne C., Lejeune-Hènaut I. and Burstin, J. (2005).** Microsatellite merker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.).*Theoretical and Applied Genetics*. 111; 1022- 1031.

**Mazoyer M. and Aubineau. 1933).** Larousse agricole, 4 eme Edition Paris, Larousse, 2002, ISBN 2030910228, 9782030910221. 767 p

**Meiss H. (2006).** Un point sur l'utilisation de la cartographie des QTL (locus à effet quantitatif) en écologie évolutive, Master Sciences, Technologie, Santé. Mention : Biologie des organismes. Spécialité : Gènes, Sélection, Adaptation, 18 p.

**Messaiein C. M. and Messiaen P. F. (2010).** Le potager familial méditerranéen. Ière Edition, Quae. 192 pages.

**Messiaen C.M. and Messiaen P. F. (2009).** Le potager familial méditerranéen, Edition. Quae, Hermann, Paris, 100-102p.

**Messiaen C.M., Blancard D., Rouscel F. and Hafon R.( 1991).** Les maladies des plantes maraichères. 3eme édition.Paris. INRA. 291-305p.

**Michelmore R,W., Paran I. and Kesseli R.V. (1991).** Identification of markers linked to diseaseresistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88:9828-9832.

**Morgante M . and Olivieri AM. (1993).**PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* . 3: 175-82.

**Munier-Jolain Na., Biarnès V., Chaillet I., Lecoeur J. and Jeuffroy M H. (2005).** Agrophysiologie du pois protéagineux. Editions Quae. Technology & Engineering . 281 pages

**Musetti R., Vecchione A., Stringher L., Borselli S., Zulini L., Marzani C., D'Ambrosio M., Sanità L. di Toppi di. and Pertot I. (2006).** Inhibition of Sporulation and Ultrastructural Alterations of Grapevine Downy Mildew by the Endophytic Fungus *Alternaria alternate*. *American Phytopathological Society*. 96(7): 1943-7684.

**Najimi B., El Jaafari S., Jlibène M. and Jacquemin J.M. (2003).** Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* . 7: 17–35.

**N'dayegamiye A., Tremblay G., Deschene P. and Drapeau A. (2012).** Bénéfices des légumineuses dans les rotations des cultures .Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement. 2p

**Nelson JC., Sorrels ME., Van deynze AE., Lu Y H., Atkinson M., Bernard M., Leroy P., Faris J D. and Anderson J A. (1995).** Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in momoelogenous groups 4, 5 and 7. *Genetics*. 141: 721-31.

**Oelke E. A., Oplinger., E. S. ,Hanson C. V., Davis D. W., Putnam D. H., Fuller E. I. and Rosen C. J. (1991).** Dry field pea. Alternative Field Crop Manual, University of Wisconsin-Extension, Cooperative Extension.

**Panaud O., Chen X. and McCouch SR. (1995).** Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome* .38: 1170-6.

**Peakall R., Gilmore S., Keys W., Morgante M. and Rafalski A. (1998).** Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSR) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution*. 15: 1275-87.

**Primmer CR., Ellengren H., Saino N. and Moller AP. (1996).** Directionnal évolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genetics*. 13 : 391 -3.

**Rieseberg LH. and Carney SE. (1998).** Plant hybridization. *New Phytologist*. 140: 599-624.

**Rieseberg LH., Whitton J. and Gardner K. (1999).**Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics*. 152: 713-27.

**Ritland K. and Jain S. (1981).** A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. *Heredity*. 47: 35-52.

**Rongwen J., Akkaya MS., Bhagwat AA., Lavi U. and Cregan PB. (1995).**The use of microsatellite DNA markers for soybean genotypes identification. *Theoretical and Applied Genetics* .90: 43-8.

**Russell JR., Fuller JD., Macaulay M., Hatz, B.G., Jahoor,A. ,Powell W. and Waugh R.(1997).** Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* .95: 714-722.

**Schlötterer C. (2004).** The evolution of molecular markers—just a matter of fashion. *Natural Review of Genetics* .5:63–69.

**Smith J. S. C., Chin E. C. L., Shu H., Smith O. S., Wall S. J., Senior M. L., Mitchell S. E., Kresovich S. and Ziegle J. (1997).** An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) : comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*. 95: 163-173.

**Smýkal P., Kenicer G., Flavell A. J., Corander J., Kosterin O., Redden R. J., Ford R., Coyne C. J., Maxted N., Ambrose M. J. and Ellis N. T. H. (2011).** Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus. *Plant Genetic Resources*. 9: 4–18.

**Smykal P., Coyne C. J., Ford R., Redden R., Flavell A. J., Hybl M., Warkentin T., Burstin J., Duc G., Ambrose M., and Ellis T. H. N. (2008b).** Effort towards a world pea (*Pisum sativum* L.) germplasm core collection: The case for common markers and data compatibility. *Pisum Genetics*. 40: 11– 14.

**Somers D. and J and Issac P (2004)** .A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) .*Theoretical and Applied Genetics*. 109:1105- 1114.

**Southern E. M. (1975).** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* .98: 503-17.

**Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P. and Morgante M. (1996).** A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in pinaceae. *Molecular Ecology* .5: 595-8.

**Waligora C. and Tetu T. (2008).** Les légumineuses, il est urgent de les réhabiliter. Dossier Ressources . TCS n°48.

**Waugh R., Bonar N., Baird E., Thomas B., Graner A., Hayes P. and Powell W. (1997).** Homology of AFLP products in three mapping populations of barley. *Molecular and General Genetics*. 255: 311 -321

**Winfield M. O., Arnold G. M., Cooper F., Le Ray M., White J. A., Karp A. and Edwards K. J. (1998)** .A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the upper Severn area of the UK using AFLP markers. *Molecular Ecology*. 7: 3-10.

**Xu Y. B. And Crouch J. H. (2008)** .Marker-assisted selection in plant breeding: From publications to practice. *Crop Science*.48:391-407

**Zohary D., Hopf M. and Weis E. (2012).** Domestication of Plants in the Old World - The Origin and Spread of Domesticated Plants in South-west Asia, Europe, and the Mediterranean Basin .4me Edition. Oxford University Press. 264p.