

Sommaire

Remerciements	3
Objectif	4
Présentation de l'INRA Meknès	5
Introduction	8
Matériel et méthodes.....	11
I. Matériel biologique	12
II. Techniques	13
1) La lyophilisation.....	12
2) L'extraction de l'ADN	13
3) La technique PCR	13
4) La technique de marquage moléculaire.....	14
5) La technique d'électrophorèse.....	16
I. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	16
II. Electrophorèse sur gel d'acrylamide.....	17
6) Les Amorces.....	17
Définition	17
Les amorces utilisées.....	18
Partie pratique	19
Résultats	27
CONCLUSION.....	38
Bibliographie.....	39

Remerciements

Au terme de cette étude, je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à mes Professeurs de la Faculté, pour l'intérêt avec lequel ils ont entouré ce travail.

Aucun mot ne saurait exprimer ma très haute considération et ma grande admiration pour leur ardeur au travail.

Je remercie particulièrement Madame Guissi sanae, pour l'aide et les conseils concernant les missions évoquées dans ce rapport, et qu'elle m'a apportés lors des différents suivis.

J'adresse mes vifs et chaleureux remerciements à Monsieur Mohammed El Asri, Chef de l'institut national de recherche agronomique de Meknès, pour son accueil et la confiance qu'il m'a accordé dès mon arrivée à l'institut.

Je tiens à exprimer tout particulièrement mes sentiments de gratitude, de respect et surtout d'une très grande considération envers Mr. J.CHARAFI pour leurs vailleuses et pertinentes remarques, et aussi pour leur soutien et leur compréhension tout au long de la réalisation de ce travail.

Je remercie également le professeur Mr Atmani Majid d'avoir accepté de juger ce travail.

Mes remerciements, vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Objectif

Ce stage, qui s'inscrit dans le cadre de la réalisation d'un projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de licence « biologie, hygiène et sécurité des aliments » a été réalisé au sein de laboratoire de biotechnologie à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Meknès (INRA), sous le thème « Caractérisation moléculaire des variétés d'oliviers à l'aide des marqueurs microsatellites»

Le projet se base sur l'analyse des empreintes ou profils génétiques qui reposent sur l'identification de segments d'ADN présentant des polymorphismes appelés « marqueurs génétiques ». Ces derniers sont des microsatellites représentés par un motif d'ADN court, le plus souvent de 1 à 4 nucléotides et qui se répètent un certain nombre de fois au sein du génome.

Pour réaliser ce travail, plusieurs techniques ont été réalisées :

- La lyophilisation des échantillons.
- L'extraction de l'ADN.
- Amplification par la technique PCR (polymerase chaine reaction) en utilisant plusieurs types d'amorces pour chaque échantillon.
- Le marquage moléculaire.
- L'électrophorèse sur gel d'agarose et sur gel d'acrylamide.

Cette démarche a été adaptée dans le but d'étudier le polymorphisme de plusieurs échantillons et déterminer par la suite, le nombre et la taille des allèles coexistant au niveau des séquences d'ADN étudiés. Le but est de comparer ces allèles pour déterminer si les échantillons proviennent du même individu ou s'il existe un rapport de parenté afin de pouvoir réaliser un arbre phylogénétique.

Présentation de l'INRA Meknès



CENTRE RÉGIONAL
DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE **MEKNES**



Le Centre Régional de la Recherche Agronomique (CRRRA) à Meknès est une entité régionale de l'INRA Maroc (Institut National de la Recherche Agronomique) chargée d'entreprendre les recherches, études et actions de transfert de technologie répondant aux besoins de sa zone d'action. Ces activités concernant les environnements semi-aride, subhumide et de montagne visent :

- Une meilleure connaissance du milieu (naturel et socio-économique) et le développement des technologies performantes pour répondre aux besoins de l'agriculture de notre zone d'action (production du matériel végétal, des connaissances et des méthodes).
- Une valorisation des acquis de la recherche et l'implication de nos partenaires dans la recherche.

➤ Organisation

Conformément à l'organisation structurelle de l'INRA, le Centre Régional de Meknès est organisé en quatre types de structures et deux organes de concertation.

- Plan structurel :

Le Chef du Centre (en relation avec la Direction et unités de l'INRA)

4 Unités de Recherche :

- U. R. Amélioration des Plantes et Conservation des Ressources Phyto- Génétiques (URAPCRG), au sein de laquelle mon stage a été réalisé.
- U. R. Agronomie et Physiologie Végétale (URAPV),
- U. R. Gestion Durable des Ressources Naturelles et de Sociologie et d'Economie Rurales (URGDRNSER),

- U. R. Protection des Plantes (URPP)
- Service Recherche-Développement
- Service Administratif

3 Domaines Expérimentaux :

- D. E. d'Aïn Taoujdate à vocation arboriculture fruitière (140 ha, 467 mm),
- D. E. de Douyet à vocation grandes cultures (440 ha, 450 mm),
- D. E. d'Annoceur à vocation montagne (40 ha, 550 mm, Altitude : 1350 m).

- Plan fonctionnel:

Pour développer l'esprit de cogestion de la recherche, le Centre Régional est doté du :

- Conseil Régional Consultatif d'Orientation de la Recherche (CRCO)
- Comité Scientifique et de Gestion du Centre (CSG).

➤ Activités de recherche

- La sélection de variétés performantes d'olivier et optimisation des techniques culturales pour une production de qualité en conditions de culture pluviales
- L'amélioration de la productivité des espèces rustiques (Amandier, Figuier et Caroubier)
- La diversification fruitière (abricotier, prunier) et sélection pour le stress biotique (feu bactérien)
- L'amélioration de la productivité et de la stabilité du système blé en régime pluvial
- L'amélioration de l'efficacité d'utilisation des intrants chez les légumineuses à travers la sélection variétale et les techniques culturales

L'amélioration de la productivité et de la qualité des oléagineux annuels (carthame, colza et tournesol d'automne) par la mise au point de matériel végétal adapté

- Le développement de stratégies de lutte intégrée contre les maladies, ravageurs et plantes adventices dans le système céréales / légumineuses alimentaires, par la recherche participative des agriculteurs
- La promotion de la pomme de terre dans le Sais et le Moyen Atlas: Sélection variétale et multiplication de semence

- L'analyse socio-économique, des filières, des modèles d'agrégation, des systèmes de production et des moyens d'existence des populations en zones de montagne.
- L'élaboration des cartes de vocation agricole et carte de fertilité des sols de la région de Meknès
- La gestion durable et valorisation de la biodiversité des PAM et du câprier au Saïs et Moyen Atlas.

INTRODUCTION

L'analyse des empreintes ou profils génétiques repose sur l'identification de segments d'ADN présentant des polymorphismes appelés marqueurs génétiques. La comparaison des fragments non-codants en des loci (emplacement sur l'ensemble de chromosome) révèle des différences ou des variantes appelées allèles. Leur comparaison indique si deux échantillons proviennent du même individu ou si éventuellement, il existe un rapport de parenté.

Dans une séquence d'ADN se retrouvent les mêmes éléments constitutifs, quatre bases azotées (adénine, cytosine, guanine, et thymine représentées par leurs initiales A, C, G, et T), un sucre et un groupe phosphate. Pour établir un profil génétique, il faut donc découvrir, mesurer et comparer des séries de A, C, G, et T.

Par conséquent, pour réaliser un test ADN, il faut mettre en œuvre les méthodes d'analyse consistant en l'extraction de l'ADN, l'amplification d'un fragment d'ADN par PCR (réaction de polymérase en chaîne), l'électrophorèse et le séquençage manuel ou automatique avec lecture des résultats.

En effet, l'ADN n'est pas disponible directement mais nécessite différents traitements au niveau de l'extraction. Chaque cellule contient dans son noyau l'information génétique d'un individu sous forme d'ADN. Les techniques actuelles permettent sur quelques cellules d'isoler l'ADN et d'en recopier ses éléments jusqu'à l'obtention de la quantité suffisante.

Cette approche n'est réalisable que grâce à la biotechnologie qui est une discipline émergente dans le monde entier. Plusieurs pays s'y intéressent vu le nombre d'horizons qu'elle peut offrir dans différents domaines notamment celui de l'agriculture.

Le Maroc a lui aussi lancé de nombreux axes de recherche dans ce domaine depuis une dizaine d'années. La céréaliculture (blé, orge et maïs), les légumineux alimentaires (fêve, pois, lentille, haricot), les cultures maraîchères, les plantes sucrières et l'arboriculture (arbres fruitières, agrumes, olivier et palmier dattier) sont les activités les plus dominantes dans le secteur agricole au Maroc.

La situation géographique du Maroc fait que son climat est marquée par une pluviométrie irrégulière et des sécheresses fréquentes (9 sécheresses entre 1980 et 2000). Son agriculture est affectée par ces aléas climatiques et d'autres facteurs comme la salinité, les hautes températures et les stressés biotiques (les maladies et les insectes) qui diminuent le

rendement et engendrent un revenu faible. Pour faire face à ces contraintes, le Maroc a opté pour l'intégration des nouvelles technologies dans la recherche agronomique.

La politique du Maroc en matière de biotechnologie agronomique s'articule autour des axes suivants :

- la protection des végétaux ;
- la propagation clonale ;
- l'amélioration végétale.
- l'olivier : conditions optimales de la régénération par culture des tissus.
- les citrus : techniques de microgreffage.
- Les travaux effectués par l'Institut national de la recherche agronomique (INRA) qui avaient pour objectif d'atténuer l'insuffisance du taux de multiplication du palmier dattier en conditions naturelles.

Il est à souligner que l'activité prédominante de la biotechnologie au Maroc est celle de la culture des tissus en recherche agronomique. Le transfert technologique en matière de la culture des tissus vers le secteur industriel reste le créneau le plus important. Parmi les acteurs impliqués dans ce domaine :

- la Société de gestion des terres agricoles (SOGETA) qui a mis en place un laboratoire industriel pour l'assainissement et la régénération des plants de pomme de terre.
- les Domaines Royaux de Meknès : c'est une unité industrielle de multiplication de vitro-plants palmier dattier, de bananier et de verveine.
- la Société de développement agricole (SODEA) qui possède une unité destinée à l'assainissement et la micropropagation des agrumes.

Actuellement, et suite à une initiative de l'INRA, le MAROC dispose de plusieurs laboratoires, équipés d'outils biotechnologiques, installés dans les centres régionaux de la recherche agronomique (CRRA). Afin de remplir leurs missions, plusieurs techniques et outils biotechnologiques sont utilisés dans ces laboratoires :

- ✓ les techniques de marquage moléculaire ;
- ✓ les cartographies du génome et la sélection des QTIs (Qualitative Trait Loci) ;
- ✓ la transformation génétique ;
- ✓ la multiplication in vitro des plantes ;
- ✓ l'embryogenèse somatique ;
- ✓ la micropropagation ;
- ✓ la culture d'apex ;
- ✓ les suspensions cellulaires ;
- ✓ l'hybridation somatique.

Malgré les progrès constatés au Maroc dans le domaine de la biotechnologie, les experts constatent un écart entre les préoccupations de l'industrie agro-alimentaire et la recherche scientifique. Néanmoins, des efforts sont déployés dans ce domaine pour établir une certaine convergence entre le besoin industriel et la recherche scientifique. Ceci est illustré notamment par le nombre important des laboratoires créés dans différentes universités qui opèrent dans les biotechnologies classiques (non moléculaires) ou dans les biotechnologies modernes (technique d'ADN et le transfert de gène). Pour réussir à réduire cet écart, le Maroc est amené à faire face à plusieurs contraintes qui entravent l'évolution de la biotechnologie dans l'agronomie et l'agro-alimentaire.

L'insuffisance de moyens en termes d'équipements et de matières d'approvisionnement demeure parmi les obstacles qui pèsent lourdement sur ce secteur. Le problème de la maintenance est également posé car le matériel scientifique n'est pas toujours entretenu, faute de formation dans ce domaine. A cela, s'ajoute le problème d'accès à l'information surtout que la biotechnologie évolue d'une manière vertigineuse et les acteurs du secteur sont donc censés être à la page des nouvelles découvertes.

Matériel et méthodes

I- Materiel biologique :

➤ Les cultures à tester :

L'OLIVIER :

L'olivier est une espèce diploïde caractéristique du paysage méditerranéen. Il appartient à la famille des Oléacées qui regroupe 30 genres et 600 espèces environ. la floraison de l'olivier peut se situer en moyenne entre la dernière semaine du mois d'avril et la mi-mai, elle s'étale sur une période moyenne de 25 jours et peut varier de 10 à 35 jours.

L'olivier n'est pas exigeant en photopériode mais la lumière constitue un facteur de production limitant. Il exige beaucoup de lumière pour végéter et fructifier normalement. Pour une bonne production, l'olivier reste relativement exigeant en eau, malgré sa rusticité et ses caractéristiques xérophytiques.

Dans ce rapport, l'étude des variétés suivantes sera réalisée:

- HAOUZIA (Ha) : il s'agit d'un clone sélectionné de la population dénommée picholine marocaine de la localité Ménara à Marrakech.
- MENARA : c'est une sélection aussi, mais de la variété de la population de l'olivieraie Ménara à Marrakech.
- PICHOLINE DE LANGUEDOC (Pic) : c'est une variété française assez rustique et s'adapte bien à différents environnements mais elle est exigeante quant à certaines pratiques de culture.
- ARBEQUINE : c'est une variété espagnole de vigueur moyenne qui a une teneur en huile assez élevée.
- FRANTOIN (Fr) : c'est une variété italienne sensible à l'œil du paon, à la tuberculose, à la mouche de l'olive ainsi qu'au froid.
- PICHOLINE MAROCAINE 1 (Pm1)
- PICHOLINE MAROCAINE 2 (Pm2)
- Picual (Pi)

- Gordale (Go)

II- Techniques

➤ 1) La lyophilisation :

La lyophilisation ou séchage à froid, est un procédé qui permet de retirer l'eau contenu dans un aliment ou un produit, afin de le rendre stable à la température ambiante et ainsi faciliter sa conservation. Cette opération se déroule dans un appareil appelé lyophilisateur.



Figure 1 : schéma d'un lyophilisateur

La lyophilisation utilise un principe physique fort simple qu'on appelle la sublimation. Cette dernière consiste en le passage d'un élément de l'état solide à l'état gazeux directement sans passer par l'état liquide. Dans le cas de l'eau que l'on veut retirer de la matière végétale, l'opération de lyophilisation consiste à :

- 1- Congeler la matière végétale pour que l'eau qu'elle contient soit sous forme de glace.
- 2- Sous l'effet du vide, la glace est directement sublimée en vapeur d'eau.
- 3- La vapeur d'eau est ensuite récupérée.

Une fois que toute la glace est sublimée, les aliments sont séchés à froid et peuvent être retirés de l'appareil. **(lyo-san)**

➤ 2) L'extraction de l'ADN :

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissus. L'ADN ainsi extrait peut être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lyse des cellules.
- Elimination des protéines.
- Elimination des autres acides nucléiques (ARN).
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool. **(Wikipedia)**

➤ 3) La technique de PCR :

La PCR (réaction en chaîne par polymérase) fut inventé par K. Mullis en 1983 et brevetée en 1985. Son principe repose sur l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable, il s'agit d'une répllication in vitro de séquences spécifique d'ADN. Cette méthode permet de générer jusqu'à des dizaines de milliards d'exemplaires d'un fragment d'ADN particulier (la séquence d'intérêt ou ADN cible) à partir d'un ADN matriciel. En effet, si la séquence d'intérêt est présente dans l'extrait d'ADN, il est possible de la répliquer de façon sélective (on parle d'amplification) en très grande quantité. La puissance de la PCR repose sur le fait que la quantité d'ADN matriciel n'est pas en théorie un facteur limitant. Des séquences nucléotidiques peuvent donc être amplifiées à partir de quantités infinitésimales d'extrait d'ADN.

La PCR est donc une technique de purification et de clonage. L'ADN extrait à partir d'un organisme ou d'un échantillon contenant des ADN d'origines diverses n'est pas directement analysable, il contient une masse trop importante de séquences nucléotidiques. Il convient donc d'isoler, de purifier la ou les séquences qui présentent un intérêt, qu'il s'agisse de la séquence d'un gène ou de séquences non codantes (introns, transposons, mini ou microsatellites....). A partir d'une telle masse de séquences que constitue l'ADN matriciel, la PCR peut donc sélectionner une ou plusieurs séquences déterminées et les amplifier par répllication à des dizaines de milliards de copies. Une fois la réaction terminée, la quantité extrêmement faible d'ADN matriciel contenue dans l'échantillon PCR n'aura pas varié. En revanche, la quantité de la ou des séquences amplifiées (l'ADN d'intérêt) sera très élevée.

Les applications de la PCR sont multiples, c'est une technique désormais incontournable en biologie cellulaire et moléculaire. Elle permet notamment en quelques heures, le « clonage cellulaire » d'un fragment d'ADN grâce à un système automatisé, alors qu'il faut plusieurs jours avec les techniques standards de clonage moléculaire. La PCR est également largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un fluide biologique. Elle est aussi employée pour réaliser des empreintes génétiques, qu'il s'agisse de l'identification génétique d'une personne dans le cadre d'une enquête judiciaire, ou de l'indentification de variétés animales, végétales ou microbiennes destinée a des tests de qualité alimentaire, de diagnostic ou de sélection

variétale. La PCR est aussi indispensable à la réalisation d'un séquençage ou d'une mutagenèse dirigée et il en existe plusieurs variantes telles que la real-time PCR, PCR in situ, RT-PCR.....

La PCR permet donc d'obtenir par réplication in vitro de multiples copies d'un fragment d'ADN à partir d'un extrait. L'ADN matriciel peut tout autant être de l'ADN complémentaire obtenu par RT-PCR (Réverse transcriptase –PCR) à partir d'un extrait d'ARN messagers (ARN poly –A), ou encore l'ADN mitochondrial. **(Jamal Charafi)**

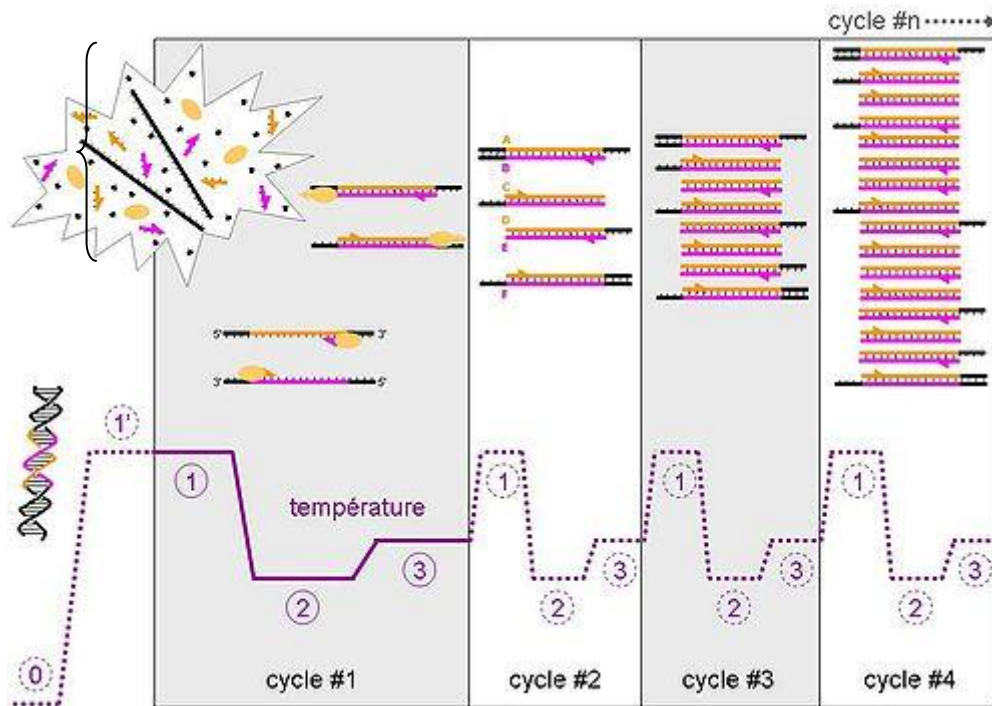


Figure 2 : Etapes de la PCR

De 0 à 1' => extraction de l'ADN à température ambiante.

1' => lancement de la PCR, Temps =0.

1 => dénaturation à 95°C.

2 => amplification à une température entre 50 et 60°C selon les amorces utilisées.

3 => élongation à 72°C.

{Le contenu des tubes à PCR : ADN à amplifier ; amorces ; ADN polymérase et les 4dNTP.

➤ **4) Techniques de marquage moléculaire :**

Un marqueur moléculaire ou génétique désigne tout fragment spécifique d'ADN pouvant être identifié au sein du génome. Ces marqueurs sont utilisés pour localiser un gène particulier ou vérifier si un individu a hérité d'une caractéristique particulière d'un organisme parent. Dans un croisement génétique, les caractéristiques d'intérêt resteront généralement liées aux marqueurs moléculaires ce qui permettra donc de sélectionner les

individus chez lesquels le marqueur moléculaire est présent, étant donné que ce marqueur indique la présence de la caractéristique recherchée.

Un marqueur génétique « idéal » doit présenter les caractéristiques suivantes :

- Polymorphe : la « matière première » du généticien est la variabilité.
- Multi-allélique.
- Co-dominant : l'hétérozygote présente simultanément les deux caractères des deux parents homozygotes.
- Non épistatique : son génotype peut être « lu » à partir de son phénotype quel soit le génotype aux autres locus. La codominance et la non-épistasie peuvent être respectivement définies comme l'absence d'interactions intra et inter locus.
- Neutre : les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques (et donc effectivement sélectifs) que ceux qui permettent de déterminer son génotype. Dans leur très grande majorité, les polymorphismes moléculaires sont neutres.
- Insensible au milieu : le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu.

Les marqueurs morphologiques répondent mal à ces critères. Ils sont peu polymorphes, en général dominants, ils interfèrent souvent avec d'autres caractères, et peuvent être influencés par le milieu. En outre, même s'ils sont très nombreux chez certaines espèces (plusieurs centaines chez certaines espèces comme le riz et le maïs), peu d'entre eux peuvent être conjointement polymorphes dans une descendance donnée. En revanche, les marqueurs biochimiques ou moléculaires ont pour la plupart, toutes ces qualités.

Les marqueurs biochimiques et moléculaires ont de nombreuses applications en génétique des plantes. Ils permettent d'observer, de façon plus ou moins fine, le polymorphisme de séquences de l'ADN d'un certain nombre de sites ou de locus répartis sur le génome. En plus, les marqueurs biochimiques révèlent le polymorphisme des séquences de certaines protéines et donc, de façon indirecte, le polymorphisme des séquences d'ADN à partir desquelles elles sont traduites. Les marqueurs moléculaires révèlent directement le polymorphisme de l'ADN de séquences ciblées correspondant ou non à des séquences codantes.

Parmi les techniques de marquage on peut citer :

- **La technique de RAPD** : (random amplified polymorphic DNA). L'amplification aléatoire d'ADN polymorphe est une technique d'analyse de l'ADN utilisée en biologie moléculaire. La technique RAPD est basée sur la méthode PCR. L'amplification du DNA génomique est, cette fois ci, réalisée à partir d'amorces de séquences aléatoires (10 bases, environ), utilisées seules ou par couples. Lorsqu'une seule amorce aléatoire est utilisée, l'amplification a lieu une fois celle-ci se fixe sur 2 sites complémentaires peu distants (maximum théorique de la PCR : 3000 pb).

- **La technique AFLP** : Amplification Fragment Length Polymorphism ou polymorphisme de longueur des fragment d'amplification est une amplification PCR d'ADN génomique après digestion avec deux enzymes de restriction et ligation d'un adaptateur d'environ 20 paires de bases. Les amorces sont constituées de l'adaptateur plus trois bases aléatoires en 3'.
- **La technique ISSR** : Inter Simple Séquence Repeats. Il s'agit d'une amplification inter microsatellite. L'Amplification par PCR est réalisée sur de l'ADN génomique avec des amorces qui portent des motifs répétés di nucléotidiques et quelques amorces arbitraires. Les fragments amplifiés sont donc situés entre des loci microsatellites. Pour cela, une amorce constituée pour partie d'une séquence de microsatellites et pour autre des bases arbitraires est utilisée. Deux types d'amorces sont concevables selon les positions relatives de ces deux parties. La PCR va amplifier en même temps de nombreux fragments flanqués de microsatellites, donc très polymorphes.
- **La technique SSR** : Simple Séquence Repeats. Les microsatellites ou SSR sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-ou tétra-nucléotidique. Les plus courants sont (A)_n, (TC)_n, (TAT)_n, (GATA)_n etc... avec la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. Si un microsatellite donné n'est pas spécifique d'un locus, les régions flanquantes le sont. Une paire spécifique de ces régions flanquantes amplifiera donc ce seul microsatellite, dont le polymorphisme de longueur sera révélé par électrophorèse sur gel d'agarose (si les différences de longueur entre les allèles sont importantes); ou plus couramment en gel d'acrylamide. **(D.de Vienne, éd)**

➤ 5- La technique d'électrophorèse :

L'électrophorèse est une technique biochimique de séparation fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. La technique de l'électrophorèse est fondée sur le déplacement d'ions (molécules ayant perdu leur neutralité électrique) sous l'effet d'un champ électrique. Du fait de leurs caractéristiques propres, et en fonction des conditions de l'électrophorèse, ces ions auront des vitesses de migration différentes, ils vont donc se séparer les uns des autres. Les molécules anioniques (-) migrent vers l'anode (+) et les molécules cationiques (+) se déplacent vers la cathode (-). Pour les acides nucléiques, les charges sont portées par les groupements phosphates du squelette. Le champ électrique est fourni par un générateur de courant continu, le support de ce champ est constitué par une solution tampon de PH et de concentration convenables dont les ions conduisent le courant d'un pôle à un autre. Ce support peut être liquide, on parle alors d'électrophorèse en veine liquide.

✓ Electrophorèse sur gel d'agarose :

L'électrophorèse en gel d'agarose est une technique de base au laboratoire de biologie moléculaire. Elle est utilisée soit à des fins analytiques pour séparer et identifier des fragments d'ADN, pour déterminer leur taille, ou pour en estimer la quantité, soit à des fins préparatrices, pour purifier un fragment d'ADN de taille connue. La taille des fragments qu'il est possible de séparer étant comprise entre 0.2 et 50 kb. Les fragments d'ADN sont facilement détectés sur le gel grâce à un colorant fluorescent, le bromure d'éthidium (BET). On peut ainsi visualiser en rayonnement UV, des quantités très faibles d'ADN (de l'ordre de 5-10 ng). L'électrophorèse en gel est donc une technique très sensible; elle est rapide et simple à mettre en œuvre.

A pH neutre, les molécules d'ADN sont chargées négativement du fait de la présence des phosphates et migrent donc vers l'anode lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. Leur rapport charge/ taille étant constant, ces molécules se séparent essentiellement en fonction de la facilité avec laquelle elles progressent à travers le réseau d'agarose. La vitesse de migration d'une molécule d'ADN est en fonction de deux paramètres: sa taille et la concentration en agarose du gel, le voltage et la force ionique du tampon interviennent également. Un fragment d'ADN d'une taille donnée migre d'autant plus vite que le pourcentage d'agarose est plus faible pour une tension faible, la vitesse de migration de L'ADN linéaire est proportionnelle à cette grandeur. D'une manière générale, la résolution des fragments est d'autant meilleure que le voltage est faible, idéalement 5V par cm de gel. La vitesse de migration n'est pas modifiée entre 4 et 30 °C, la migration peut se faire alors à température ambiante.

Deux tampons d'électrophorèse sont utilisés :

- tampon TAE : Tris Acétate EDTA => Tris-acétate 40 mM ,EDTA 1 mM PH7.8
- tampon TBE : Tris Borate EDTA => Tris-borate 90 mM ,EDTA 2 mM PH8.2 (dans notre cas c'est le tampon utilisé).

Pour des mêmes gels et à intensité constante, la migration est plus rapide dans le TBE que dans le TAE. Le tampon TBE est souvent utilisé préférentiellement par rapport au TAE.

✓ **Electrophorèse sur gel d'acrylamide :**

Cette technique est plus précise que la précédente car elle favorise la séparation des molécules de plus petites tailles et donc permet une comparaison de séquences plus précises. Elle se base sur le transfert d'ADN sur gel d'acrylamide dans une cuve électrophorétique verticale.

6)- Les Amorces :

- ✓ **Définition :** L'amorce est une courte séquence d'ARN ou d'ADN, complémentaire du début d'une matrice, servant de point de départ à la synthèse du brin complémentaire de cette dernière matrice par une ADN polymérase.

En ACP (amplification en chaîne par polymérase) l'utilisation d'une amorce "sens" et "anti-sens" permettent de définir la séquence de l'amplicon.

En séquençage, on n'utilise qu'une seule des deux amorces du produit d'ACP qu'on veut séquençer. Il ne faut pas avoir les deux séquences "sens" et "anti-sens" à passer ensemble dans le séquenceur, car ceci donnerait un électrophorégramme illisible.

L'amorce est synthétisée par une enzyme particulière, la primase.

✓ Les amorces utilisées :

DCA15-F: 5'- GATCTTGTCTGTATATCCACAC -3'
DCA15-R: 5'-TATACCTTTTCCATCTTGACGC -3'
DCA17-F: 5'-GATCAAATTCTACCAAAAATATA -3'
DCA17-R: 5'-TAATTTTTGGCACGTAGTATTGG -3'
DCA3-F: 5'-CCCAAGCGGAGGTGTATATTGTTAC -3'
DCA3-R: 5'-TGCTTTTGTCTGTTTGGAGATGTTG -3'
DCA5-F: 5'-AACAAATCCCATACGAACTGCC -3'
DCA5-R: 5'-GTGTTGCTGTGAAGAAAATCG -3'
GAPU59-F: 5'- CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA -3'
GAPU59-R: 5'-CAAAGGTGCACTTTCTCTCG -3'
GAPU71A-F: 5'- GATCATTTAAAATATTAGAGAGAGAGA -3'
GAPU71A-R: 5'-TCCATCCATGCTGAACTT -3'
GAPU71B-F: 5'-GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA -3'
GAPU71B-R: 5'-ACAACAAATCCGTACGCTTG -3'
UDO12-F: 5'-TCACCATTCTTAACTTCACACCA -3'
UDO12-R: 5'-TCAAGCAATTCCACGCTATG -3'
UDO14-F: TTCCCCTTATTCAATGTGAACC
UDO14-R: ACTGCAGTTTGGGAATCAAA
UDO17-F: GCCCACAACTCTTTGAACC
UDO17-R: GCGATTTTTCCCTGTATTTAGGT
UDO27-F: TCCGTGCAAACCATGAAATA
UDO27-R: TTGATGACTAGCACACATGTAGGA
UDO34-F: CTCTCGGGCATGTATCATT
UDO34-R: TTGCATATTTGTATGATTCATT
UDO36-F: AACACTGTGCCACCTCAACA
UDO36-R: GAACCCAACCCCATCTTAC
UDO44-F: AATTCCGACAAGTTGTGTGTG
UDO44-R: CACAGCACCCAACCAGATTT
UDO6-F: TCAGTTTGTGCTTTAGTGGA
UDO6-R: TTGTAATATGCCATGTAACCTCGAT

Partie pratique

L'analyse moléculaire commence par la collecte des variétés à étudier. Dans notre cas, il s'agit de l'olivier et du figuier. Une étape précède la lyophilisation et consiste à trier les feuilles collectées en choisissant les petites de préférence. Les feuilles sont ainsi enroulées dans des tissus en notant le nom de chaque variété, et ensuite mises au congélateur à -22°C , pendant une dizaine d'heures.

Afin de sécher ces échantillons, le lyophilisateur passe par deux étapes essentielles. La première consiste à préparer une température convenable aux échantillons déjà congelés (afin d'empêcher leur décongélation) par la congélation du lyophilisateur pendant 1h30 et la deuxième étape est une dessiccation primaire qui peut durer 24h voire même plus, selon la quantité d'eau contenue dans l'échantillon.

Après la dessiccation des échantillons, une extraction de l'ADN est réalisée. Les étapes de l'extraction se déroulent comme suit :

- 20 à 40 mg de feuilles lyophilisées sont broyées manuellement. La poudre est mise dans un tube Eppendorf de 2 ml.
- 1250 μl de tampon d'extraction CTAB sont ajoutés.
- Les extraits sont placés dans un bain marie réglé à 65°C (30 min à 1h) en mixant à l'aide d'un vortex toutes les 15 min.
- 500 à 700 μl du chloroforme /iso amylique (24/1) sont ajoutés.
- Une agitation manuelle pendant 15 à 20 min est ensuite réalisée.



Figure 3: Agitateur

- Une centrifugation à 13000 rpm (rotation par minute) à 25°C pendant 10 min est réalisée.
- Le surnageant est récupéré.
- 500 μl du chloroforme/iso-amylque (24/1) sont ajoutés

- Une agitation manuelle pendant 3 min est réalisée.
- Une centrifugation est réalisée à 13000 rpm à 25 °C pendant 10 min.
- Le surnageant est récupéré et 800 µl d'iso-propanol froid sont additionnés.
- Les tubes sont laissés 30 min ou plus à 4°C avant la dernière centrifugation réalisée à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C.



Figure 4 : Centrifugeuse

- Le culot est récupéré et rincé avec 500 µl d'éthanol froid 70 %.
- Les tubes Eppendorf sont séchés de l'éthanol dans un dessiccateur.
- 100 µl de la solution Tris-EDTA (0.5x) sont additionnés.
- Les échantillons sont conservés dans le congélateur.

Avant toute extraction :

- Les mortiers doivent être chauffés continuellement dans l'étuve à 85 °C.
- Le tampon d'extraction doit toujours être dans le bain marie réglé à 65°C.

❖ Préparation du tampon d'extraction CTAB (100ml) :

- | | |
|---|---------|
| ➤ Tris (1M) PH =8 | : 10 ml |
| ➤ EDTA (0.5M) PH=8 | : 4 ml |
| ➤ NaCl | : 8.2 g |
| ➤ CTAB | : 2 g |
| ➤ PVP 40000 5Ply-vinyl pyrrolidone) | : 0.5 g |
| ➤ Na-Bisulfate (Sodium di-sulfite)* | : 0.2 g |
| ➤ B-mercaptoethanol (solution toxique)* | : 20 ul |
| ➤ H2O distillée | : 86 ml |

Les deux solutions marquées par étoile ne sont ajoutées qu'au moment de l'utilisation du tampon.

❖ Préparation de la solution chloroforme /iso-amylque (24/1) :

Pour 100 ml il faut additionner 96 ml de la solution chloroforme à 4ml de la solution iso-amylque. C'est deux solution sont toxiques.

Une dilution des échantillons d'ADN préalablement extrait est réalisée afin d'estimer la qualité d'ADN par lecture au spectrophotomètre.



Figure 5: Spectrophotomètre

Cette dilution est de l'ordre de 1/40: 5 μ l de l'échantillon +195 μ l d'eau distillée.

Les résultats de la lecture au spectrophotomètre nous indiquent la concentration nécessaire afin de réaliser la PCR (la concentration idéale d'ADN doit être comprise entre 15 et 20 ng/ μ l).

L'ADN dilué subit ensuite une amplification par la méthode de PCR qui nécessite la préparation du Mix réactionnel :

Mix réactionnel : (quantités pour un seul échantillon en μ l).

Eau ultra pure	: 13.07
Tampon (x10)	: 2.5
MgCl ₂	: 1.5
DNTP	: 2
Amorce	: 2.5
Taq polymérase	: 0.3
ADN	: 2.5

L'ADN est d'abord déposé au fond de la plaque (ou dans des tubes Eppendorf à PCR) par ordre de 5 à 10 μ l. Ensuite un volume de 22.50 μ l du Mix est ajouté pour chaque solution.

La Taq polymérase, enzyme qui permet l'amplification de l'ADN, n'est ajoutée qu'à la fin. Les échantillons sont mis dans un thermocycleur en choisissant un programme adéquat aux températures d'hybridations de chaque amorce utilisée.



Figure 6 : Thermocycleur



Figure 7 : tubes eppendorf à PCR

Les mêmes conditions PCR développés par Ahtak (2009) seront appliquées pour faciliter la comparaison et la validation des allèles. Les conditions d'amplification sont les suivantes : une première dénaturation à 94°C pendant 5 min suivie de 35 cycles successifs, chaque cycle comprend une succession de trois phases : une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une phase d'hybridation à la température optimale 50 ou 57°C selon l'amorce pendant 1 min et une élongation à 72°C pendant 1 min. Enfin une dernière étape d'élongation à 72°C pendant 5 min est programmée et une phase de refroidissement à 4°C.

&- Electrophorèse en gel d'agarose

Après la PCR, la visualisation des bandes d'ADN par les rayons UV est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose à 2%.

Préparation de gel de migration :

✓ **Préparation de TBE x 5** (tampon de migration) :

Pour 1L : 53.91g de tris + 3.72g d'ETDA + 27.52g d'acide borique

✓ **Préparation du gel d'agarose 2%** :

Agarose 2% : 6g d'agarose + 300 ml de TBE x1

(TBE x1 => 60 ml de TBE x5 + 240 ml d'eau distillée)

Le gel doit être coulé rapidement dans la cuve où le peigne est préalablement posé. Après la solidification du gel, l'ADN + le bleu bromophénol sont déposés dans les puits (environ 20 µl du mélange). La migration de l'ADN se fait du pôle négatif vers le pôle positif.

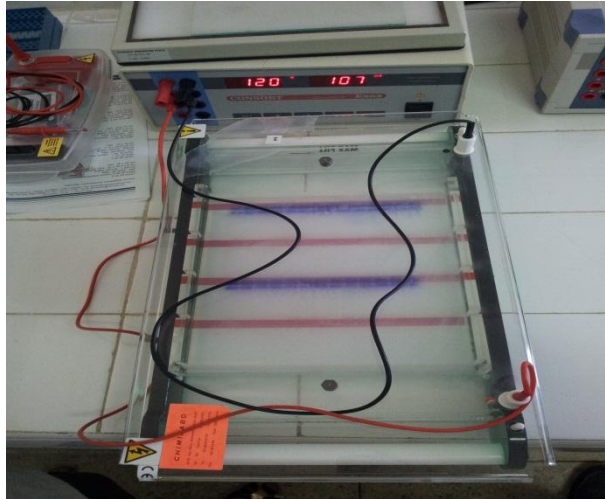


Figure 8 : ADN en phase de migration sur gel d'agarose

Après le temps nécessaire pour la migration de l'ADN qui permet ainsi la séparation des bandes, le gel est transféré dans une bassine contenant 1L d'eau distillée + 100 μ l de BET (Bromure d'Ethidium). Le BET est une molécule qui se fixe à l'ADN en donnant une coloration orange au contact des rayons UV (le support de gel ne doit pas être contaminé par le BET). La bassine est ensuite mise en agitation pendant 30 min à l'abri de la lumière et le gel est placé dans la chambre noire où se réalisera la révélation.

Après la mise au point de la lumière et le zoom de l'appareil, un profil similaire au suivant est obtenu :

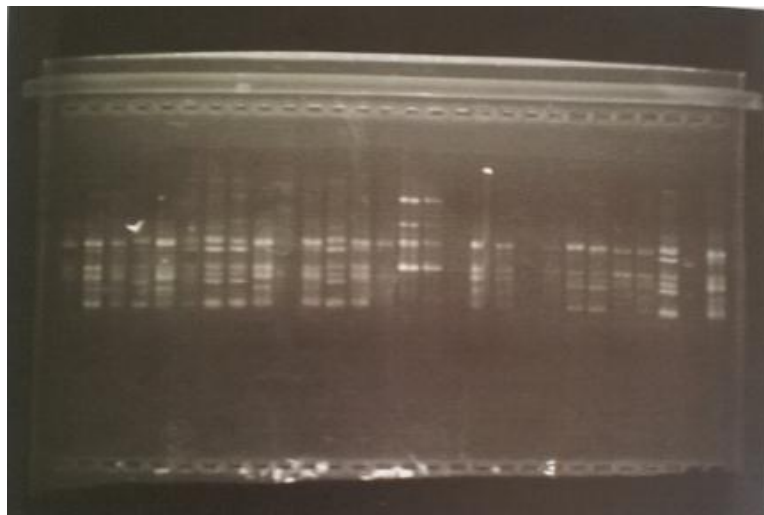


Figure 9 : Schéma d'un profil électrophorétique

Electrophorèse en gel d'acrylamide

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide permet de donner des résultats plus précis. Pour cela, on procède à la réalisation de cette technique :

➤ PREPARATION DES PLAQUES

1) Préparation de la plaque à encoches :

La plaque où le gel est fixé est trempée dans une solution de NaOH 2N. Elle est ensuite lavée avec un détergent, rincée puis lavée à l'alcool.

La plaque est placée sous la hotte.

La solution de liaison est préparée dans un microtube de 1,5 ml.

Il faut faire tremper la plaque où se trouve fixé le gel, dans une solution de NaOH 2 N (le gel

doit se détacher Bind Silane) 3 ml

Alcool 95° 1 ml

Acide Acétique 100% 5 ml

Après avoir mélangé, il faut répartir ce mélange sur la plaque et essuyer avec un papier Kimwipes. Laisser sécher 5 minutes.

Le lavage est ensuite réalisé 3 fois avec de l'éthanol à 95° et il faut changer de sens à chaque lavage, essuyer, et enfin laisser sécher 15 minutes.

2) Préparation de la plaque longue

La plaque siliconée est lavée à l'eau puis à l'alcool à 95°.

Il faut vérifier qu'elle est bien siliconée (sinon appliquer 2 ml de Sigmacote de Sigma).

La plaque est laissée sécher 5 min sous la hotte et elle est rincée à l'eau et à l'alcool.

Ensuite, il faut placer les espaceurs, positionner la plaque à oreillette face traitée au Bind Silane sur les espaceurs, et mettre les 6 pinces pour fixer les plaques et vérifier le niveau.

➤ PREPARATION DE LA SOLUTION DE GEL D'ACRYLAMIDE 6 %

(20:1 acrylamide: bis; 7,5 M urée; Tampon TBE IX) :

Urée : 45g

Acrylamide 40% : 15 ml

BET x5 : 20 ml

La quantité suffisante d'eau distillée est ajoutée pour atteindre 100 ml de la solution)

Après avoir mélangé, il faut filtrer avec un filtre de 0,22 µm puis, mettre au froid pendant 15 minutes environ pour éviter une polymérisation trop rapide (on peut en faire une plus grande quantité et la conserver au froid).

➤ COULAGE DU GEL :

100 ml Gel d'acrylamide 6 %

100 µl TEMED

500 µl Persulfate ammonium 10 %

Mélanger sans faire de bulles

Le gel est coulé en ayant incliné légèrement les plaques. Il faut verser le gel de façon homogène sur la partie supérieure de la plaque longue, jusqu'à ce qu'il arrive à la partie

inférieur de la plaque, remettre les plaques à niveau et mettre le peigne de coulage (mettre un masque pour éviter les éventuelles projections).
Ensuite, il faut mettre des pinces au niveau de la ligne de base et laisser polymériser 1 heure. Le reste du gel est laissé polymériser dans le bécher comme témoin.
(Si on n'utilise pas le gel le jour même, envelopper les plaques de saran wrap et mettre au réfrigérateur ou laisser sur la paillasse si la pièce est climatisée).

➤ Pré-Run :

Rentrer les valeurs limites du générateur 3000V et 300 mA.
Mettre sous tension à 60 W puissance constante afin d'atteindre la température de 50° au niveau des plaques, environ 1 heure.

➤ PREPARATION DES ECHANTILLONS :

Les échantillons sont dénaturés 5 minutes à 95°C ainsi que le marqueur de taille et sont mis dans la glace.

Après le dépôt, la migration se fait à 60 W. Le temps de migration dépend du marqueur utilisé.

➤ Les solutions utilisés :

Solution de fixation (Acide acétique glacial à 10 %)

200 ml Acide acétique
1800 ml H2O ultra pure

Solution de coloration (Nitrate argent)

2g Nitrate argent
2000 ml H2O ultra pure

Agiter et mettre le récipient au réfrigérateur.
Au dernier moment ajouter une ampoule de Formaldehyde à 37 % et agiter.

Solution de révélation

60g Carbonate de sodium
2000 ml H2O ultra pure

Agiter et mettre le récipient au réfrigérateur.
Au dernier moment, il faut ajouter une ampoule de formaldehyde à 37 % et 400 µl de thiosulfate de sodium.

➤ COLORATION A L'ARGENT :

Fixation du gel

Une fois la migration terminée, les plaques sont enlevées du support et il faut décoller la plaque courte avec le gel de la plaque longue.

Le gel (plaque) est mis dans un bac en plastique avec la solution de fixation à l'abri de la lumière.

Une agitation est réalisée pendant 30 minutes, et la solution de fixation est gardée pour l'arrêt de la coloration

Un rinçage est réalisé 3 fois pendant 2 minutes dans 3 bacs contenant chacun 2 L d'eau ultra pure froide.

A chaque sortie de bac, il faut laisser égoutter 5 à 10 secondes.

Coloration du gel

Le gel (plaque) est mis dans un bac en plastique avec la solution de nitrate d'argent à l'abri de la lumière. Une agitation pendant 30 minutes est réalisée.

Le gel est rincé dans un bac contenant 2 L d'eau ultra pure froide pendant 5 à 10 secondes maximum. Ce temps est très important.

Révélation du gel

Le carbonate de sodium est réparti dans 2 bacs en plastique.

Le gel est mis dans le premier bain en agitant jusqu'à l'apparition des premières bandes.

Le gel est ensuite mis dans le deuxième bain de bicarbonate de sodium, jusqu'à la révélation complète des bandes.

La solution d'acide acétique est ajoutée pour arrêter la révélation.

Le gel est rincé dans un bac d'eau ultra pure et enfin séché.

Résultats et discussion

I. Résultats :

1. Résultats de l'extraction de l'ADN :

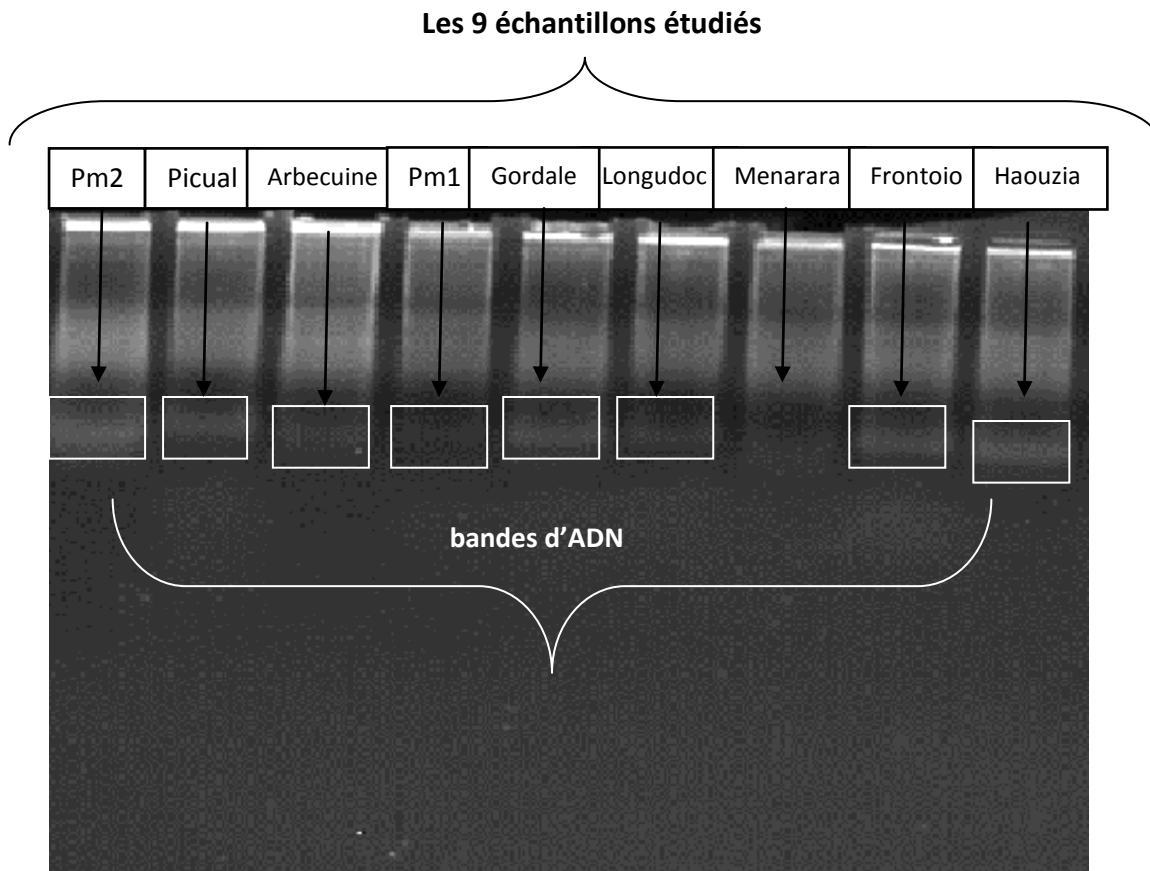
a) Echantillons utilisés pour l'extraction de l'ADN :

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir de 9 échantillons différents représentés par 9 variétés d'oliviers (cités dans matériel et méthodes) et qui sont les suivants : Pm2, Picual, Arbequina, Pm1, Gordale, Longudoc, Menara, Frontoio et Haouzia.

Remarque : le travail réalisé sur les échantillons du Figuier n'a pas donné de résultats significatifs, pour cela, on va se restreindre aux résultats obtenus avec les échantillons d'olivier.

L'ADN extrait est ensuite analysé par électrophorèse en gel d'agarose pour contrôler la qualité de l'extraction et des produits extraits. Le résultat de l'électrophorèse est représenté dans la figure 1.

b) Electrophorèse sur gel d'agarose des ADN extraits:



Figur1: Profil électrophorétique sur gel d'agarose à 2% analysant l'ADN extrait à partir des 9 échantillons.

c) Dosage de l'ADN extrait :

La quantité d'ADN extraite est déterminée par dosage spectrophotométrique. Avant de procéder à la mesure de la densité optique, une dilution d'ordre 1/40 est réalisée afin d'obtenir des concentrations précises d'ADN par le spectrophotomètre.

Les résultats du dosage obtenus sont illustrés dans le tableau suivant :

Tableau 1 : concentrations d'ADN déterminée pour chacun des échantillons après une dilution d'ordre 1/40 :

Echantillons	Concentration d'ADN en (ng/ μ l)
Pm2	207,44
Picual	436,04
Arbecuine	156,53
Pm1	215,80
Gordale	302,81
Longudoc	500,94
Menara	126,57
Frontoio	129,82
Haouzia	130,32

La concentration idéale d'ADN nécessaire pour un bon déroulement de la réaction de PCR, doit être comprise entre 15 et 20 ng/ μ l.

Tableau 2 : dilutions nécessaires pour obtenir une concentration d'ADN égale à 20ng/ μ l pour chacun des échantillons :

Echantillons	Concentration d'ADN en (ng/ μ l)	Vi (μ l)	Vd'eau distillé (μ l)	Vf (μ l)
Pm2	207,44	50	450	500
Picual	436,04	23	477	500
Arbecuine	156,53	32	218	250
Pm1	215,80	46,5	453,5	500
Gordale	302,81	33	467	500
Longudoc	500,94	20	480	500
Menara	126,57	40	210	250
Frontoio	129,82	38,5	211,5	250
Haouzia	130,32	38,5	211,5	250

d) Résultats de l'amplification de l'ADN des 9 échantillons par PCR, utilisant les 2 amorces GAPI 71A et GAPI 71B:

L'ADN extrait des 9 échantillons a été l'objet d'une amplification par PCR en utilisant plusieurs amorces. Le résultat ci- dessous est celui obtenu avec seulement deux amorces GAPI 71A et GAPI 71B.

La qualité de la réaction PCR et celle des produits amplifiés est réalisée par un test en gel d'agarose à 2%. Les résultats sont présentés dans la figure suivante :

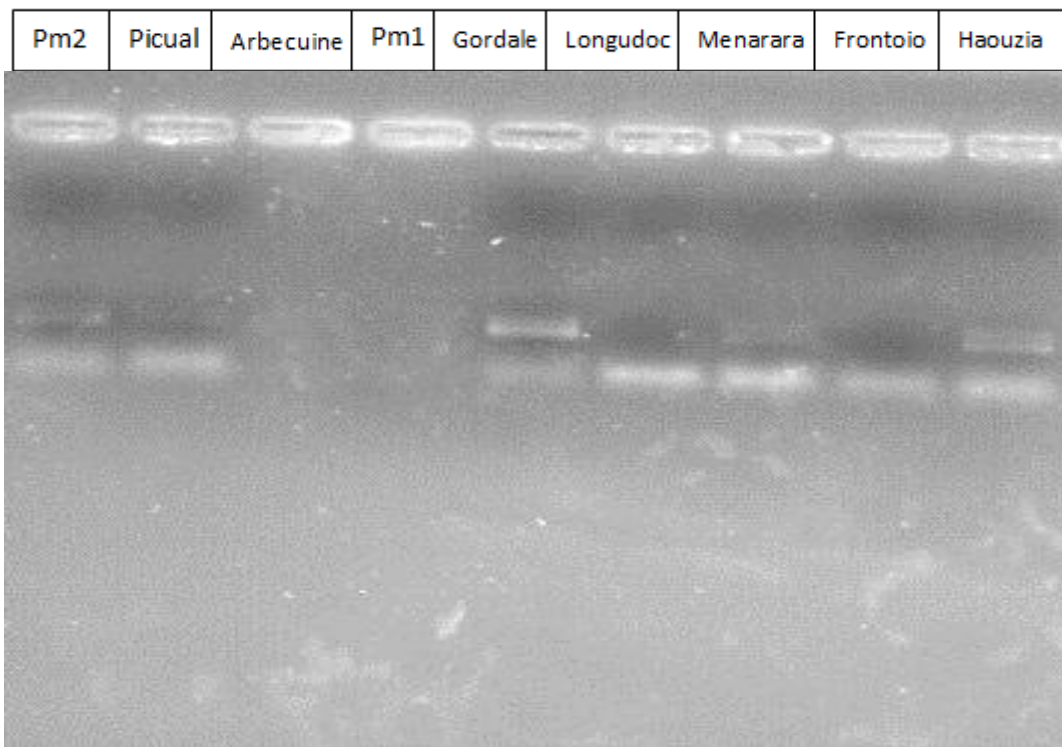


Figure 2: Profil électrophorétique sur gel d'agarose à 2% des 9 échantillons amplifiés avec l'amorce GAPU71B.

La non utilisation d'un marqueur de taille ne nous permet pas de connaître la taille des bandes. Les deux figures 2et 3 sont utilisées simplement comme test pour voir la qualité des produits d'amplification avant de procéder à l'électrophorèse sur gel d'acrylamide qui nous permettra de déterminer la taille des bandes.



Figure 3 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose de 2% des 9 échantillons amplifiés avec l'amorce GAPU71A.

Le test réalisé par électrophorèse en gel d'agarose avec les deux amorces, montre des bandes nettes pour la plupart des échantillons, témoignant d'une bonne amplification de la séquence recherchée.

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide étant plus sensible, elle a été par la suite appliquée pour avoir plus de précisions sur la taille des produits amplifiés.

e) Electrophorèse sur gel d'acrylamide:

Pour déterminer la taille et le nombre des allèles coexistant pour chaque locus, une analyse sur gel d'acrylamide a été réalisée.

Les résultats obtenus après la réalisation de cette électrophorèse sont résumés dans les figures 4 et 5.

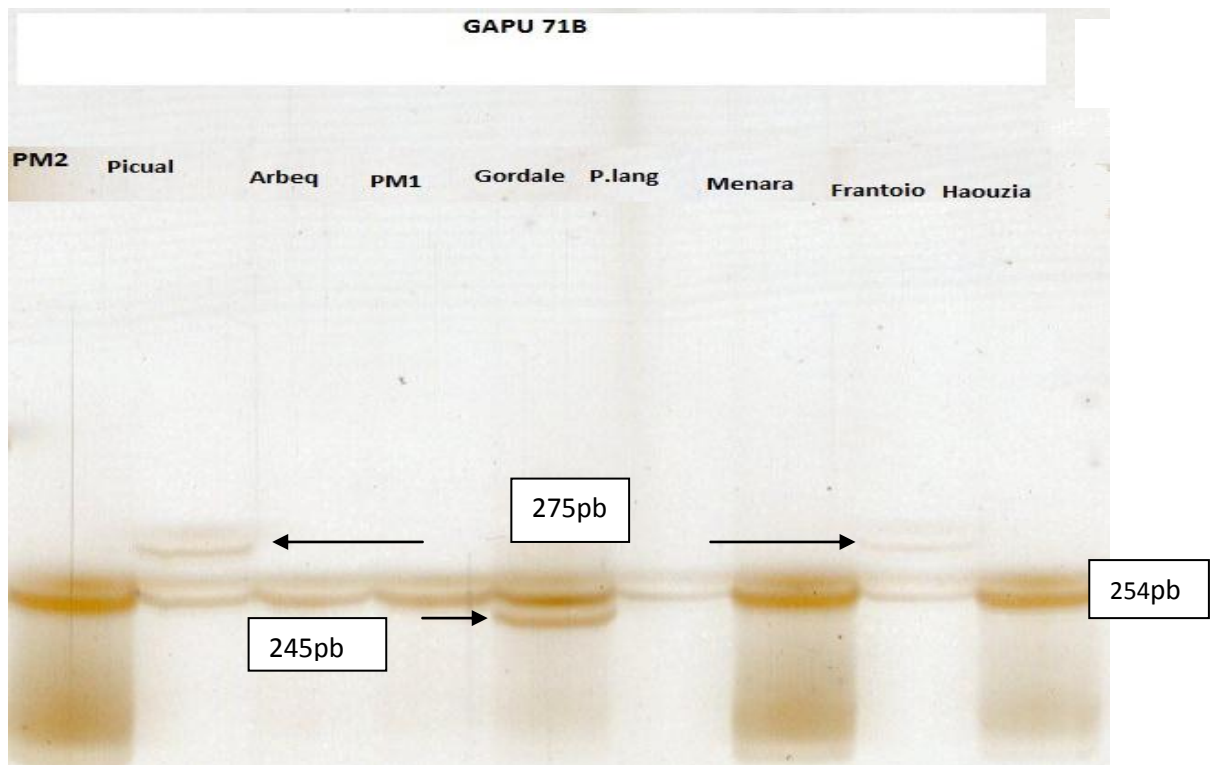


Figure 4 : Profil génomique SSR généré par l'amorce GAPU71B à partir des 9 variétés d'olivier

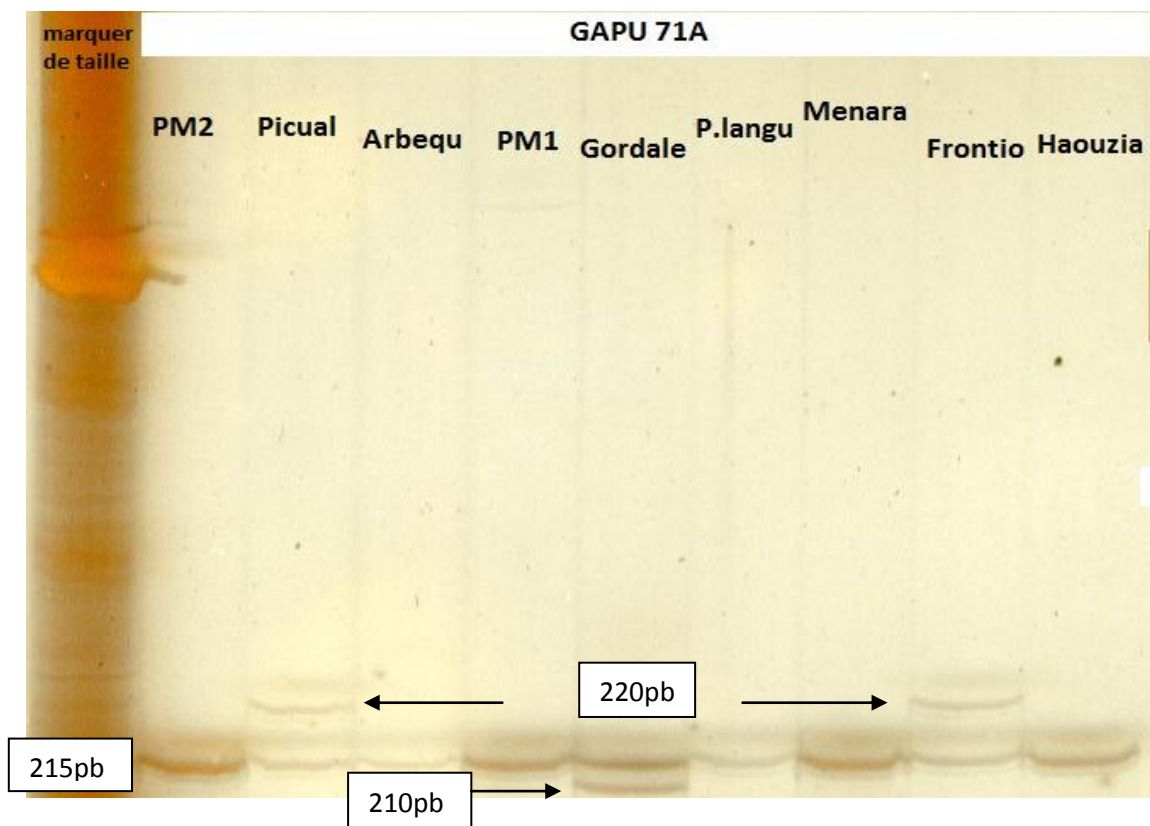


Figure 5 : Profil génomique SSR généré par l'amorce GAPU71A à partir des 9 variétés d'olivier

La taille des allèles obtenue à partir des différents échantillons, est déterminée à partir du graphe suivant :

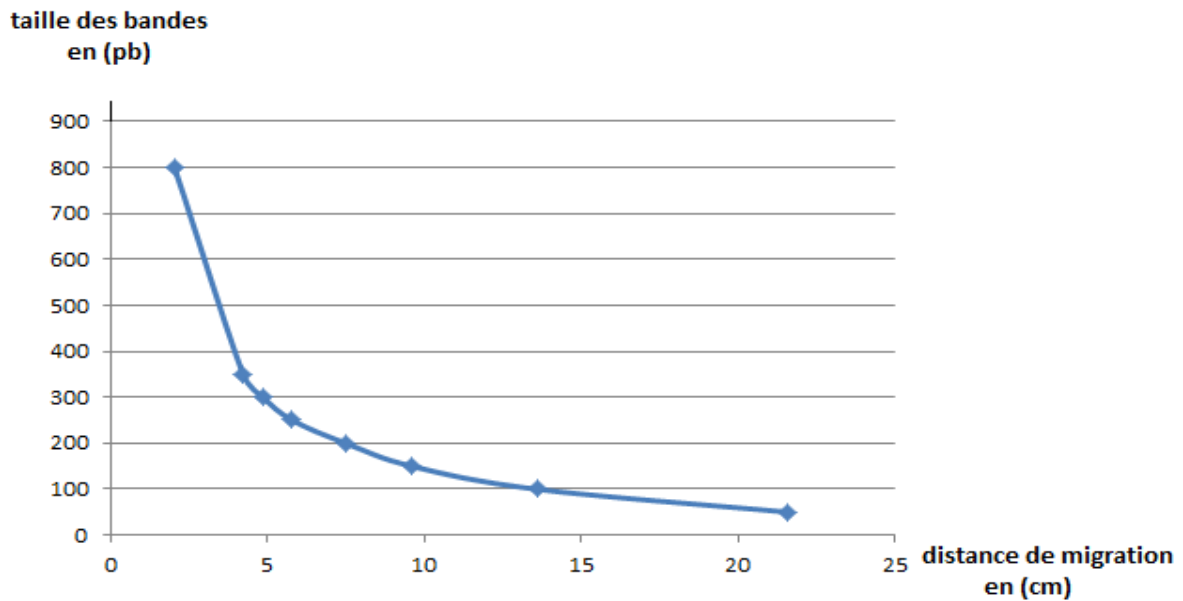


Figure 6 : Courbe qui montre la taille des bandes par rapport à la distance parcourue sur le gel d'acrylamide 6%

Pour estimer la taille des bandes, un marqueur de taille contenant des fragments d'ADN de poids moléculaire compris entre 2652 pb et 50 pb a été utilisé. Ce marqueur est présenté dans la figure suivante :

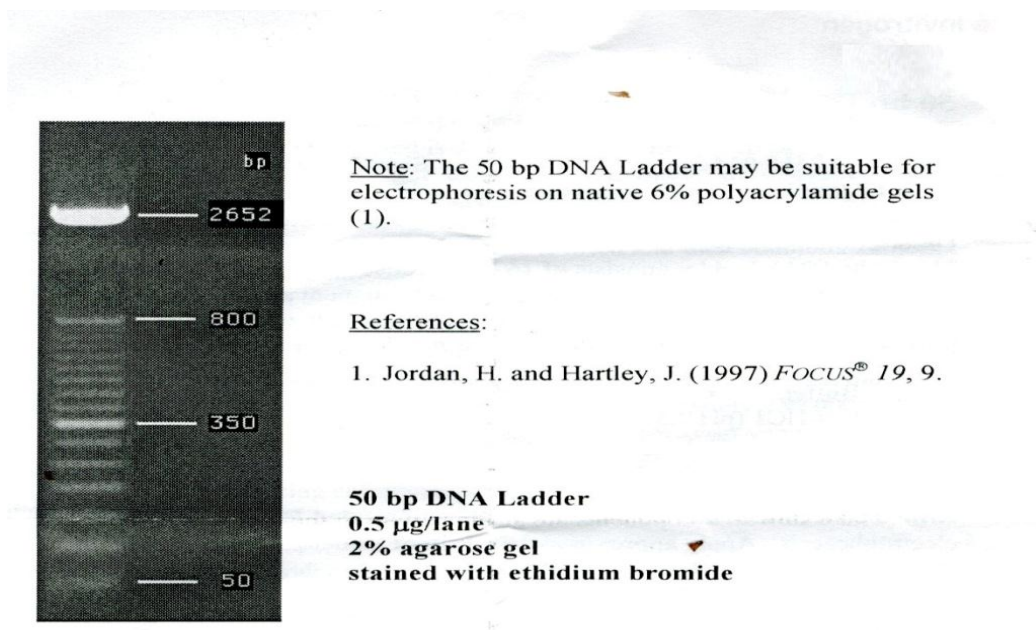


Figure 7 : Marqueur de taille 50 pb DNA ladder visualisé sur un gel d'agarose à 2%

Tableau 3 : nombre d'allèles coexistant pour chaque gène, leurs tailles et leur présence à chaque échantillon :

échantillons	GAPU 71 A			GAPU 71 B		
	Allèles			Allèles		
	210pb	215pb	220pb	254pb	275pb	245pb
Pm2	0	1	0	1	0	0
Picual	0	1	1	1	1	0
Arbiquine	0	1	0	1	0	0
Pm1	1	1	0	1	0	0
Gordal	1	1	0	1	0	1
Longudoc	0	1	0	1	0	0
Menara	0	1	0	1	0	0
Frontoio	0	1	1	1	1	0
Haouzia	0	1	0	1	0	0

0 => l'allèle est absent

1 => l'allèle est présent

Tableau 4 : locus utilisés qui montre leurs séquences, la taille et le nombre d'allèles coexistant:

locus	Séquence (5'-3')	Nombres d'allèles	Tailles d'allèles
GAPU71A	GATCATTTAAAATATTAGAGAGAGAGA TCCATCCATGCTGAACTT	3	210 - 220
GAPU71B	GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA ACAACAAATCCGTACGCTTG	3	245-275

Remarque :

Ce travail a été réalisé sur 9 échantillons. Chaque échantillon a été testé avec 15 amorces. Pour faciliter la présentation des résultats, seuls ceux obtenus avec deux amorces (GAPU 71 A et GAPU 71B) ont été présentés.

II. Discussion :

La figure 1 qui représente le profil électrophorétique sur gel d'agarose à 2% de l'ADN extrait à partir des 9 échantillons testés, montre des bandes bien visibles qui reflètent l'importance de la quantité extraite de l'ADN. Cette bonne qualité de l'ADN est confirmée par les résultats obtenus à partir du dosage spectrophotométrique (tableau 1).

Après l'amplification par PCR, et avant toute analyse effectuée sur gel d'acrylamide, un test préalable a été réalisé sur gel d'agarose.

Les résultats illustrés dans les figures 2 et 3 montrent que la majorité des bandes sont visibles ainsi que celle correspondant au marqueur de taille. L'amplification d'ADN par PCR s'est donc bien déroulée et la quantité d'ADN amplifié est suffisante pour réaliser les analyses ultérieures.

L'analyse sur gel d'acrylamide a été réalisée dans le but de déterminer la taille (qui sera sûrement plus précise que celle visualisée sur le gel d'agarose) et le nombre d'allèles qui coexistent pour chaque locus.

L'utilisation de 2 loci SSR dans la caractérisation moléculaire des variétés d'Olivier par marqueurs microsatellites a montré la présence de 6 allèles (figure 4 et 5), 3 pour chacun des loci. La taille des allèles varie de 210 pb à 275 pb pour les loci GAPU71A et GAPU71B.

Cette étude a permis la caractérisation moléculaire et la différenciation entre 9 individus (variétés d'olivier) qui représentent chacun une variété distincte montrant une diversité moléculaire. Cette distinction présente 2 grands groupes (figure 6):

Un groupe qui montre des variétés avec des origines différentes, tandis que les individus qui composent des sous-groupes proviennent probablement de même pool génétique. Ces derniers sont représentés par haouzia, menara, picholine marocaine 1 et 2 (4 variétés marocaine) et ont le même génotype. Par contre picual, gordale, Arbiquine, P.languedoc et frontoio ont des génotypes différents. Ceci montre la présence de 6 génotypes pour ces 9 variétés.

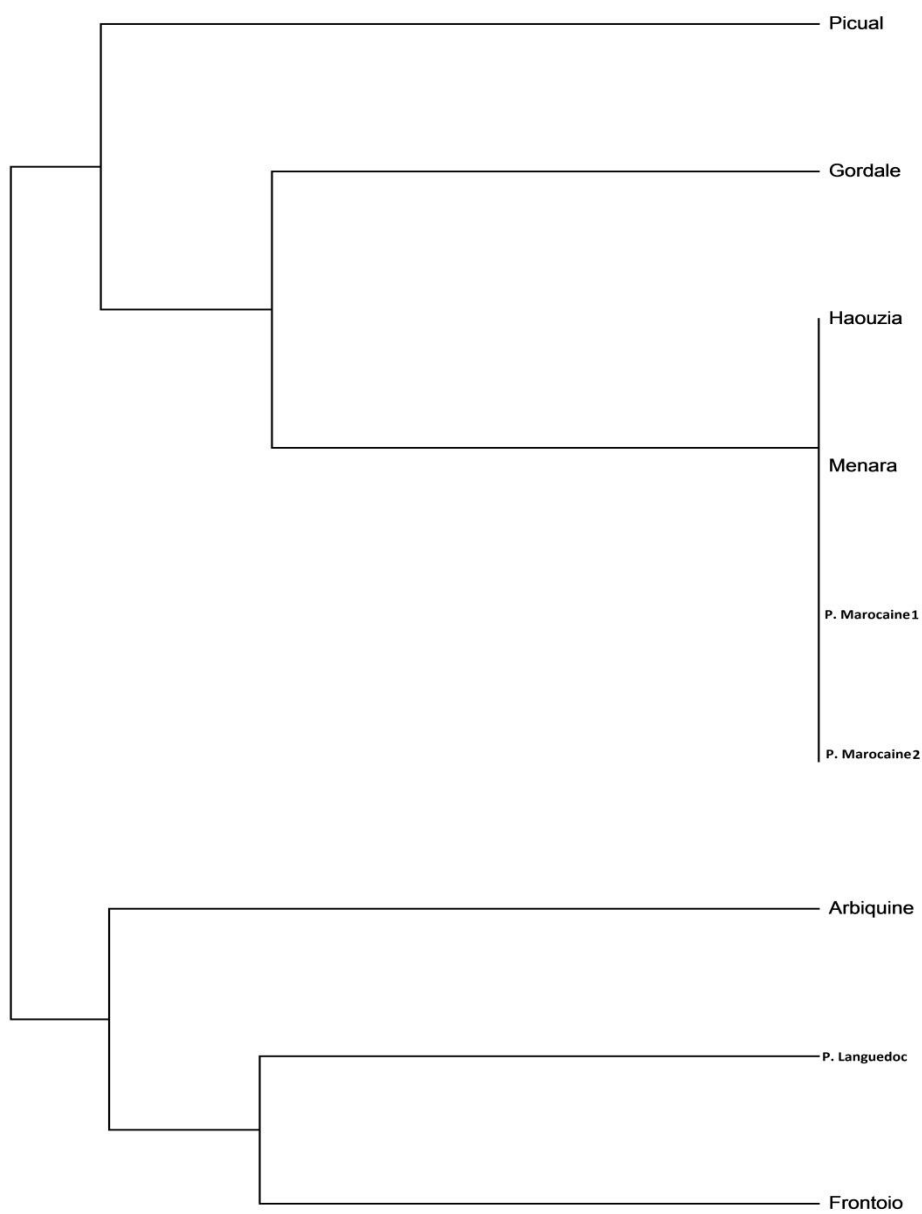


Figure 6 : Arbre phylogénétique des variétés d’olivier basé sur les distances de Jaccard et sur l’algorithme UPGMA.

Remarque : cet arbre n’est réalisé qu’avec les 2 loci SSR dont les résultats ont été présentés, mais grâce au 15 loci SSR utilisés au cours de ce travail.

Conclusion générale

L'olivier est parmi les principales espèces végétales les plus cultivées au Maroc. Son amélioration à travers les croisements crée un effet positif sur la production mondiale et une meilleure maîtrise des performances et des techniques de production.

Le Maroc est bien conscient de développement de la biotechnologie verte à l'échelle mondiale. Pour cette raison, il n'arrête pas d'évoluer dans ce domaine en créant des laboratoires de recherche, en s'intéressant à la formation des chercheurs et en suivant avec grand intérêt l'évolution des techniques permettant l'amélioration agronomique.

Les marqueurs moléculaires rendent possible l'étude de la structure génétique des cultivars d'olivier, en assurant une sélection du caractère désiré. L'avantage de découvrir de nouvelles variétés, réside en une productivité plus élevée et une qualité améliorée.

En effet, dans notre projet, l'utilisation des microsattellites comme marqueur génétique dans la caractérisation moléculaire des variétés d'Olivier, nous a permis d'identifier les ressemblances et les différences existant entre les différents échantillons étudiés et réaliser par la suite un arbre phylogénétique.

Références bibliographiques :

- Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétales, D.de Vienne, éd, 1998.
- Jamal Charafi., 2007. Diversité génétique de l'olivier au Maroc et cartographie génétique de la population hybride F1 « Picholine Marocaine * Picholine du Languedoc » : Basés pour l'amélioration végétale. Thèse doctorale.
- Jamal Charafi., 2011. Caractérisation pomologique et moléculaire pour l'identification des génotypes en collection N°3 du figuier au domaine expérimentale à l'INRA Meknès. Mémoire de titularisation.
- Fiche technique figuier, 2008 Edition INRA.
- Fiche technique olivier, Décembre 2006.Edition INRA.

Webographie :

<http://bitagro.imist.ma/spip.php?article54>

<http://www.inra.org.ma/meknes/def.asp?codelangue=23&po=2>

[http://fr.wikipedia.org/wiki/Amorce \(génétique\)](http://fr.wikipedia.org/wiki/Amorce_(g%C3%A9n%C3%A9tique))

[https://fr.wikipedia.org/wiki/Extraction d'ADN](https://fr.wikipedia.org/wiki/Extraction_d'ADN)

<http://www.lyo-san.ca/lyophilisation.html>