

Liste des Figures

	Page	
Figure 1	Quelques graines de légumineuses	3
Figure 2	Phylogénie de quelques Légumineuses	5
Figure 3	Production mondiale des légumineuses en 2010	6
Figure 4	Utilisation de la surface agriculture utile	6
Figure 5	Évolution du rendement & superficie des légumineuses au Maroc	8
Figure 6	Différentes parties de la fève <i>Vicia faba</i> L	11
Figure 7	Production en tonnes (2000-2011) de la fève au Maroc	14
Figure 8	Superficie en Ha de la fève (2001-2011) au Maroc	14
Figure 9	Rendement de la fève en Hg/Ha (2000-2011) au Maroc	14
Figure 10	Orbanche crénata	16
Figure 11	Maladie de tâche chocolat sur une feuille de la fève	16
Figure 12	Anthracnose de la fève	16
Figure 13	Rouille de la fève	16
Figure 14	Mildiou sur une feuille de la fève	16
Figure 15	Puceron noir de la fève	18
Figure 16	Bruche de la fève	18
Figure 17	Emplacement géographique de l'axe 1 de récolte (Fes-Taza)	31
Figure 18	Emplacement géographique de l'axe 2 de récolte (Fes-Taounate-Chefchaouen-Tetouan)	31
Figure 19	Mise en place du semis et germination des graines	32
Figure 20	Collecte des feuilles de <i>Vicia faba</i> L.	32
Figure 21	Étapes d'extraction de l'ADN à partir des feuilles de <i>Vicia faba</i> L,	34
Figure 22	Étapes de test de qualité	36
Figure 23	Thermocycleur utilisé dans la PCR	38
Figure 24	Analyse sur gel d'acrylamide natif 8%, montage, coloration BET et lecture sous UV.	40
Figure 25	Profils électrophorétiques de l'ADN génomique des échantillons étudiés sur gel d'agarose à 1.2%.	45
Figure 26	Profil d'amplification par l'amorce VFG 01 sur gel d'acrylamide à 8%.	47
Figure 27	Profil d'amplification par l'amorce VFG 19 sur gel d'acrylamide à 8%.	47
Figure 28	Profil d'amplification par l'amorce VFG 28 sur gel d'acrylamide à 8%.	49
Figure 29	Profil d'amplification par l'amorce VFG 55 sur gel d'acrylamide à 8%.	49
Figure 30	Profil d'amplification par l'amorce VFG 89 sur gel d'acrylamide à 8%.	50
Figure 31	Profil d'amplification/l'amorce GBSSR VF 52 sur gel d'acrylamide à 8%.	50
Figure 32	Profil d'amplification/l'amorce GBSSR VF115 sur gel d'acrylamide à 8%.	51
Figure 33	Taux de polymorphisme détectés pour chacun des loci SSR.	54
Figure 34	Indice de diversité génétique détectée pour chacun des loci SSR	54

Liste des Tableaux

		Page
Tableau 1	Production en sec des légumineuses alimentaires par espèces	7
Tableau 2	Caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés	22
Tableau 3	Effectifs des populations par Localité (région)	30
Tableau 4	Réactifs utilisés dans la PCR et leurs concentrations	37
Tableau 5	Marqueurs microsatellites testés	38
Tableau 6	Pourcentage des bandes polymorphes pour chaque amorce utilisée	46
Tableau 7	Fréquences alléliques pour chaque loci SSR	53
Tableau 8	Diversité génétique, PIC, taux des Hétérozygotes pour chaque amorce	55

Liste des abréviations

A	: Adénine
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
APS	: Amino Peroxo Disulfato
BA	: Bleu d'agarose
BET	: Bromure d'Ethidium
C	: Cytosine
CTAB	: Cetyl Trimethyl ammonium Bromide
cM	: centiMorgan
dATP	: désoxy Adénine tri-phosphate
dCTP	: désoxy Cytosine Tri-Phosphate
dGTP	: désoxy Guanine Tri-Phosphate
dNTP	: deoxyNucleoside Tri-Phosphate
dTTP	: désoxy Thymidine Tri-Phosphate
dNTP	: 2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic Acid
FAO	: Food and Agriculture Organisation
G	: Guanine
g	: gramme
Ha	: hectare
HCl	: Chlorure D'hydrogene
ICARDA	: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
INRA	: Institut National de la Recherche Agronomique
Kg	: kilogramme
L	: Litre
M	: Molaire
Mg Cl₂	: Chlorure de magnésium
Mg	: milligramme
min	: minute

MAPM	: Ministère de l'agriculture et de pêche maritime
ml	: millilitre
NaCl	: Sodium Chloride
NaOH	: Sodium Hydroxide
ng	: nanogramme
Pb	: paires de bases
pmol	: picomole
pH	: pouvoir hydrogène
PIC	: Polymorphic Information Content
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Qx	: quintaux (quintal = 100 kilogrammes)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat.
TEMED	: Tetra Methyl Ethylene Diamine
T	: Thymine
Taq	: Thermus aquaticus
TBE	: Tampon Tris-Borate-EDTA
Trs / min	: tours par minute
μ	: microlitre
μl	: microlitre.
UV	: Ultra Violet
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean
V	: Volte

Sommaire

<i>INTRODUCTION GENERALE</i>	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
<i>I. LES LEGUMINEUSES</i>	3
1. PRESENTATION GENERALE DES LEGUMINEUSES	3
2. CLASSIFICATION	4

3. IMPORTANCE DES LEGUMINEUSES	5
4. PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES LÉGUMINEUSES.....	8
II. LA FÈVE : <i>Vicia faba L.</i>	9
1. POSITION SYSTEMATIQUE	10
2. ORIGINE GEOGRAPHIQUE.	11
3. DESCRIPTION DE LA PLANTE	11
4. INTÉRÊTS DE LA FÈVE (<i>Vicia faba L</i>)	12
4.1 Intérêt alimentaire	12
4.2 Intérêt agronomique	12
4.3 Intérêt éco-toxicologique	13
5. IMPORTANCE DE LA FÈVE.....	13
6. CONTRAINTES DE LA CULTURE DE FEVE	13
6.1 Contraintes abiotiques	13
6.2 Les contraintes biotiques	15
III. ETUDE DES POPULATIONS LOCALES	19
VI. TECHNIQUES D'ANALYSE MOLÉCULAIRE	20
1. DEFINITION D'UN MARQUEUR MOLECULAIRE	20
2. PRINCIPAUX TYPES DE MARQUEURS MOLÉCULAIRES :	21
2.1. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism:	21
2.2 Les microsatellites: (Simple Sequence Repeat, SSR):	24
2.3 RAPD: Random-Amplified Polymorphic DNA:	24
2.4 AFLP: Amplification Fragment Length Polymorphism:	25
2.5 Techniques de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	26

MATERIEL ET METHODES

I. MATÉRIEL VÉGÉTAL	30
1. ECHANTILLONNAGE.....	30
2. MISE EN PLACE DU SEMIS	31
II. ANALYSE MOLECULAIRE	32
1. EXTRACTION DE L'ADN À PARTIR DES FEUILLES	32
2. TEST DE QUALITE DE L'ADN	35
2.1 Test de qualité de l'ADN & électrophorèse sur gel d'agarose.....	35
AMPLIFICATION DE L'ADN EXTRAIT PAR PCR	37
1. ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE NATIF A 8%.....	39
1.1 Utilisation	39
1.2 Composition	39
1.3 Préparation	39

1.4	Traitement des plaques et écoulement du gel	39
1.5	Montage de la cuve	41
1.6	Migration	41
1.7	Révélation	41
2.	REVELATION DES PROFILS ELECTROPHORETIQUES.....	41
3.	ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES	41
3.1.	Calcul des fréquences alléliques	42
3.2.	Calcul du Polymorphic information content (PIC)	42
3.3.	Calcul de l'indice de la diversité génétique (H)	42
3.4.	Calcul des distances génétiques	42
3.5.	Dendrogramme phylogénétique	43

RESULTATS ET DISCUSSION

I.	TEST DE QUALITE DE L'ADN EXTRAIT.....	44
II.	AMPLIFICATION DE L'ADN PAR SSR.....	44
1.	AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 01	46
2.	AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 19.....	46
3.	AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 28.....	48
4.	AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 55.....	48
5.	AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 89.....	48
6.	AMPLIFICATION PAR L'AMORCE GB-SSR VF 52	48
7.	AMPLIFICATION PAR L'AMORCE GB-SSR VF 115	48
III.	ANALYSE DES DONNEES.....	52
1.	FRÉQUENCES ALLÉLIQUES.....	52
2.	POLYMORPHIC INFORMATION CONTENT (PIC)	54
3.	DIVERSITE GENETIQUE (H).....	54
4.	DISTANCES GENETIQUES ET ARBRE PHYLOGENETIQUE.....	55
5.	DENDROGRAMME PHYLOGENIQUE UPGMA	56
	CONCLUSION GENERALE.....	60

INTRODUCTION

La diversité génétique est la base de l'amélioration des plantes. La connaissance de cette diversité a un impact significatif sur le progrès de la sélection des plantes cultivées. Donc chaque diminution ou dérèglement de cette diversité aura des répercussions sur les programmes d'amélioration pour l'adaptation aux stress biotiques, comme les maladies, et aux stress abiotiques, tels que la sécheresse ou la tolérance à la salinité.

Les légumineuses alimentaires sont considérées comme les plantes les plus cultivées par l'homme et depuis longtemps. Elles occupent une place importante, dans l'alimentation aussi bien humaine qu'animale. Elles jouent un rôle important dans le développement et l'économie nationale du monde entier (Khaldi *et al.*, 2002). Vu leurs adaptations faciles aux différents milieux, nous pouvons les rencontrer dans la plupart des régions du monde. Les légumineuses alimentaires jouent un grand rôle dans le système d'assolement grâce à leur propriété de fixation de l'azote atmosphérique, raison pour laquelle l'amélioration de la productivité de cette culture est un sujet d'actualité par la création de variétés plus productives et plus adaptées, parallèlement à l'amélioration des techniques de culture et de protection contre les maladies et ravageurs.

Vicia faba L., est une légumineuse ayant une importance capitale dans les systèmes de production en agriculture pluviale au Maroc. En fait, le Maroc est considéré comme un centre de diversité génétique de la fève, d'où la nécessité d'une conservation dans les banques de gène. La fève est très appréciée en tant que bon précédent cultural pour la céréaliculture, notamment, *via* les reliquats d'azote laissés (Rochester *et al.*, 2001 ; Diaz- Ambrona et Minguez, 2001 ; Eltun *et al.*, 2000 et Schulz *et al.*, 1999) ou à travers l'amélioration de la structure du sol (Rochester *et al.*, 2001). Assez riches en protéine (22-36%) (Bond *et al.* 1985), les graines de fève permettent un apport protéique assez important pour les humains et les animaux. Cependant, malgré ces différents avantages, cette culture ne suscite pas l'intérêt qu'elle mérite. Sa productivité moyenne est variable à cause de la variabilité des précipitations et de sa conduite technique traditionnelle. Cette conduite est caractérisée par l'usage de semences de mauvaise qualité, une faible lutte antiparasitaire et un faible apport des engrais (Daoui, 2007). L'impact négatif du faible recours à la fertilisation sur la productivité est accentué par la carence des sols en minéraux et en matière organique.

Par conséquent, il est nécessaire d'étudier la diversité génétique des populations locales de *Vicia faba* L., afin de mieux quantifier cette diversité au Maroc, et d'estimer les valeurs d'indices de diversité génétique présente chez ces populations locales. Ainsi, les bases de données concernant les populations locales collectées seront enrichies et serviront de critère de choix dans l'utilisation de ces populations locales par les améliorateurs.

Le présent travail "Caractérisation génétique des populations locales de *Vicia faba* L, vise l'étude et l'évaluation de la diversité génétique contenue dans 68 populations locales de

Vicia faba L (fève, féverole, févette) en utilisant la technique de marquage moléculaire par les SSR ou microsatellites.

Ce travail est renforcé en parallèle par une autre étude qui vise à la caractérisation morphologique et l'évaluation agronomique de ces populations locales. Ceci va permettre de constituer une base de données complète sur chacune des populations que ce soit au niveau biologie moléculaire et au niveau des différents paramètres morphologiques et agronomiques.

I. LES LEGUMINEUSES

1. PRESENTATION GENERALE DES LEGUMINEUSES

Une des plus importantes familles parmi les dicotylédones. Elle fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales. Elles comprennent des plantes herbacées, des arbres et des arbustes, à feuilles habituellement

composées, rarement simples. Beaucoup sont grimpantes et possèdent des feuilles ou des parties de feuilles modifiées en vrilles. Les fleurs, pentamères avec 10 étamines ou parfois plus, caractéristiques, ressemblent souvent à des papillons (Wathman, 1967).

Les légumineuses à graines (Figure 1) étaient parmi les premières espèces domestiquées dans le croissant fertile dont on retrouve encore certains restes archéologiques vieux d'environ 12 000 ans pour les plus anciens. Les écrits issus de la Rome antique rapportent de nombreux témoignages de l'utilisation des légumineuses à graines dans les rations alimentaires, qu'il s'agisse des fèves, de la lentille ou du pois (Duc *et al.*, 2010).

Leur importance alimentaire est due au fait qu'elles contiennent beaucoup de protéines (deux à trois fois plus que la plupart des céréales) et de calories. De plus, elles contiennent une grande quantité de minéraux essentiels comme le calcium et le fer (FAOSTAT, 2013).

Les plantes de la famille des fabacées (légumineuses) suivent en importance celles de la famille des Poacées, non seulement pour leur contribution à l'alimentation humaine, mais aussi pour leur impact sur l'amélioration des pratiques agricoles dans toutes les régions du monde. En plus, elles sont des plantes annuelles dont les gousses produisent une à douze graines de formes et de couleurs variables. Elles sont utilisées à la fois en alimentation humaine et en alimentation animale.



Figure 1: Quelques graines de légumineuses.

Le groupe des légumineuses à graines comporte un nombre assez important d'espèces. Citons notamment : la fève et féverole; le pois; le haricot; la lentille; le soja.

Chacune de ces espèces fait l'objet de mode de culture et d'utilisation assez varié : soit une culture légumière de plein champ ou maraîchère ou encore une utilisation en sec à maturité totale des fruits et des graines ou bien utilisation en vert au début de la formation des

fruits et des graines, et à l'alimentation humaine, directement ou après transformation et enfin à l'alimentation animale, directement ou après ensilage (Moule, 1972).

Les légumineuses sont consommées essentiellement dans les pays en développement, qui absorbent environ 90 pour cent de la production mondiale de légumineuses destinées à l'alimentation humaine. Dans de nombreux pays pauvres, les légumineuses apportent environ 10 pour cent des protéines et 5 pour cent de l'énergie dont la population a besoin (FAOSTAT, 2013).

2. CLASSIFICATION

La famille des Légumineuses (= Fabacées terme utilisé dans les systèmes de classification avant 1960). Cette famille possède 674 genres et plus de 18 000 espèces, la plaçant en seconde position derrière les Poacées, en terme de diversité (Polhill *et al*, 1981). Sur la base de leurs caractéristiques florales (Figure 2), les botanistes s'entendent à regrouper cette famille en trois sous-familles (Gepts *et al*, 2005).

- **Sous-famille des *Mimosoideae***, comprend environ 2 500 espèces regroupées dans quelques 40 genres. Les espèces sont représentées principalement par des arbres et des arbustes distribués dans les régions tropicales et subtropicales sur tous les continents.
- **Sous famille des *Caesalpinioideae***, considérée comme la plus primitive, regroupe environ 4 200 espèces dans 135 genres et sont représentées par des arbres, arbustes et herbacées vivaces distribuées des régions tropicales aux régions tempérées.
- **Sous-famille *Papilionoideae***, d'une évolution plus récente, est la plus importante du point de vue alimentaire. Elle comprend quelques 9 500 regroupées dans environ 375 genres qui sont représentés majoritairement par des espèces herbacées vivaces et annuelles.

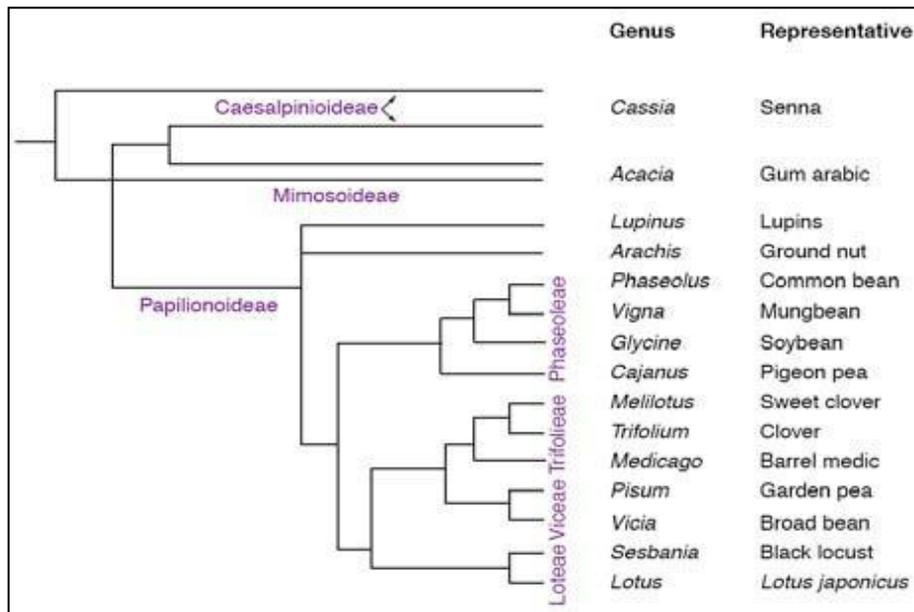


Figure 2 : Phylogénie de quelques Légumineuses (Udvardi *et al.*, 2005).

C'est parmi cette famille des papilionoideae que nous retrouvons toutes les espèces importantes utilisées pour l'alimentation humaine et animale, ainsi que pour le pâturage les plus importantes utilisées par les agriculteurs : le soja (*Glycine max*, $2n = 4x = 40$), le haricot (*Phaseolus vulgaris*, $2n = 2x = 22$), le pois (*Pisum sativum*, $2n = 2x = 14$), la luzerne (*Medicago sativa*, $2n = 4x = 32$), l'arachide (*Arachis hypogaea*, $2n = 4x = 40$), le pois chiche (*Cicer arietinum*, $2n = 2x = 16$), et la fève (*Vicia faba*, $2n = 2x = 12$).

3. IMPORTANCE DES LEGUMINEUSES

En terme de superficie et de productions, les légumineuses constituent la seconde famille de plante cultivées après les céréales (Gepts *et al.*, 2005). En 2004, plus de 300 millions de tonnes de légumineuses à graines ont été produites sur une superficie de 190 millions d'hectares, soit 13% des terres cultivées (FAOSTAT, 2013).

Les légumineuses sont cultivées partout dans le monde, mais plus particulièrement en Inde, en Chine, en Egypte, en Australie, au Brésil et au Nigéria (Figure 3). Collectivement, ces pays ont fourni 51 % des 51,5 Mt de légumineuses produites en 2001. Ces denrées sont consommées dans tous les continents, mais la demande à l'importation provient principalement des pays du Moyen-Orient, de l'Afrique du Nord, de l'Amérique latine et du sous-continent indien.

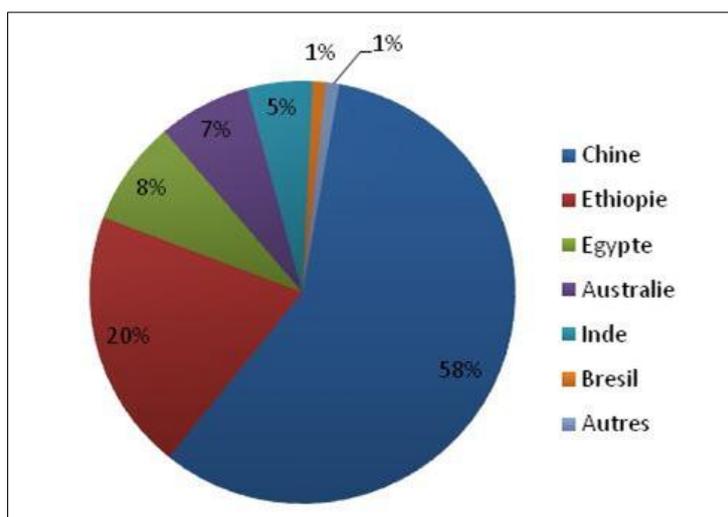


Figure 3 : Production mondiale des légumineuses en 2010 (FAO, 2012).

Au Maroc, Les légumineuses alimentaires sont surtout localisées dans les régions à pluviométrie favorable. Elles couvrent 4 % de la surface agricole utile (SAU) (Figure 4), soit en moyenne 445 000 Ha. Elles viennent ainsi en deuxième position après les céréales. La fève est la légumineuse la plus importante, occupant 40% de la superficie totale réservée aux légumineuses. Le pois chiche vient en seconde position avec 18.9%. Le pois sec occupe quant à lui la troisième place avec 13.9%. Et en enfin la lentille vient en dernière position avec seulement 10.7% de la superficie emblavée en légumineuses alimentaires. (Elalaoui, 2000).

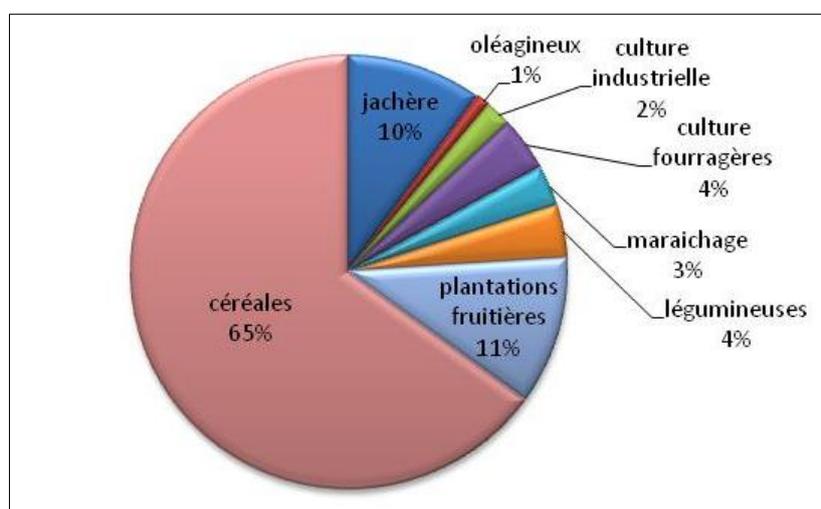


Figure 4: Utilisation de la surface agriculture utile (MAPM, 2012).

La production moyenne annuelle de 2,4 millions quintaux, la filière des légumineuses a un rendement moyen de 6,2 quintaux/ha, ce qui est en deçà des potentialités du Maroc en la matière.

Le Maroc importe quelque 350 000 quintaux de légumineuses, notamment les lentilles et les fèves et exporte 70 000 quintaux. Cette filière qui emploie 10 millions de journées de travail/an se trouve face à des défis de taille liés notamment à l'ouverture des frontières à la suite des accords de libre-échange avec l'Union européenne, les États-Unis d'Amérique et les pays arabes, et à la non-compétitivité des prix des légumineuses du Maroc sur le marché mondial (MAPM, 2011).

Les emblavements en légumineuses alimentaires au titre de la campagne agricole 2008-2009 ont atteint près de 377.000 ha, soit seulement 1% d'accroissement par rapport à la campagne précédente et +2,7% par rapport à la période 2004-2008. La superficie de la fève qui est la culture la plus dominante a représenté près de 48% de la superficie totale cultivée. Les légumineuses alimentaires jouent un rôle important en tant que rotation culturale avec les céréales. Certains agriculteurs lui préfèrent la jachère (MAPM 2012).

La production totale des légumineuses alimentaires en sec est estimée à 2 753 000 quintaux (Tableau 1), marquant un accroissement de 40% par rapport à la campagne agricole 2007-2008. Cette augmentation a concerné toutes les espèces : Lentilles (+147%), Petits pois (+77%), Fève (+40%) et Pois chiches (+37%). Le rendement moyen des légumineuses alimentaires en sec durant la campagne agricole 2008-2009 s'est établi à 7,3 q/ha. Il a marqué une hausse de 39% par rapport à celui de 2007-2008 (5,25 q/ha) (MAPM, 2012).

Tableau 1 : Production en sec des légumineuses alimentaires par espèces.

Légumineuses	2008 – 2009	2007 - 2008	Variation en %
Fève	1 530	1 090	40%
Petits Pois	276	156	77%
Lentille	232	94	147%
Pois Chiche	521	381	37%
Autres	193	239	-
Total	2 753	1 960	40

Le rendement des légumineuses alimentaires en sec (Figure 5), durant la campagne agricole 2007-2008, est estimé à 5,25 q/ha. Il a augmenté de 39% par rapport à celui de la campagne précédente mais il a baissé de 13,5 % par rapport au rendement moyen des cinq

campagnes agricoles 2002- 2003/2006-2007. La hausse a concerné principalement le rendement de la culture de Fève qui s'est accru de 53% (MAPM, 2012).

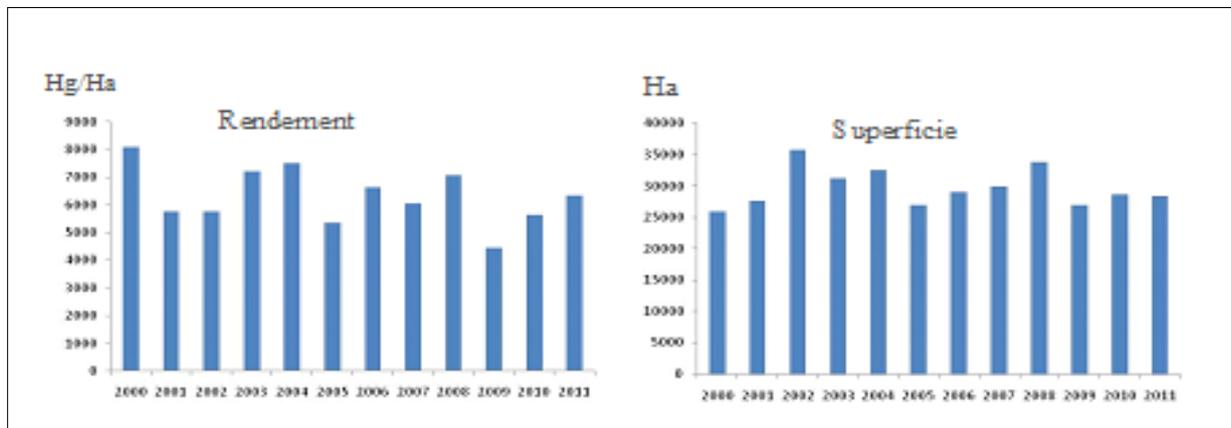


Figure 5: Évolution du rendement & superficie des légumineuses au Maroc (FAOSTAT 2013).

4. PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES LÉGUMINEUSES

Les légumineuses alimentaires sont considérées comme les plantes à graines les plus cultivées par l'Homme et depuis longtemps occupent une place importante, dans l'alimentation humaine. Elles jouent un rôle important dans le développement des économies, des pays du monde entier (Khaldi et *al.*, 2002). Vu leurs adaptations faciles aux différents milieux, nous pouvons les rencontrer dans la plupart des régions du monde.

L'importance de la famille des légumineuses réside dans leur aptitude à fixer l'azote grâce à une symbiose avec des microorganismes du sol qui sont des bactéries de la famille des rhizobiacées (Wathman, 1967). Par ces nodules, la plante hôte (la légumineuse) offre un micro habitat exceptionnellement favorable à la bactérie tout en lui procurant des substrats carbonés provenant de la photosynthèse, (Lezrak, 2008). Ainsi ces plantes sont capables de s'adapter à des sols très pauvres, et très dégradés. (Wathman, 1967).

Outre ces bénéfices qu'elles entraînent pour l'alimentation et l'environnement, les légumineuses peuvent être utiles dans diverses industries pharmaceutique, alimentaires et

chimiques (plastique biodégradable, huile, bio-diésel, colorants, gomme, textile, papier...) (Graham et Vance, 2003).

Bien qu'importantes sur les plans économique, écologique et industriel, les légumineuses cultivées présentent des caractéristiques biologiques qui retardent leur amélioration génétique. Elles possèdent en général un grand génome, sont souvent polyploïdes et leur transformation par *Agrobacterium* est délicate voire impossible.

II. LA FÈVE : *VICIA FABIA* L.

La fève, à l'image des autres légumineuses alimentaires (pois chiche, lentille...) est une plante très riche en protéines et constitue un aliment nutritif très important. Cette culture est très ancienne et largement pratiquée et à travers le monde couvrant environ 2,3 millions d'Ha.

La fève est une espèce d'automne qui peut être cultivée comme légume vert ou à l'état sec. Elle est sensible au manque d'eau et à son excès, et exige une alimentation hydrique régulière supérieure à 350 mm/an (Alaoui, 2009).

La culture de la fève est peu exigeante en terme de qualité de sol, cependant, elle aime les sols frais, profonds, peu acides, et non compactés. Elle est rustique au froid. (Alaoui, 2009).

La fève (*Vicia faba* L.), en tant que légumineuse, a une importance capitale dans les systèmes de production en agriculture pluviale au Maroc. Elle est très appréciée en tant que bon précédent cultural pour la céréaliculture, notamment, via les restes d'azote laissés (Rochester et *al.*, 2001; Diaz- Ambrona et Minguez, 2001; Eltun et *al.*, 2000; Schultz et *al.*, 1999) ou à travers l'amélioration de la structure du sol (Rochester et *al.*, 2001). Assez riches en protéine (22-36%) (Bond et *al.*, 1985), les graines de fève permettent un apport protéique assez important pour les humains et les animaux.

1. POSITION SYSTEMATIQUE

Décrite par Linné en 1753, la fève *Vicia faba* L. est une plante dicotylédone herbacée originaire d'Asie ou du Moyen-Orient. Et d'après Dajoz (2000), la fève est classée comme suit:

Embranchement	:	SPERMATOPHYTES
Sous-embranchement	:	ANGIOSPERMES
Classe	:	Dicotylédone
Série	:	Calciflores
Ordre	:	Rosales
Famille	:	Fabacées (Légumineuses)
Sous famille	:	Papilionadeae
Genre	:	<i>Vicia</i>
Espèce	:	<i>faba</i>

Les fèves et féveroles sont des Légumineuses (*Leguminosae*) appartenant au genre *Vicia faba* à $2n = 12$ chromosomes.

Cette espèce présente une assez grande variabilité morphologique (poids, forme, coloration du grain, hauteur des plantes) (Moule, 1972).

Selon la taille et la forme de la graine, et celles de la gousse, on distingue trois sous-espèces :

- ***Vicia faba major***: les grains sont de grosses tailles larges et plates, les gousses sont très longues (nombre d'ovules de 8 à 13) aplaties et souvent recourbées en sabre. La fève est destinée à la consommation humaine ;
- ***Vicia faba minor*** : Avec des grains ovoïdes, réguliers et lisses et des gousses cylindrique et courtes (nombre d'ovules de 2 à 3). La féverole est utilisée pour principalement l'alimentation du bétail ;
- ***Vicia faba equina*** : les gousses de la févette sont plus aplatie longue avec un nombre d'ovules de 3 à 4. La taille des grains est moyenne.

2. ORIGINE GEOGRAPHIQUE

L'espèce *Vicia faba* serait originaire du *sud-ouest de l'Asie* (sud de la mer Caspienne), du moins pour les féveroles. Les fèves auraient une origine africaine.

L'homme aurait très tôt utilisé *V. faba* pour sa nourriture : l'espèce était déjà largement répandue au néolithique en Espagne, Italie, Hongrie et France (Moule, 1972).

3. DESCRIPTION DE LA PLANTE

La fève est une plante herbacée annuelle présentant une tige simple, dressée, creuse et de section quadrangulaire, pouvant se dresser à plus d'un mètre de hauteur.

Les feuilles, alternes de couleur vert ou grisâtre, pennées, composées, constituées par plusieurs folioles larges et ovales (Figure 6) (Chaux et Floury, 1994).

Selon Maoui *et al.*, (1990), la fève possède des inflorescences en grappes de 4 à 5 fleurs en moyenne. Les fleurs sont de couleur blanche ou faiblement violacée (Chaux et Floury, 1994).

Les fruits sont des gousses pendantes noircissant à la maturité. (Laumonier, 1979). Les graines sont charnues, vertes et tendres à l'état immature. À complète maturité, elles développent un tégument épais et coriace de couleur brun-rouge, à blanc verdâtre et prend une forme aplatie à couleur presque circulaire (Chaux et Floury, 1994).



Figure 6: Différentes parties de la fève *Vicia faba* L. (Wilhelm.1885).

4. INTERETS DE LA FEVE (*VICIA FABIA* L.)

4.1 Intérêt alimentaire

La production de la fève est utilisée pour la consommation humaine, la consommation animale et l'exportation. La quantité de fève consommée est d'environ 2,4 kg par personne et

par an. Elle dépasse le niveau de consommation des autres légumineuses alimentaires (Fatemi, 1996).

Selon Gordon, (2004) et Daoui, (2007), cette légumineuse a une teneur en protéine élevée et est une excellente source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines (B9 et C) et de minéraux (en particulière le potassium, le phosphore, le calcium, le magnésium, le cuivre, le fer et le zinc).

- **Riche en protéines végétales** (8g/150g), et **en fibres** (10g/150g), la fève participe à une alimentation saine et équilibrée. Ce qui permet de couvrir un tiers des besoins journaliers recommandés.
- **Riche en vitamines et minéraux.** Une portion de 150g de fèves contribue en 34 % en vitamine B5, 28 % en vitamine B9 et 2 % en vitamine C des besoins journalières recommandés. Concernant les minéraux, la même portion de fèves de fèves couvrent 15% en fer pour l'homme et 8% pour la femme, 6 à 8% en magnésium et 4% en calcium en besoins journalières recommandés. Les apports vitaminiques et minéraux sont encore plus élevés quand la fève est consommée à l'état sec. (<http://sante.planet.fr/dictionnaire-de-la-nutrition-feve.738.380.html>).

4.2 Intérêt agronomique

Vicia faba, comme toutes les légumineuses alimentaire, contribue à l'enrichissement du sol en éléments fertilisants et spécialement l'azote, dont l'incidence est positive sur les performances des cultures qui les suivent, notamment le blé (Khaldi et *al.*, 2002 ; Racheff et *al.* 2005).

Ainsi, la fève améliore la teneur du sol en azote, avec un apport annuel de 20 à 40 kg /ha ; Elle améliore aussi sa structure par son système racinaire puissant et dense. Les résidus des récoltes enrichissent le sol en matière organique.

4.3 Intérêt éco-toxicologique

La fève est très sensible à la pollution du sol. Ce qui en fait un modèle végétal très utilisé en éco-toxicologie dans un grand nombre d'études. Du fait que son caryotype est simple, elle est utilisée dans un grand nombre d'études de mutagenèse pour le test des anomalies chromosomiques (De Marco et *al.*, 1995; Kanaya et *al.*, 1994; Sang et Li 2004). De plus, la grande quantité d'ADN contenue dans son noyau (Bennett 1976), la rend très

sensible aux molécules génotoxiques (Ferrara et *al.*, 2004). *Vicia faba* est en outre aussi employée pour étudier les réponses des marqueurs du stress oxydant (Radetski et *al.*, 2004).

Les auteurs sont donc partagés en ce qui concerne le choix du modèle biologique, mais la plupart reconnaissent que *Vicia faba* est une plante très intéressante dans les études de génotoxicité.

5. IMPORTANCE DE LA FEVE

La production mondiale de la fève ne cesse pas d'augmenter au cours des dernières années. La Chine est le premier producteur au monde avec 1 550 000 tonnes en 2011, et le Maroc vient en septième position avec 133 512 tonnes en 2011 (Figure 7).

Classée comme la principale légumineuse alimentaire au Maroc, la fève occupe 47 % de la superficie emblavée en légumineuses alimentaires. Elle est suivie du pois chiche (22 %), de la lentille (9 %) et du pois (10 %) (Figure : 9) (MAPM, 2012).

La production de la fève est concentrée dans La zone centre-nord à savoir Taounate, Taza et Fès (Fatemi, 1996). La superficie cultivée de la fève au Maroc a augmenté de 137 000 Ha en 2000 à 165 248 Ha en 2011 (Figure 8). Le rendement annuel moyen de la fève entre l'année 2000 et 2011 est de 5300 Hg/Ha (Figure 9).

6. CONTRAINTES DE LA CULTURE DE LA FEVE

6.1 Contraintes abiotiques

- **Sécheresse terminale** ; La sécheresse constitue le stress abiotique le plus important pour *Vicia faba* L, (El Bouhamdi et Sadiki, 2002). Cette contrainte constitue un facteur limitant de la production dans les hauts plateaux et les plaines côtières, car la culture de la fève exige beaucoup d'eau (Gerard, 1990). Les rendements de la fève deviennent plus importants, en milieux irrigués. (Green, et *al.*, 1986).

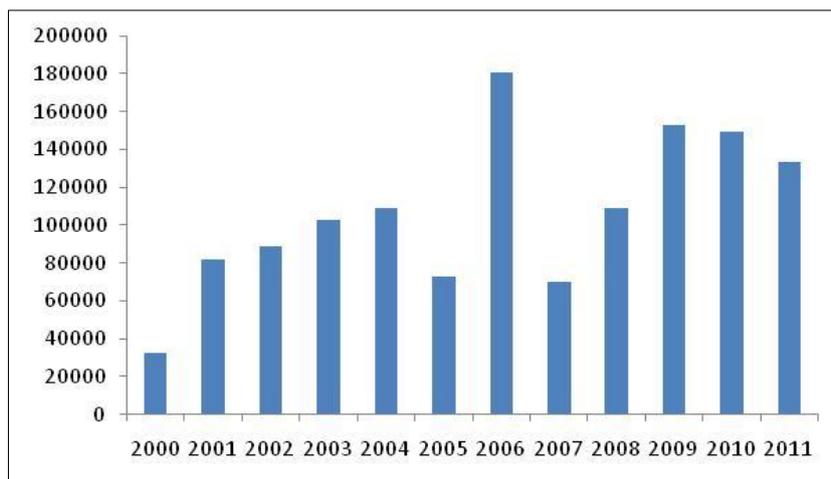


Figure 7 : Production en tonnes (2000-2011) de la fève au Maroc (FAOSTAT, 2013).

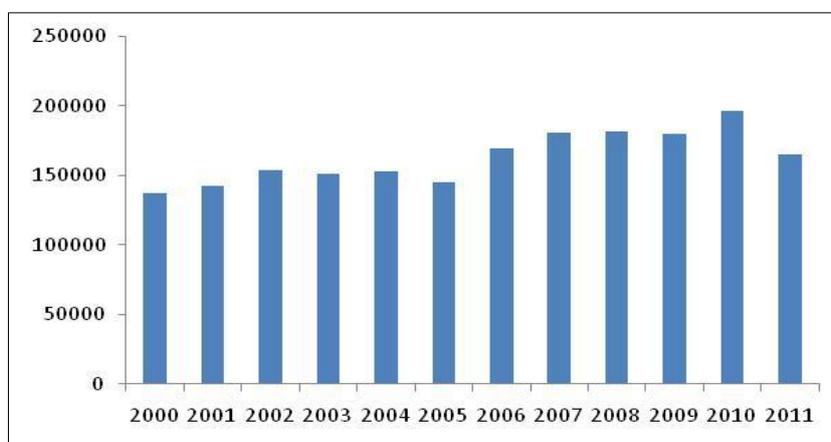


Figure 8 : Superficie en Ha de la fève (2001-2011) au Maroc (FAOSTAT, 2013).

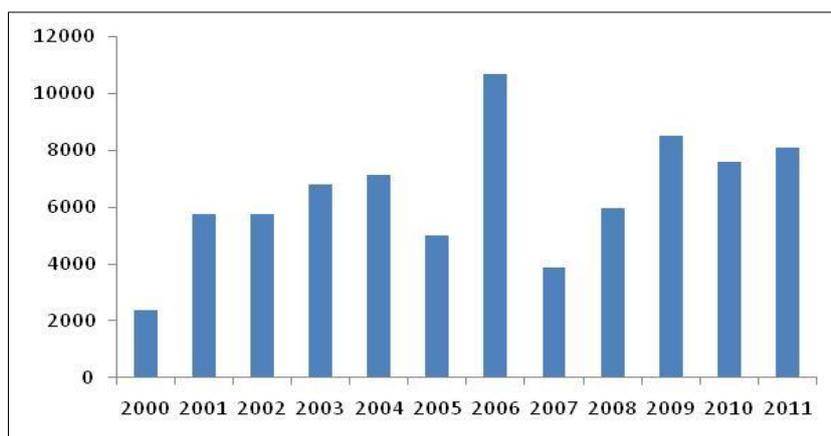


Figure 9 : Rendement de la fève en Hg/Ha (2000-2011) au Maroc (FAOSTAT, 2013).

- **Froid hivernal et s gelés printanières** : Les basses températures provoquent la coulure des fleurs et la mortalité des plantes qui montrent une formation de cristaux de glace dans les espaces intercellulaires des tissus. Par conséquent, les cellules végétales se déshydratent. (Link et *al.*, 2010).
En plus, le volume élevé des cristaux entraîne la destruction des parois des cellules.
- **Chaleur** : Les fortes chaleurs (au dessus de 22-25°C de moyenne journalière) causent un arrêt de croissance, une chlorose (décoloration due à un manque de chlorophylle) et peuvent même conduire au flétrissement de la culture. De même, la chaleur peut nuire la qualité des graines, les rendant précocement ameres et farineuses (Chaux et Floury, 1994).
- **Salinité** : C'est une contrainte qui concerne notamment les zones sahariennes, ou les fèves sont irrigués avec des eaux assez chargées en sodium. L'effet du sel sur les plantes et sur les propriétés physiques et chimiques du sol réduit la productivité (Maatougui, 1996).

6.2 Contraintes biotiques

Aucune variété n'a une résistance à toutes les maladies, ces maladies peuvent diminuer la production, donc de plus en plus il faut développer une bonne compréhension des principales maladies et leurs stratégies de gestion (Harry, 2003).

- **Orobanche** : C'est une plante sans chlorophylle (Figure 10), qui dépend entièrement de son hôte, pour réaliser son cycle biologique (Kharrat, 2002). Elle occasionne des pertes considérables, et pouvant entraîner la destruction totale de la fève (Kharrat, 2002, Abbes et *al* 2010). Cette plante parasite a des fleurs gamopétales et appartient à la famille des orobanchacées, (Dorette, 2005).
- **Maladie des tâches chocolat** : cette maladie cryptogamique cause des tâches de couleur rouge-brun sur les feuilles, tiges et gousses (Figure 11). Ces tâches ou lésions peuvent causer une défoliation de la plante et même sa mort. Cette maladie est causée par *Botrytis fabae*. Rhaim, 2002 a rapporté qu'une attaque sévère par celle-ci peut engendrer des pertes de rendement, allant jusqu'à 100% lorsque les conditions favorables se prolongent.



Figure 10 : *Orbanche crénata*



Figure 11 : Maladie de tâche chocolat.



Figure 12 : Anthracnose de la fève.



Figure 13 : Rouille de la fève



Figure 14 : Mildiou sur une feuille de la fève.

- **Anthracnose** : est une maladie cryptogamique due à *Ascochyta fabae* (Figure 12). Elle se manifeste par des taches rondes, brun chocolat. Elles se développent sur les feuilles, les tiges, les gousses et le tégument des graines. Elles peuvent se développer jusqu'à ce que des parties de la plante entièrement noircies meurent (Planquaert et Girard, 1987). Elle provoque aussi des pertes en quantité et en qualité sur la fève (Kharrat, 2002).

- **Rouille** : Cette maladie cryptogamique, causée par *Uromyces fabae*, se manifeste par des tâches brunes à rougeâtres sur les feuilles (Figure 13), causant un dessèchement et la chute des feuilles. (Chaux et Floury, 1994).

- **Mildiou** : Agents responsables sont *Peronospora fabae* et *Peronospora viciae*. Il provoque une décoloration jaunâtre à la face supérieure des feuilles liée à la présence d'un feutrage blanc-gris à la face inférieure (Figure 14). Les attaques précoces de mildiou entraînent le nanisme des plantes, ainsi qu'une déformation des tiges et des pétioles (Chaux et Floury, 1994).

- **Principaux ravageurs**
 - a. **Puceron noir (*Aphis faba*)** : c'est un insecte piqueur suceur. Il vit en colonies compactes, à l'extrémité des plantes de la fève (Figure 15). Il provoque l'enroulement, le dessèchement et la chute des feuilles (Hamadache, 2003). De plus, cet insecte peut transmettre plus de 30 virus pathogènes (Blackman et Eastop, 2007). Et principalement les virus de la jaunisse nécrosante.

 - b. **Bruche de la fève (*Bruchus rufimanus*)** : c'est un insecte qui peut engendrer des dégâts importants et compromettre la récolte durant le stockage. À partir de février, lorsque les températures dépassent 15 °C, cet insecte sort de la graine pour s'accoupler et les œufs sont déposés sur les gousses (Boughdad, 1996). A l'éclosion, la larve pénètre dans une graine et s'y nourrit. La bruche peut rester longtemps dans la graine (Figure 16). Les symptômes sont l'apparition de trous sur les graines. Les traitements chimiques au champ consistent en des applications d'insecticides. Il est recommandé d'utiliser des semences saines (indemnes de bruches).



Figure 15 : Puceron noir de la fève.



Figure 16 : Bruche de la fève.

c. Nématodes : *Ditylenchus dipsaci* est un nématode qui limite le développement de la culture de la fève. Il provoque le gonflement et la déformation de la tige, avec la décoloration des différentes parties de la plante. Les nématodes peuvent rester sous le manteau de la graine en développement, tuent celle-ci ou réduisent au moins sa vigueur et causent la souillure (Abbad et Bachikh, 2001).

d. Virus : La fève est soumise à divers attaques par des virus différents, ce qui cause des dommages très importants pour les cultures de fève. Les virus se transmettent essentiellement par les insectes.

Ainsi six virus ont été identifiés pour la fève :

- Virus de la jaunisse nécrosante : principale menace virale pour la fève.
- Virus de la marbure (BBMV ou broad bean mottle virus)

- Virus du flétrissement de la fève BBWV. Ces deux virus causent de sévères infections mais leurs attaques restent localisées.
- Virus de la mosaïque de la luzerne (AMV ou alfalfa mosaic virus) ;
- Virus du brunissement précoce du pois PEBV. Ces deux virus sont rarement rencontrés (Maria, 1992).

III. ETUDE DES POPULATIONS LOCALES

Une variété locale est une variété locale d'espèces végétales ou animales domestique qui s'est développé en grande partie par des processus naturels, Par l'adaptation à l'environnement naturel et culturel dans lequel elle vit. Il diffère d'une race officielle qui a été élevé sélectivement délibérément de se conformer à une norme particulière formelle : pure breed (Harlan, 1975).

Les variétés locales sont généralement plus génétiquement et physiquement diversifiées que les races officielles (Harlan, J. R., 1975).

Le terme variété locale est utilisé aussi en botanique (et par extension dans l'agriculture, l'horticulture, l'anthropologie, etc) a été fournie en 1975 par Harlan : « Les populations locales sont souvent très variables en apparence, mais elles sont chacune identifiable morphologiquement et avoir une certaine intégrité génétique. Les agriculteurs leur donnent généralement des noms locaux. Une forme locale possède des propriétés ou des caractéristiques particulières. Certains sont considérés comme précoces et d'autres plus tard. Chacune de ces variétés locales a une valeur d'adaptation à certains types de sol et en fonction de la classification des sols paysannes traditionnelles, par exemple, lourd ou léger, chaud ou froid, sec ou humide, fort ou faible et aussi classées en fonction de l'utilisation. Tous les composants de la population locale sont adaptés aux conditions climatiques locales, les pratiques culturelles et les maladies et les ravageurs. » (Harlan, 1975). Le terme a été plus récemment et brièvement caractérisé par Zeven en 1998.

«Une race locale autochtone est une variété avec une grande capacité à tolérer le stress biotique et abiotique, résultant en une stabilité à haut rendement et un niveau de rendement intermédiaire dans un système agricole à faible entrée » (Zeven, 1998).

La grande stabilité de rendement et le niveau de rendement modéré sont les principales caractéristiques d'une race locale comme déjà mentionné par Mansholt (1909) et Schindler

(1918). Ce dernier a ajouté qu'une variété locale ne devrait pas être comparée à un cultivar, parce que les deux sont des entités différentes.

VI. TECHNIQUES D'ANALYSES MOLÉCULAIRES

En biologie végétale, le terme marqueur s'applique à plusieurs concepts, parfois très différents. Un marqueur morphologique par exemple est un caractère physique (couleur, forme, longueur...), généralement dominant, souvent influencé par le milieu, et pouvant interférer avec d'autres caractères (Plomion, 2003).

Par contre, un marqueur génétique, moléculaire ou biochimique est toujours synonyme de locus marqueur; le locus marqueur est un locus (séquence d'acide nucléique, ou expression de cette séquence) polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte et/ou sur les génotypes voisins (De Vienne *et al.*, 1998; Santoni *et al.* 2000).

1. DEFINITION D'UN MARQUEUR MOLECULAIRE

Par définition, un marqueur génétique est un caractère mesurable à hérédité mendélienne (Swynghedauw 2000). On distingue les marqueurs biochimiques, issus de l'expression des gènes (y compris les produits de métabolisme secondaire : isozymes, protéines, terpènes...), et les marqueurs moléculaires, qui désignent directement des séquences d'acide nucléique. Les marqueurs moléculaires représentent la dernière génération de marqueurs utilisés dans les études de diversité génétique. Ils reposent sur la mise en évidence du polymorphisme de la taille de fragments d'ADN. Les qualités attendues pour un marqueur moléculaire sont principalement un niveau de polymorphisme adéquat et une abondance élevée (Hartl 1988, Vekemans et Jacquemart 1997).

Un marqueur génétique « idéal » doit être :

- a.** Polymorphe : la « matière première » du généticien est la variabilité.
- b.** Multi-allélique.
- c.** Co-dominant : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes ; il peut donc être distingué de chacun des homozygotes parentaux.
- d.** Non épistasique : son génotype peut être « lu » à partir de son phénotype quel que 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.

- e. Neutre : une substitution des allèles au locus marqueur n'a pas d'autres effets phénotypiques que ceux qui permettent de déterminer son génotype; un marqueur neutre révèle, directement, les modifications génétiques qu'elles se traduisent ou non par une modification phénotypique.
- f. Insensible au milieu : Le génotype peut être déduit du phénotype indépendamment du milieu. (De Vienne et *al.*, 1998) (Ferreira et Grattapaglia 1998),
- g. Facilement observable et sans ambiguïté,
- h. Reproductible d'une expérience à une autre (Ferreira et Grattapaglia 1998),

Les marqueurs morphologiques répondent mal à ces critères. Peu polymorphes, en général dominants, ils interfèrent souvent avec d'autres caractères, et peuvent être influencés par le milieu, (De Vienne et *al.*, 1998).

2. PRINCIPAUX TYPES DE MARQUEURS MOLECULAIRES

Il existe de nombreuses techniques de marquage moléculaire (Tableau 2) parmi lesquelles on trouve celles basées sur l'hybridation moléculaire (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction), et des techniques basées sur la PCR ((les microsatellites ou SSR : Simple Sequence Repeat), (RAPD : Random-Amplified Polymorphic : ADN polymorphes amplifiés aléatoirement), (AFLP : Amplification Fragment Length Polymorphism : Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés)).

2.1. RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism:

Le polymorphisme de longueur de fragment de restriction est basé sur le principe de l'hybridation moléculaire. Il est généré suite à l'hydrolyse par une endonucléase de restriction. Le polymorphisme est révélé après hybridation d'une sonde marquée sur les fragments séparés par électrophorèse sur gel et transférés sur membrane par technique de Southern.

Tableau 2 : Caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.

Type de marqueur	Caractéristique de la méthode	Procédure de	Fiabilité	Coût	Référence
------------------	-------------------------------	--------------	-----------	------	-----------

laboratoire

RFLP	Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction, et détection par l'ADNc ou Les sondes d'ADN (via Southern Blot)	Complexe et laborieuse	Elevée	Elevé	Beckmann & Soller (1986); Kochert (1994); Tanksley <i>et al.</i> (1989)
RAPD	Amplification aléatoire via des amorces arbitraires de 10pb	Simple	Faible	Faible	Welsh & McClelland (1990); Williams <i>et al.</i> (1990)
ISSR	Amorces conçues pour des séquences simples répétées avec des 'ancres'	Simple	Moyenne	Faible	Blair <i>et al.</i> (1998)
SSR	Amorces conçues pour des séquences bordant les séquences simples répétées	Simple	Elevée	Faible	McCouch <i>et al.</i> (1997); Powell <i>et al.</i> (1996)
AFLP	Digestion d'ADN génomique suivie d'une ligation par des adaptateurs et PCR	Complexe et laborieuse	Elevée	Elevé	Vos <i>et al.</i> (1995)

La technique RFLP repose sur la digestion d'un ADN cible par une ou plusieurs enzymes de restriction spécifiques des sites de restriction portés par l'ADN. Après électrophorèse, les fragments séparés sont hybridés avec un ADN sonde, provenant souvent de banques de ADN génomique ou complémentaire. Cette sonde peut provenir d'une espèce proche de l'espèce à étudier.

Par exemple, un événement simple comme la substitution d'un seul nucléotide peut distinguer entre deux génotypes. Quand une substitution de base élimine un site de restriction, il modifie la longueur de fragment d'ADN qui peut être détectée par cette méthode. Elle

méthode représente donc un marqueur discret qui est directement représentative du génotype d'un individu. (Melake, 2000).

Si deux individus diffèrent par un ou plusieurs sites ou, même, par la distance séparant deux sites identiques, il se crée une différence dans la longueur des fragments générés par l'enzyme de restriction. Les milliers de fragments obtenus après digestion enzymatique sont révélés par le bromure d'éthidium (BET).

Cette technique est robuste et facilement transférable entre les laboratoires, mais elle a aussi des limites. La première limite est la quantité d'ADN requise (50m-200 microgrammes d'ADN par individu) pour générer une empreinte génétique de l'ensemble du génome. L'extraction d'ADN à grande échelle est fastidieuse et laborieuse. (Najimi et al., 2003).

Le principe de base de cette méthode consiste :

- 1- Extraction de l'ADN;
- 2- Digestion de l'ADN au moyen d'enzymes de restriction (endonucléases);
- 3- Séparation (selon la taille) et visualisation des fragments ainsi obtenus par électrophorèse;
- 4- Transfert et hybridation des fragments séparés avec des sondes marquées (*southern blot*).

En revanche il existe des techniques de marquage moléculaire basées sur la PCR (polymerase chaine reaction) et qui ne nécessitent que de petites quantités d'ADN génomique brut à partir de chaque échantillon. Les résultats peuvent être obtenus en peu de temps. Le matériel de laboratoire nécessaire n'est pas cher. Ces techniques ne sont pas techniquement difficiles. Ces techniques basées sur la détection de l'ADN marqueurs, sont beaucoup plus rapides et plus simples que la technique RFLP.

2.2. Les microsatellites: (Simple Sequence Repeat, SSR)

Les microsatellites sont de courts segments d'ADN composés de séquences répétées en tandem d'un motif de 2 à 6 paires de bases (suivant les définitions) que l'on peut amplifier par PCR. Le polymorphisme détecté est un polymorphisme de longueur: Un allèle donné correspondra le plus souvent à un nombre de répétition (en théorie) déduit de la taille d'amplification (en pratique) (Arnaud, 2006).

Autrement dit les microsatellites ou SSR (Morgante et Olivieri, 1993). Ils sont constitués de séquences de di-, tri- ou tétra-nucléotides répétés en tandem. Ces éléments sont uniformément répartis en plusieurs exemplaires sur l'ensemble du génome d'une espèce et présentent un taux de polymorphisme élevé. Ce polymorphisme repose sur la variation du nombre d'unités de répétition constituant le microsatellite. L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel d'acrylamide. Si les SSR constituent de bons marqueurs moléculaires (reproductibles, Co-dominants et facilement utilisables), leur caractérisation initiale est toutefois assez lourde. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage de ces éléments répétés.

Ces répétitions sont très polymorphes, même parmi les cultivars étroitement liés, en raison de mutations qui provoquent des variations dans le nombre d'unités répétitives. Contrairement aux autres techniques de marqueurs basés sur la PCR, les microsatellites sont hérités de façon co-dominant. Cela permet de discriminer entre homozygote et l'état hétérozygote, et augmente l'efficacité de la cartographie génétique et les études de génétique des populations. (Melake, 2000).

2.3. RAPD: Random-Amplified Polymorphic DNA

La technique RAPD est l'une des méthodes les plus utiles pour identifier le polymorphisme génétique d'organismes vivants (Hartl, 1988 ; Williams *et al.*, 1990) ont décrit un nouveau marqueur génétique inspiré de la PCR permettant l'amplification au hasard de segments d'ADN de l'ordre du nano-gramme en utilisant une seule amorce de petite taille (généralement 10 nucléotides).

Ils ont appelé cette technique RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, polymorphisme d'ADN par amplification aléatoire) ou AP-PCR (Arbitrary Primed PCR) développée simultanément par Welsh et McClelland (1990). La technique RAPD est une méthode simple qui consiste en une amplification enzymatique de l'ADN à l'aide d'amorces de petite taille choisie aléatoirement. Elle demande peu d'investissement technique et permet d'obtenir rapidement des fragments variés d'ADN génomique fournissant beaucoup de polymorphisme (Lynch et Milligan, 1994; Hadrys *et al.*, 1992). Les produits d'amplification sont généralement séparés sur gel d'agarose et révélés avec du bromure d'éthidium (Bardakci, 2001).

Les conditions de préparation des échantillons et des cycles de PCR doivent être optimisées pour chaque application afin d'assurer la reproductibilité des résultats (Tagu & Moussard, 2003). Le polymorphisme, de la présence ou l'absence des fragments, est donc étudié chez les différents individus de la population. Chez la plupart des organismes, il est courant d'identifier un grand nombre de RAPDs qui peuvent servir de marqueurs génétiques dans différentes sortes d'études génétiques (Hartl, 1988). Dans une réaction RAPD, l'unique espèce d'amorces est liée à l'ADN génomique en deux sites différents et opposés sur les brins de l'ADN matrice.

L'amplification donne beaucoup de fragments d'ADN d'une taille allant de moins de 100 pb à plus de 2 kb. Ces fragments sont anonymes en ce sens que leurs origines génomiques ne sont pas connues. Les différences dans le fragment modèle amplifié à partir de chaque échantillon d'ADN génomique sont généralement attribuées à une mutation à des sites de liaison d'amorces. (Melake, 2000).

2.4. AFLP: Amplification Fragment Length Polymorphism

Cette technique partage certaines caractéristiques avec les deux autres techniques qui sont la RFLP et la RAPD. Le polymorphisme de longueur des fragments d'amplification signifie l'amplification d'ADN génomique par PCR après digestion avec une (ou deux) enzymes de restriction et ligation d'un adaptateur d'environ 20 paires de bases. Les amorces sont constituées de l'adaptateur plus 3 bases aléatoires en 3' (Vos et *al.*, 1995; De Vienne et *al.*, 1998).

AFLP combine la spécificité de l'analyse de restriction avec l'amplification PCR. La variation de la séquence détectée est la même que celle détectée par analyse RFLP, mais le nombre de polymorphismes détectés par cette analyse est plus élevé (Melake, 2000).

Cette méthode est conçue pour amplifier le produit d'ADN digéré par les enzymes de restriction (Vos et *al.*, 1995). Habituellement, deux enzymes de restriction, un coupeur rare et un coupeur fréquent, sont employées en association pour digérer l'ADN génomique. Les fragments d'ADN produits ainsi sont ligaturés avec des adaptateurs possédant des séquences bi caténares (Ribaut et *al.*, 2001).

Les produits amplifiés sont alors révélés par électrophorèse sur gel de poly-acrylamide. En général, de 75 à 150 fragments sont amplifiés avec chaque combinaison d'amorces, et que chaque fragment correspond à un site unique, la proportion du génome dosé avec chaque combinaison d'amorces est beaucoup plus élevée que toute autre méthode d'analyse de l'ADN (Melake, 2000).

Les marqueurs moléculaires se différencient par leur niveau de fiabilité, du coût et de la complexité de la procédure de laboratoire. Le Tableau 3 présente les caractéristiques des marqueurs d'ADN les plus utilisés.

2.5. Techniques de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

*** Principe et définition**

La Polymerase Chain Reaction (PCR) est une technique permettant d'amplifier *in vitro* des séquences d'ADN par répétition de réactions d'élongation en présence d'amorces nucléotiques spécifiques et d'une ADN polymérase (Tagu et Moussard, 2003). Cette technique, créée par Saiki et *al.* (1985), est devenue la base de nombreux marqueurs moléculaires. Son principe est relativement simple, basé sur une amplification enzymatique de l'ADN (White et *al.* 1989; Vekemans et Jacquemart, 1997, Claros et Quesada, 2000).

La technique PCR utilise les éléments de base de la duplication naturelle de l'ADN, mais en réalisant seulement la duplication et l'amplification de courts fragments de la molécule d'ADN, dans une simple solution qui permet l'amplification.

Le processus démarre avec une augmentation de température généralement entre 90 et 95°C pour dénaturer ou séparer les deux brins d'ADN. Puis la température est ramenée approximativement entre 35 et 70°C, afin que les amorces trouvent les emplacements cibles. Une fois l'hybridation réalisée, la copie par la *Taq* polymérase commence. La température est ensuite remontée pour entamer un nouveau cycle, lequel sera répété un certain nombre de fois selon les nécessités de l'étude et la technique à employer. On obtient finalement un produit spécifique amplifié, lequel sera révélé par électrophorèse sur gel (Vekemans et Jacquemart, 1997, De Vienne 1998, McPherson et Moller, 2000).

* **Réalisation de la PCR**

La PCR permet d'amplifier une séquence spécifique d'ADN dans un mélange réactionnel approprié (Master Mix). Ce mélange contient :

- **l'enzyme Taq polymérase** : c'est une polymérase thermostable, extraite d'une bactérie (*Thermus aquaticus*) des sources chaudes (80-90°C). Elle permet la synthèse des nouveaux brins d'ADN lors de l'amplification.
- **les nucléotides triphosphates** : ce mélange contient les différentes bases A, T, G, C sous la forme ATP, TTP, CTP, GTP.
- **les ions magnésium** : ils servent de stabilisateurs pour les nucléotides et activent l'enzyme. Ne pas mettre de $MgCl_2$ augmente l'astringence de la réaction
- **les amorces (primers)** : Pour parvenir à amplifier sélectivement des séquences nucléotidiques à partir d'un extrait d'ADN par PCR, il est indispensable de disposer d'au moins une paire d'oligonucléotides. Ces oligonucléotides, qui vont servir d'amorces pour la réplication, sont synthétisés par voie chimique et doivent montrer la meilleure complémentarité possible avec les deux extrémités de la séquence d'intérêt que l'on souhaite amplifier.

* **But de la 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 génomique que de l'ADN complémentaire obtenu par RT-PCR à partir d'un extrait d'ARN messagers (ARN poly-A), ou encore de l'ADN mitochondrial.

* **Étapes de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température recommencés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes échantillons et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100°C par effet Peltier ou bien effet thermoélectrique). L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes (Le pennec & Beninger, 1991).

- * **La dénaturation (94°C) :** La première période s'effectue à une température de 94°C, dite température de dénaturation. À cette température, l'ADN matriciel, qui sert de matrice au cours de la réplication, est dénaturé: les liaisons hydrogène ne peuvent pas se maintenir à une température supérieure à 80°C et les ADN double-brin se dénaturent en ADN simple-brin (ADN monocaténares).
- * **L'hybridation (40 – 70°C) :** La deuxième période s'effectue à une température généralement comprise entre 40 et 70°C, dite température d'hybridation des amorces. La diminution de la température permet aux liaisons hydrogène de se reformer et donc aux brins complémentaires de s'hybrider. Les amorces, courtes séquences monocaténares complémentaires de régions qui bordent l'ADN à amplifier, s'hybrident plus facilement que les longs brins d'ADN matriciel. Plus la température d'hybridation est élevée, plus l'hybridation est sélective, plus elle est spécifique.
- * **L'élongation (72°C) :** La troisième période s'effectue à une température de 72°C, dite température d'élongation. À 72°C, la Taq polymérase se lie aux ADN monocaténares amorcés et catalyse la réplication en utilisant les désoxyribonucléosides triphosphates présents dans le mélange réactionnel. Les régions de l'ADN matriciel en aval des amorces sont ainsi sélectivement synthétisées.

Au cycle suivant, les fragments synthétisés au cycle précédent servent à leur tour de matrice et au bout de quelques cycles, l'espèce prédominante correspond à la séquence d'ADN comprise entre les régions où les amorces s'hybrident. Il faut compter 20 à 40 cycles pour synthétiser une quantité analysable d'ADN (environ 0,1 microgramme). Chaque cycle va théoriquement doubler la quantité d'ADN présente au cours du cycle précédent.

Il est recommandé de rajouter un cycle final d'élongation à 72°C, notamment lorsque la séquence d'intérêt est de grande taille (supérieure à 1 kilobase), à raison de 2 minutes par kilobase.

* **Limites de la PCR**

La séquence nucléotidique du fragment à analyser doit être connue au niveau des régions d'amorçages. Si celles-ci sont inconnues, il est possible de contourner le problème en clonant le fragment dans un vecteur tel qu'un plasmide ou bactériophage. La séquence connue du vecteur sera utilisée pour choisir les amorces.

La taille maximale du fragment est de quelques kilobases. Si celle-ci est exagérée, nous assisterons à des phénomènes perturbateurs tels que des interruptions prématurées dues à des formations de structures secondaires, des rapprochements des fragments entre eux (Le Penneec & Beninger, 1991).

Les contaminations sont très vite envahissantes. Il est donc conseillé d'utiliser une pièce pour la préparation des réactifs et une autre indépendante de la première pour effectuer la PCR elle-même.

L'amplification n'est pas de 2^n comme le sous-entend la théorie mais dans les environs de 1.6^n à 1.85^n .

I. MATÉRIEL VÉGÉTAL

1. ECHANTILLONNAGE

Le matériel végétal utilisé dans cette étude est constitué de 68 populations locales de *Vicia faba* L. (Tableau 3) réparties comme suit : 42 fèves, 19 féveroles et 7 févettes (Annexe 1). Ces accessions sont exclusivement des populations locales collectées dans le Nord marocain en suivant deux axes principaux de récolte :

Le premier est Fès-Taza (Figure 17). Le second axe est Fès-Taounate-Chefchaouen-Tétouan (Figure 18). Les coordonnées géographiques ainsi que les localités et les origines sont présentés dans l'annexe 2. En plus de ces 68 populations locales, nous avons pris, comme témoins huit autres échantillons de *Vicia faba* L., dont 2 fèves, 1 féverole et 5 févettes (Annexe 1).

Tableau 3 : Effectifs des populations par localité (région).

Localité	Effectif
Ain Aicha	1
Ain Dfali	1
Ain Gdih	1
Après Bab Merzouka	1
Chefchaouen	3
El Bsabsa	4
El Hamra	2
Inconnue	5
Jorf El Malha	6
Kariat Ba Mohamed	5
Ouezzane	14
Oulad Ayad	1
Rhouazi	1
Sebt El Oudaya	16
Souk El Had	4
Taounate	1
Taza	2

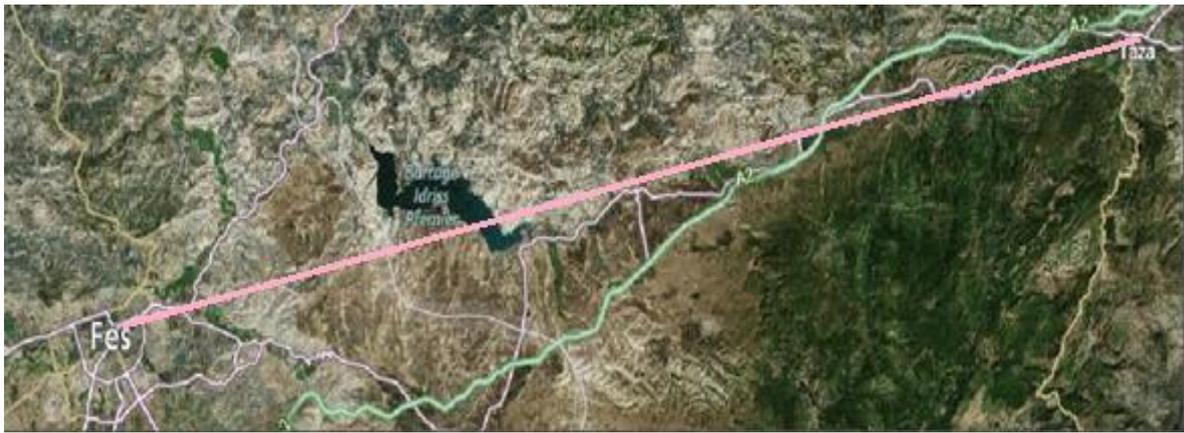


Figure 17: Emplacement géographique de l'axe 1 de récolte (Fès-Taza).

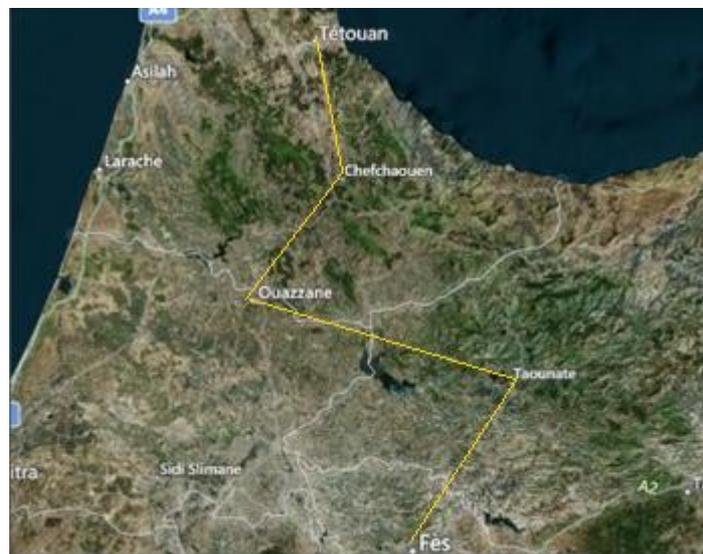


Figure 18 : Emplacement géographique de l'axe 2 de récolte (Fès-Taounate-Chefchaouen-Tetouan).

2. MISE EN PLACE DU SEMIS

Dix graines de chaque population sont semées dans des pots moyens (Figure 19). En effectuant des trous d'environ 3 à 4 cm de profondeur et à raison d'une seule graine par trou. Les pots sont disposés dans une serre et sous conditions contrôlées (température 28°C, photopériode : 12 heures).

Lorsque les plantes atteignent le stade de trois feuilles, ces dernières sont prélevées comme le montre la Figure 20 et mis directement dans la glace afin d'éviter un problème de phénols qui rend l'ADN sombre au cours de l'extraction.



Figure 19 : Mise en place du semis et germination des graines.



Figure 20 : Collecte des feuilles de *Vicia faba* L.

II. ANALYSE MOLECULAIRE

1. EXTRACTION DE L'ADN À PARTIR DES FEUILLES

La quantité et la qualité de l'ADN utilisable pour l'analyse, dépendent largement des techniques employées pour la collecte et la préservation du matériel végétal avant l'extraction. Ceci est particulièrement important pour les espèces, comme *Vicia faba*, produisant de grandes quantités de métabolites secondaires (polyphénols, terpènes, résines ou polysaccharides) qui souvent empêchent une bonne extraction de l'ADN.

L'extraction de l'ADN est réalisée par la technique de Céthyl Bromure de Trimethyl Ammonium (CTAB 2X) (Saghai-Marroof et *al.*, 1984), modifié par (Udupa et *al.*, 1999) dont les étapes (Figure 21) sont indiquées comme suivant :

- Sous la hotte, 100 à 120 mg de feuilles sont broyées (Figure 21A), dans un mortier préchauffé à 65°C et auxquelles sont ajoutées, tout en continuant à écraser, deux fois 750µL du tampon d'extraction CTAB 2X (Figure 21B), (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB et 0.2% β Mercapto-éthano l) ; (Annexe 3) préalablement chauffé à 65°C. La solution de CTAB chauffée permet la lyse membranaire, l'inactivation de l'ADNase et la dénaturation des protéines.
- L'extrait est légèrement mélangé, puis incubé dans un bain marie avec à 65°C pendant 45 min à 60 mn, avec agitation toute les 15 à 20 minutes (Figure 21C).
- Après incubation, 500 µL du mélange chloroforme/alcool isoamylique (24: 1) sont ajoutés à l'extrait (Figure 21D), et agités vigoureusement pendant 5 mn. Le chloroforme solubilise les pigments chlorophylliens, les polysaccharides et les protéines dénaturées.
- L'extrait, est ensuite, centrifugé à 13000 trs/mn, à température ambiante (Figure 21E), pendant 15 mn. Cette étape permet de séparer les acides nucléiques du chloroforme et des débris cellulaires.
- 1mL du surnageant est récupéré dans de nouveaux tubes de 2 ml, puis l'ADN est précipité avec 666 µl d'isopropanol (Figure 21F) en remuant doucement jusqu'à l'homogénéisation de la solution avec l'isopropanol et la formation des filaments d'ADN (Figure 21G). ensuite, une incubation à température ambiante, pendant 30 mn est réalisée. l'ADN se précipite à cette étape.
- Le culot d'ADN est, ensuite, récupéré par centrifugation à 4°C à 13000 trs/mn pendant 10 mn. Puis lavé avec 1 mL d'éthanol à 70%. Sous la hotte, le culot est séché de toutes gouttes d'éthanol (Figure 21J), Ensuite, le culot est dissout dans 100 µL d'eau distillée stérile et stocké à 4°C pendant une nuit.
- Après cette incubation à 4°C, le mélange est centrifugé pendant 5 mn à 13000 trs/mn afin de faire sédimenter toute impureté restante dans le tube. Par la suite, la solution d'ADN est récupérée dans de nouveaux tubes de 1.5 ml. Cette solution va

être utilisée comme stock d'ADN. Des dilutions sont réalisées selon les résultats du test qualité de l'ADN.

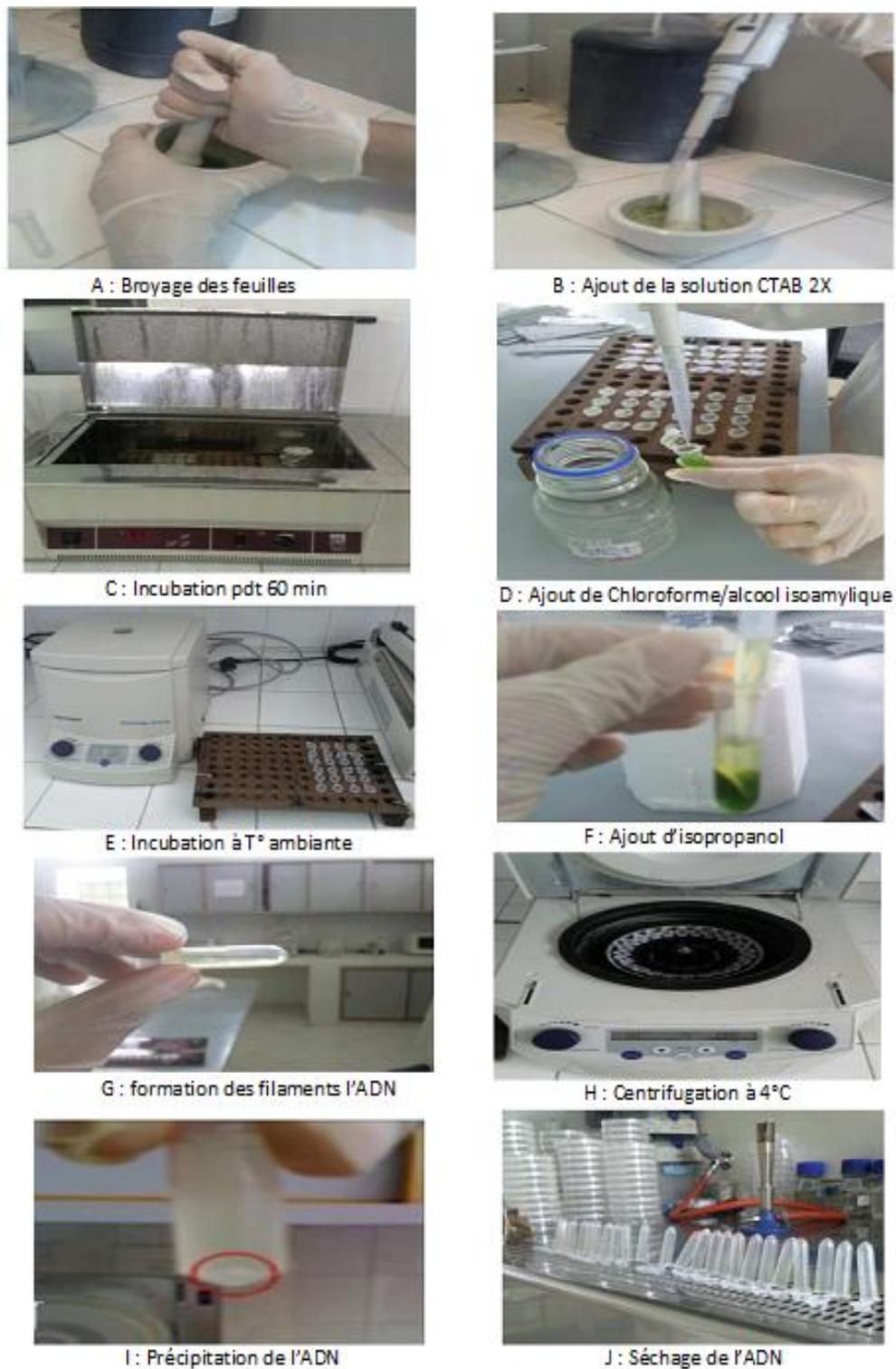


Figure 21: Etapes d'extraction de l'ADN des feuilles, suivant la technique CTAB 2X (Udupa *et al.*, 1999).

2. TEST DE QUALITE DE L'ADN & ELECTROPHORESE SUR GEL D'AGAROSE

Le test de qualité est une étape importante dans l'analyse d'ADN, car il permet de mettre en évidence la présence ou l'absence d'ADN et en même temps sa qualité. Cette dernière est déterminée par l'estimation de sa concentration en comparant l'intensité de la bande de l'ADN avec les bandes du marqueur de taille leader Lambda DNA/EcoRI + HindIII (Annexe 4). Ce test est réalisé sur gel d'agarose 1.2% et les bandes sont visualisées par un système d'analyse de gel après coloration avec le bromure d'éthidium BET.

Après avoir pesé la poudre d'agarose, on mélange dans le 1X TBE à raison de 1.2 g pour 100 mL. Ce mélange est fondu au four à micro-ondes, en surveillant pour éviter le bouillage et en l'agitant de temps en temps pour homogénéiser.

Après solubilisation totale, le mélange est refroidi dans un bassin rempli d'eau froid et sous agitation jusqu'à l'atteinte d'environ 60°C (par le thermomètre). L'agitation dans l'eau froide permet le refroidissement homogène de la solution du gel et permet aussi d'éviter la solidification du gel qui se trouve au niveau de la paroi.

On fixe les joints et les peignes dans la cuve (du type Scie-Plas) et on place le tout dans le support. Les peignes ont pour fonction de former les puits. Il faut absolument régler le niveau support du gel pour qu'il soit parfaitement horizontal. Ensuite, on coule le gel doucement en veillant à ce qu'il entoure toutes les dents des peignes. Après solidification, les peignes et les joints sont enlevés et le gel est placé dans l'appareil, puis immergé dans le tampon de migration TBE 1X.

Le gel d'agarose à 1,2% est préparé, et dans chaque puit on dépose:

- 4 µL d'eau distillée stérile ;
- 3 µL de bleu d'agarose ;
- 3 µL d'ADN.

Après le dépôt des échantillons (Figure 22E), la migration (Figure 22F) se fait en présence du tampon TBE 1X (Annexe 5). Le générateur est réglé à 70 V. Après 15 mn, le voltage est augmenté à 90 V, la migration dure de 60 à 75 mn. Après migration, la coloration des bandes d'ADN se fait en mettant le gel dans une solution de bromure d'éthidium (Figure 22G), (Annexe 6) pendant 20 min ensuite, on rince ce gel dans de l'eau distillée, pendant 20 mn avant de visualiser les bandes sous les rayons ultraviolets UV (Figure 22H). Des photos

sont prises à l'aide d'un système d'analyse d'images spécifique pour les gels (BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR⁺).

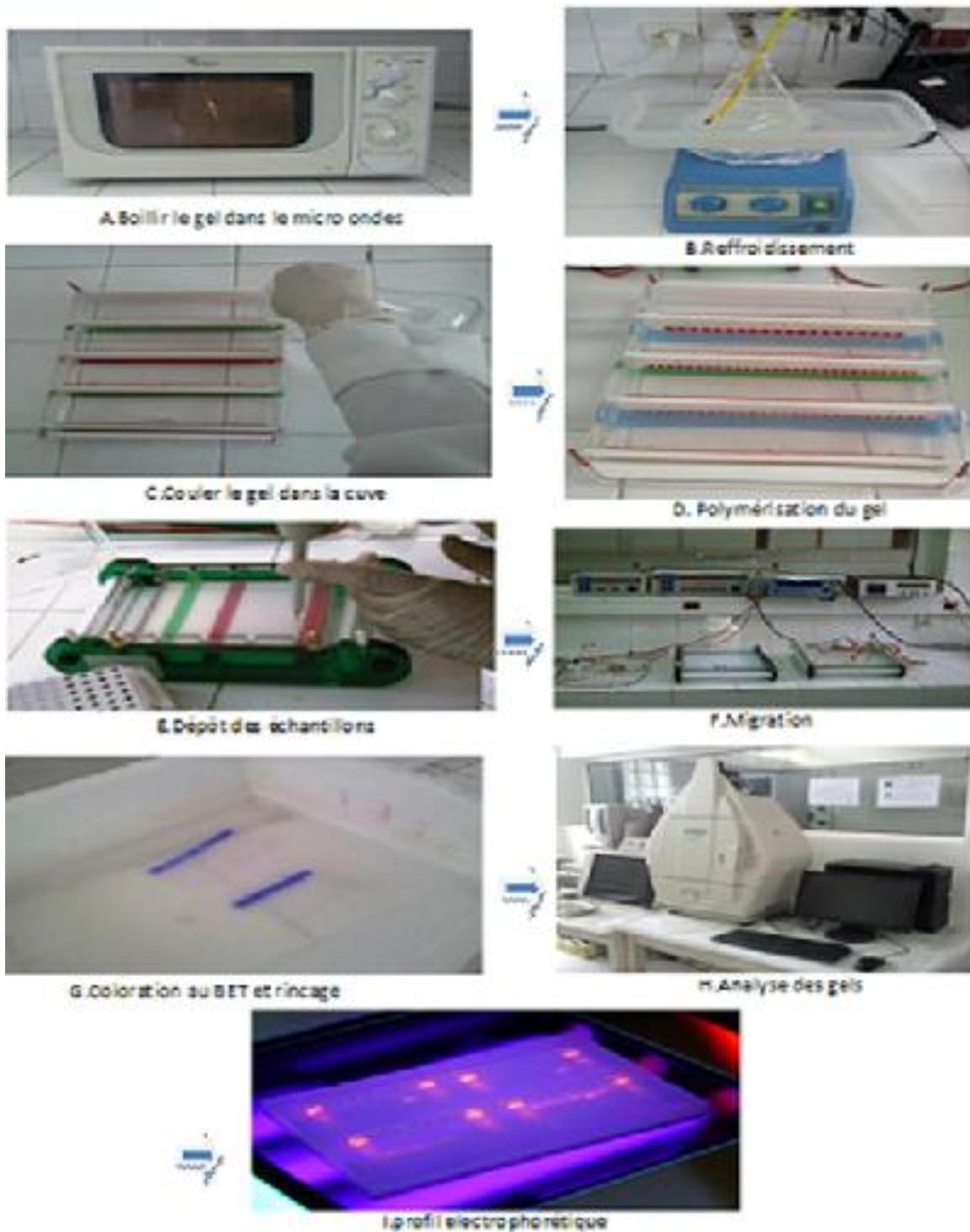


Figure 22: Étapes de test de qualité.

III. AMPLIFICATION DE L'ADN EXTRAIT PAR PCR

La réaction d'amplification en chaîne de l'ADN extrait est effectuée dans un volume final de 10 μ L, contenant 50 ng/10 μ L d'ADN (concentration optimale à l'amplification), 1

pmol/ μL de chaque amorce (Annexe 7), 0.2 mM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP et dTTP (Annexe 7), 1X tampon Taq et 0.025U *Taq* polymérase (purifiée à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*).

Les conditions standards de la réaction (10 μL dans chaque tube) incluent les éléments et les concentrations suivantes (Tableau 4) :

Tableau 4 : Réactifs utilisés dans la PCR et leurs concentrations.

Composantes (Master Mix)	Volumes pour 1 réaction	Volumes pour 80 réactions
Eau bidistillée stérile	4.375 μL	350 μL
5x Tampon <i>Taq</i>	2 μL	160 μL
25 mM MgCl_2	0.6 μL	48 μL
2 mM dNTPs	1 μL	80 μL
Amorce (100 pmole/ μL)	1 μL	80 μL
<i>Taq</i> polymérase (5 U/ μL)	0,025 μL	2 μL
ADN (50ng)	1 μL	----
Volume total	10 μL	720 μL

NB : un risque d'erreur de 5% est pris en compte lors du pipetage des volumes des réactifs utilisés dans la PCR. Pour les 76 échantillons (avec un risque d'erreur de 5%) on aura $((76 \times 5) / 100) = 3.8 \sim 4$. Donc on compte 80 réactions.

L'amplification est réalisée dans le thermocycleur Mastercycler Gradient (Figure 23) et les conditions d'amplification sont d'abord une phase de dénaturation initiale à 95°C pendant 4min, suivi de 35 cycles de :

- 95°C pendant 30 secs (Dénaturation de l'ADN) ;
- 50°C pendant 30 secs (Hybridation des amorces avec l'ADN) ;
- 72°C pendant 45 secs (Elongation d'ADN).

Une phase finale d'élongation à 72°C pendant 10 min est réalisée. Après la fin du programme, les produits PCR (amplifiats) sont stockés à 4 C°.



Figure 23 : Thermocycleur utilisé dans la PCR.

Un jeu de sept marqueurs microsatellites est utilisé dans cette étude (Tableau 5) pour examiner la diversité génétique des populations locales de *Vicia faba* L. Ces marqueurs sont de deux types :

- **Type VFG** (VF: *Vicia Faba*, G: Giza 402): comprend cinq marqueurs microsatellites choisis parmi 89 amorces séquencés au total par Zeid et *al* (2009) ;
- **Type GBSSR-VF** (cDNA simple sequence repeat, *Vicia Faba*): comprend deux marqueurs choisis parmi 55 amorces testées par Sundan et *al.* (2013).

Tableau 5 : Marqueurs microsatellites testés.

Amorces	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')	Repeat type & length	Expected size (bp)	PIC
VfG 01	TTTCAGCAAACACTAGAAC CAATC	GGCATTTCAGTTTTTAC CTTGTA	(AG) 15	224	0.70
VfG 19	AGCGATGGTGCTCATGC TTA	TCTCTCACGGAATCAC ATCTTT	(AG) 9	174	0.72
VfG 28	AGAGTCCCAAAGAGTG GGTT	CCAAAGGC AAAAATG AGGGCTT	(AG) 19	220	0.65
VfG 55	ATCATCCAGGAGGGAG AAAA	ATGGGCAGAGAGGAT AAAAA	(AG) 12	148	0.56
VfG 89	TTGTCAAGAGAGGCCGG TTA	CACACGATCTCTCTCT CT	(AG) 20	150	0.36
GBSSR- VF-52	GGTTTCTTGTCCAATA AGACG	TGCGATTCTGGAAATT GG	(CAG) 5	261	0.65
GBSSR- VF-115	TGCTGCTTTTCCAACCA T	GTGCATGCCATAACA AAA	(AT) 7	177	0.76

1. ELECTROPHORESE SUR GEL D'ACRYLAMIDE NATIF A 8%

1.1. Utilisation

Un gel de polyacrylamide est une matrice de séparation utilisée en électrophorèse de biomolécules, telles que les protéines et les fragments d'ADN. Ce gel possède un pouvoir résolutif de 10 paires de bases. L'ADN peut être aussi séparé en utilisant l'électrophorèse sur gels d'agarose. Ce dernier n'est pas adapté à la séparation de petits fragments.

1.2. Composition

Les gels de polyacrylamide peuvent varier en composition. Ils sont constitués d'acrylamide qui est l'unité de base et de bis-acrylamide (N, N méthylène-bisacrylamide) qui est l'agent pontant (fixateur). En fonction des différents taux de ces deux substances, on obtient différents maillages et donc différentes densités de gel. La réaction de polymérisation se fait grâce à l'ajout de deux substances réactives : le TEMED (Tetra-Méthyl-Ethylène-Diamine : cofacteur de polymérisation) et le persulfate d'ammonium (APS à 25 % : agent polymérisateur) qui en réagissant avec la lumière, deviennent des anions actifs en enclenchant la polymérisation.

1.3. Préparation

Les produits d'amplification sont séparés sur gel d'acrylamide natif à 8% (Annexe 8). La solution d'acrylamide 40% est préparée à partir de l'acrylamide et du bisacrylamide (Annexe 8). La solution est stockée à 4°C à l'obscurité.

1.4. Traitement des plaques et écoulement du gel

Les plaques en verre sont bien lavées dans la solution de NaOH, qui élimine les traces du gel précédent, puis rincées à l'eau distillée et essuyées avec du papier absorbant imbibé d'eau distillée. Les plaques sont ensuite, fixées entre elles par les crochets (Figure 24).

100 mL ou 150 mL de la solution d'acrylamide 8% (selon l'épaisseur des espaceurs entre les plaques) sont coulés doucement entre les plaques en évitant la formation des bulles d'air sur le gel. Les peines sont insérées doucement avant la polymérisation du gel. Cette dernière dépend essentiellement du volume de TEMED et du persulfate d'ammonium (APS) dans la composition du gel.

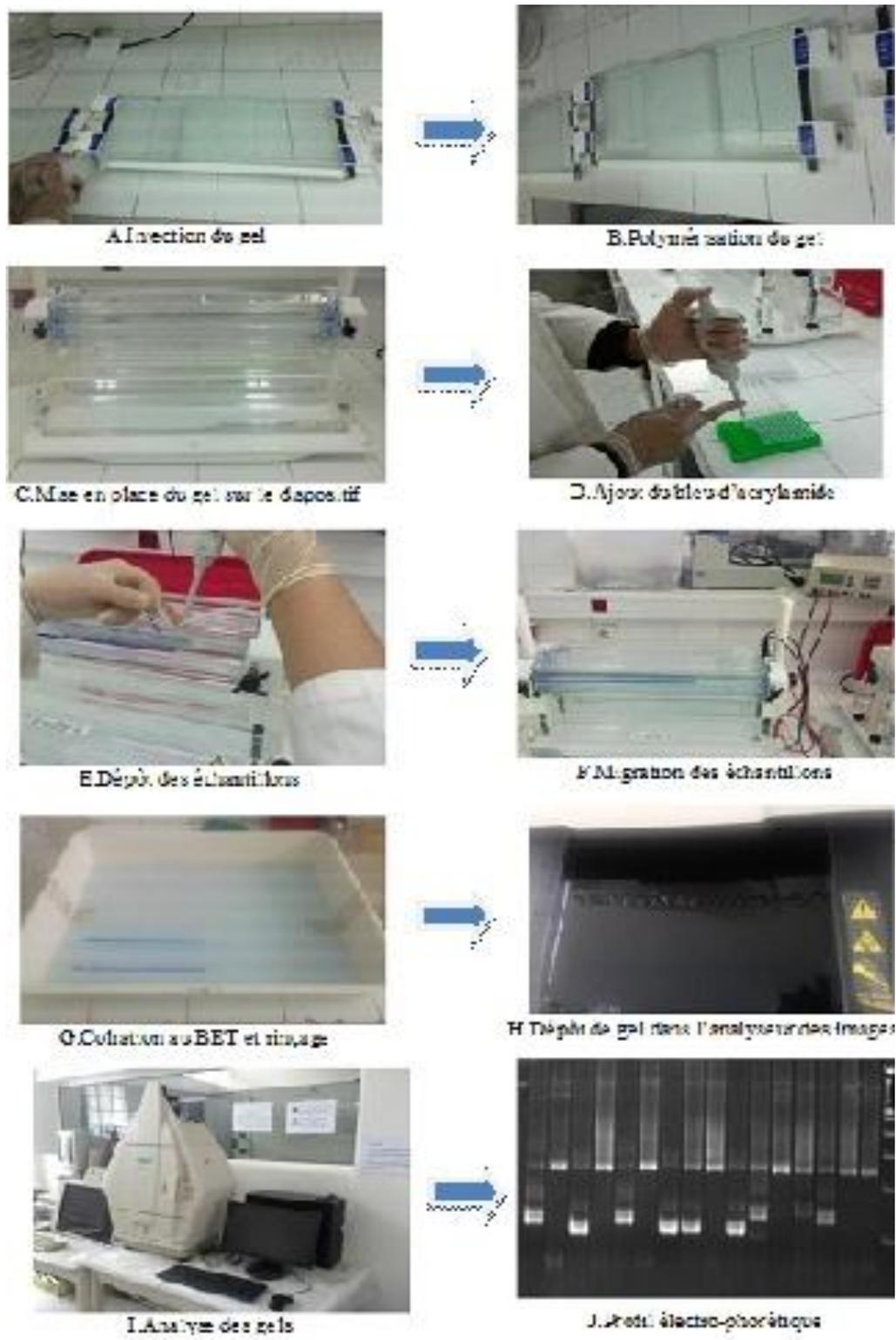


Figure 24 : Analyse sur gel d'acrylamide natif 8%, montage, coloration au BET et lecture sous UV.

1.5. Montage de la cuve

Une fois le gel polymérisé (après ~ 45mn), les deux plaques sont placées et bien serrées dans la cuve remplie de TBE 0.5X. Les peines sont délicatement retirées afin de ne pas casser ou déformer les puits (Figure 24).

1.6. Migration

Après l'ajout de 5 μ L du bleu d'acrylamide (Annexe 9) aux différents échantillons, 7 μ L du produit PCR sont déposés dans les puits (Figure 24E). La migration s'effectue pendant 2 heures à 300 V. Le marqueur de taille utilisé est celui de 100 bp.

1.7. Révélation

Après migration, le gel est coloré pendant 3mn dans la solution du bromure d'éthidium (stock du BET est 10 mg/ml), puis rincé pendant 1 min dans l'eau distillée.

Les bandes sont visualisées sous UV. Les photos sont prises à l'aide d'un système d'image des gels (BIO RAD Molecular Imager Gel Doc XR⁺) (Figure 24I).

2. REVELATION DES PROFILS ÉLECTROPHORÉTIQUES

Les profils révélés sur le gel d'agarose après le test de qualité comportent généralement une seule bande. Chaque bande diffère de l'autre par son contraste, ce qui est fonction de la concentration d'ADN dans chaque accession. L'estimation de la concentration se fait par deux méthodes soit par spectrophotométrie ou par comparaison avec les bandes du marqueur lambda dans le cas de migration sur agarose (test utilisé).

Concernant l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, et à partir de chaque profil obtenu, les bandes SSR les plus nettes et reproductibles qui se trouvent à peu près à la même taille prévu que le marqueur sont retenues. Sur un tableau Excel, on note la présence par 1 ou l'absence par 0 des différentes bandes polymorphes.

3. ANALYSE STATISTIQUES DES DONNEES

Tous les paramètres de la mesure de la diversité génétique, les fréquences alléliques, les PIC, les indices de diversité génétique H et les distances génétiques, peuvent être déterminés à l'aide d'un logiciel appelé dans notre étude Power Marker v3.25.

3.1. Calcul des fréquences alléliques

La fréquence allélique est calculée comme suit

$$P_i = \frac{\text{Nombre d'allèle pour chaque locus}}{\text{Nombre total d'allèle de tous les locus}}$$

3.2. Calcul du Polymorphic information content (PIC)

Le PIC ou H estimé est la somme total du polymorphisme de tous les marqueurs produits par une amorce particulier, il est déterminé en utilisant la formule suivante :

$$PIC = 1 - \sum P_i$$

Où p_i est la fréquence allélique à un locus

3.3. Calcul de l'indice de la diversité génétique (H)

L'indice de la diversité génétique (H) obtenue pour chacune des six amorces RAPD a été déterminé en utilisant la formule de Nei

$$H = \frac{n}{n-1} \times (1 - \sum p_i^2)$$

n = nombre d'individus analysés ;

p_i = Fréquence allélique.

3.4. Calcul des distances génétiques

Les distances génétiques sont calculées à partir de la matrice des individus en réponses aux marqueurs, grâce à l'indice de similitude de Jaccard en utilisant le logiciel (Power marker v 3.25).

Ce type de distance permet de d'évaluer la relation entre les populations locales étudiées et le niveau de rapprochement génétique entre elles.

3.5. Dendrogramme phylogénétique

Le dendrogramme est construit sur la base des distances génétiques (Annexe 10) ou des bandes des profils électrophorétiques en utilisant les sept marqueurs microsatellites. Il est construit pour exprimer la distance génétique entre 68 populations locales *Vicia faba* L., et huit autres échantillons prises comme témoin.

Le dendrogramme représente donc une classification qui a pour but d'obtenir une représentation schématique simple d'un tableau des données dont les colonnes (populations locales) caractérisent l'ensemble des lignes (amorces). Il permet de visualiser les regroupements possibles de différentes populations locales, en répartissant des entités en groupes (classes) homogènes, chaque groupe étant bien différencié des autres.

Le dendrogramme est reconstitué à partir de la matrice des distances en utilisant la moyenne arithmétique des distances entre les éléments regroupés par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic). Cette méthode est choisie sur la base des travaux antérieurs ayant montré que la classification UPGMA est mieux adaptée que la classification NJ (Neighbor Joining). En effet l'UPGMA donne une meilleure structuration des groupes avec des embranchements plus robustes. Le programme Power Marker v3.25 est ensuite utilisé pour construire un arbre à partir des distances de Jaccard calculées à partir des données initiales.

Le présent travail est réalisé dans le but d'établir une caractérisation génétique de 68 populations locales de la fève et de la féverole, en utilisant la technique des marqueurs microsatellites. Ce travail nous permettra aussi d'évaluer la distribution de la diversité génétique à travers le Maroc et d'estimer cette diversité intra ou interrégionale au sein de ces populations.

Dans cette étude, on a testé sept marqueurs microsatellites de deux types différents, et conçus principalement pour la fève (Zeid, M., et al 2009 et Sundan, S., et al 2013).

I. TEST DE QUALITE DE L'ADN EXTRAIT

L'évaluation de la diversité génétique des 68 populations locales par la technique d'amplification par les marqueurs microsatellites ou SSR (single sequence repeat) commence tout d'abord par une extraction de l'ADN. Le protocole utilisé est celui de CTAB 2X (Saghai-Marooif *et al.* 1984 modifié par Udupa *et al.*, 1999). Un test de qualité, effectué après l'extraction de l'ADN génomique de la fève et la féverole, et qui permet de mettre en évidence la présence de l'ADN, de vérifier sa qualité et donc la réussite de l'extraction, et finalement d'estimer la concentration de l'ADN en se basant sur le marqueur de taille et l'intensité de la bande.

Les profils électrophorétiques, des 76 échantillons (68 populations locales + 8 échantillons qualifiés comme témoin) sur un gel d'agarose 1.2%, montrent que tous les échantillons, se caractérisent par la présence de la bande d'ADN avec une taille supérieure à 21000 Pb (Figure 25).

Ces résultats, permettent d'annoncer que l'ADN extrait n'est pas dégradé et qu'il est de bonne qualité et peut être utilisé pour les étapes suivantes. À partir de ce test, des dilutions sont réalisées, pour avoir un volume de 100 µl dont la concentration finale d'ADN de 50 ng/µl.

II. AMPLIFICATION DE L'ADN PAR SSR

Pour estimer la diversité génétique présente dans les populations locales de *Vicia faba* L, on testé sept marqueurs moléculaires de deux types: cinq marqueurs de type VFG et deux marqueurs GBSSR. Tous les marqueurs testés donnent un résultat satisfaisant.

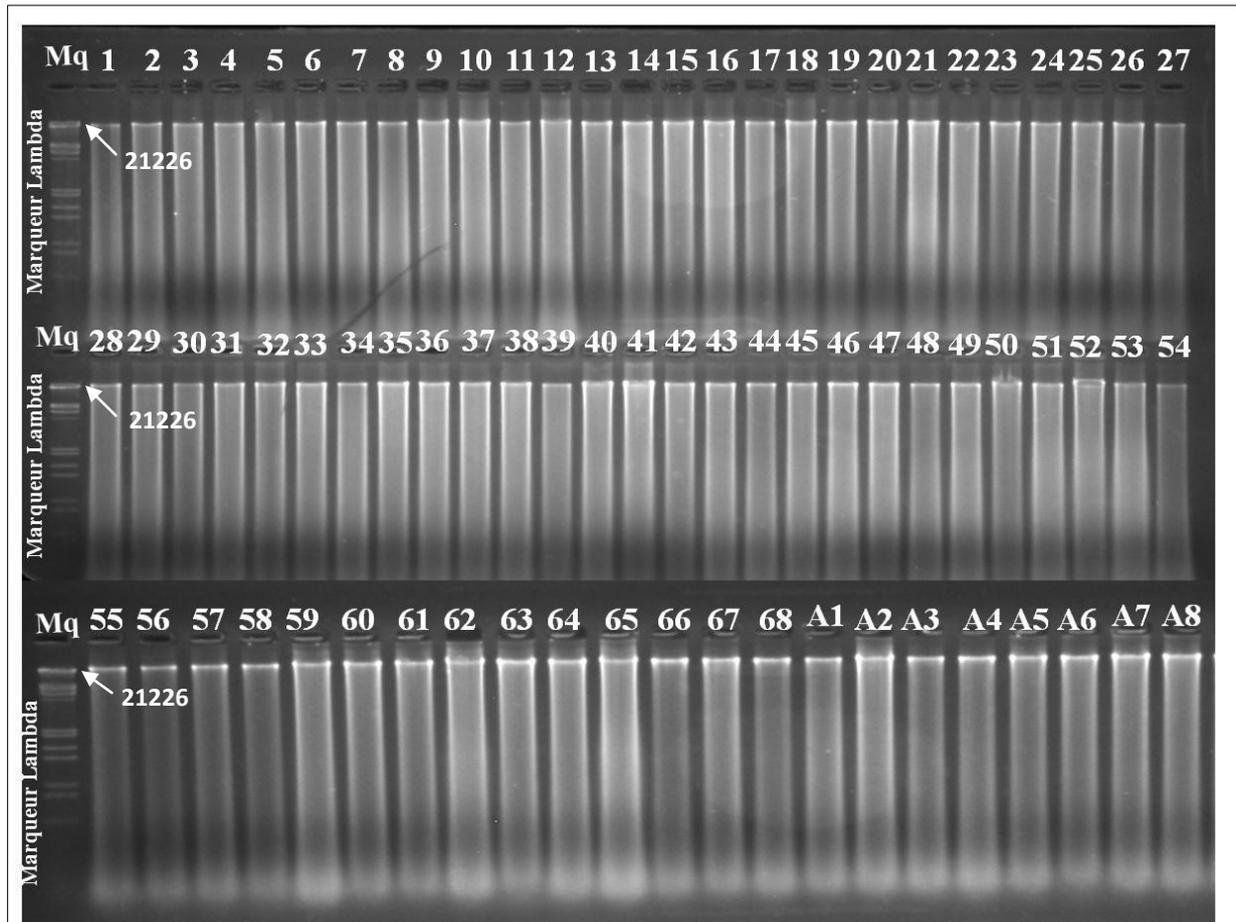


Figure 25: Profils électrophorétiques de l'ADN génomique des échantillons étudiés sur gel d'agarose à 1.2%.

Avant d'appliquer les marqueurs sur la totalité des échantillons, on fait tout d'abord un test avec chaque marqueur sur un nombre réduit d'échantillons (16 échantillons). Suivi par une amplification et une révélation sur gel d'acrylamide natif à 8%. Si le marqueur testé donne une bonne amplification, on l'applique sur la totalité des échantillons.

Les profils d'amplification par les sept marqueurs : VFG 01, VFG 19, VFG 28, VFG 55, VFG 89, GB-SSR 52, GB-SSR 115 sont présentés successivement dans les Figures 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,

Les sept amorces utilisées dans cette étude montrent un nombre d'allèles oscillant entre quatre allèles pour les amorces VFG 19 et VFG 89 à sept allèles pour les amorces VFG 55 et GB-SSR VF 115. Avec une moyenne de 5.43 allèles / amorce chez toutes les populations locales de *Vicia faba* L. étudiées.

1. AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 01

Le nombre d'allèles différents comptés (entre la bande de 200 pb et 300 pb du marqueur) est cinq allèles différents A, B, C, D, E (Tableau 6) et un nombre total dans tous les échantillons de 90 allèles (Figure 26). Le taux des hétérozygotes pour toutes les populations dont l'ADN est amplifié par cette amorce est de 0,2027 (Tableau 8).

Avec une taille prévue de 224 pb, ce marqueur moléculaire a donné un pourcentage de polymorphisme très élevé (100%).

2. AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 19

L'amorce VFG 19 génère un pourcentage de polymorphisme très élevé (100%), avec un nombre faible d'allèles différents. Quatre allèles différents sont observés: A, B, C, D (Tableau 6), et un nombre total d'allèles de 58 allèles dans tous les échantillons (Figure 27).

Le taux des hétérozygotes pour cette amorce est le plus faible parmi toutes les amorces utilisées dans cette présente étude avec 0,160 (Tableau 8).

Tableau 6 : Pourcentage des bandes polymorphes pour chaque amorce utilisée.

Locus	Nbre total d'allèles	Nbre total de bandes	Nbre de bandes polymorphes	Pourcentage de polymorphisme
VFG 01	90	5	5	100 %
VFG 19	58	4	4	100 %
VFG 28	113	6	5	83,33 %
VFG 55	94	7	7	100 %
VFG 89	134	4	4	100 %
GB-SSR VF 52	92	5	4	80 %
GB-SSR VF 115	126	7	7	100 %
Total	707	38	36	94,73 %

Nbre : Nombre

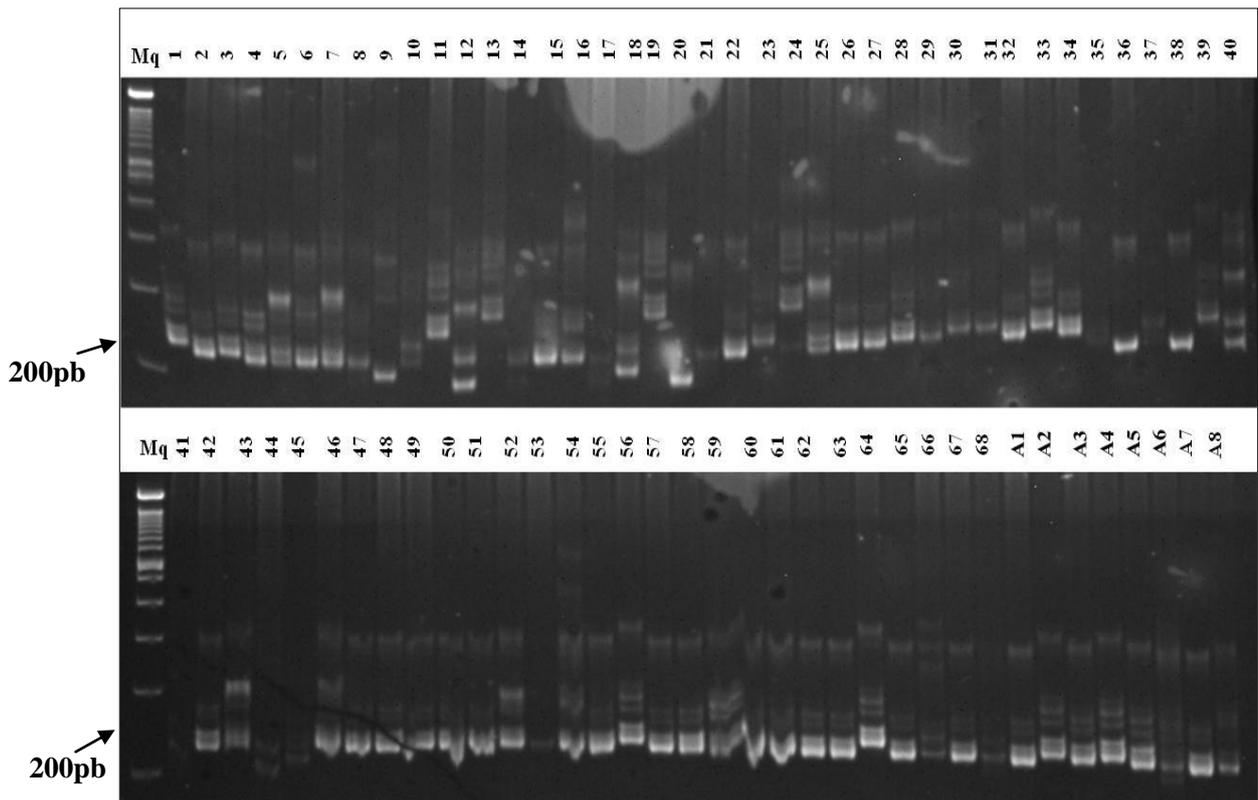


Figure 26: Profil d'amplification par l'amorce VFG 01 sur gel d'acrylamide à 8%.

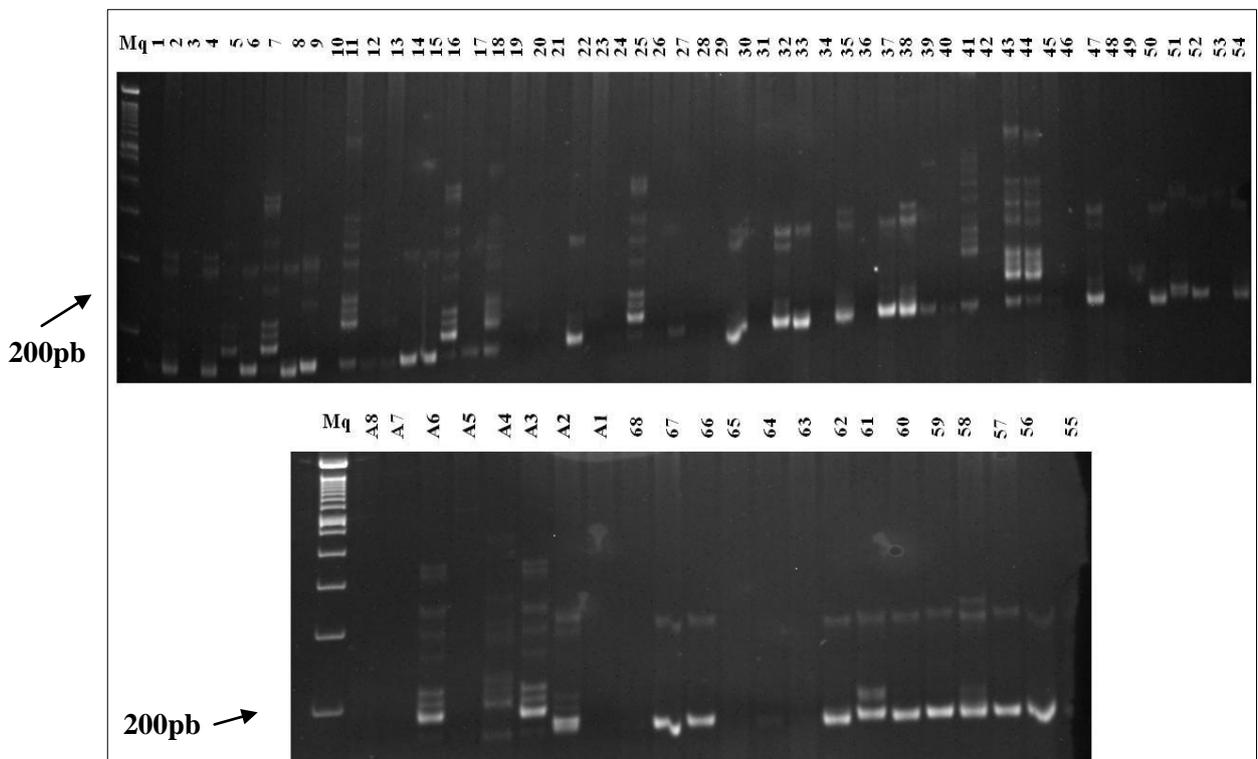


Figure 27: Profil d'amplification par l'amorce VFG 19 sur gel d'acrylamide à 8%.

3. AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 28

Ce marqueur nous donne une idée sur la diversité génétique entre les populations locales étudiées d'une part parce qu'il possède un pourcentage de polymorphisme de 83.33% (Tableau 6), et d'autre part, il possède un nombre total d'allèles assez élevé avec 113 allèles pour tous les échantillons (Figure 28).

La taille prévue de ce marqueur est 220 pb (Zeid *et al.*, 2009), L'amorce VFG 28 possède un taux des hétérozygotes moyen de 0,5076 (Tableau 8).

4. AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 55

Cette amorce utilisée permet de détecter un pourcentage de polymorphisme très élevé (100%) dans les populations locales *Vicia faba* L (Figure 29), ce taux est le plus élevé. Toutes les bandes sont polymorphes avec un nombre élevé d'allèles différents à sept allèles: A, B, C, D, E, F, G (Tableau 6).

Ce marqueur possède un taux des hétérozygotes faible de 0,338 (Tableau 8)

5. AMPLIFICATION PAR L'AMORCE VFG 89

Le marqueur de type VFG possède seulement quatre allèles différents : A, B, C et D (Tableau 6). Ces allèles se trouvent dans presque la totalité des populations locales étudiées ce qui a généré un nombre total d'allèles de 134. Le pourcentage de polymorphisme très élevé (100%), La taille prévue de l'amorce VFG 89 est 150 pb (Figure 30).

Le taux des hétérozygotes pour cette amorce est le plus élevée avec 0,81 (Tableau 8).

6. AMPLIFICATION PAR L'AMORCE GB-SSR VF 52

Le marqueur GB-SSR VF 52 (Sundan *et al.*, 2013) a généré le plus faible pourcentage de polymorphisme de 80%, parmi tous les marqueurs utilisées (Tableau 6) . Le nombre d'allèles différents pour cette amorce est cinq avec au total 92 allèles pour les différents échantillons (Figure 31). En plus le taux des hétérozygotes est faible de l'ordre de 0,4154.

7. AMPLIFICATION PAR L'AMORCE GB-SSR VF 115

Le dernier marqueur utilisé dans la présente étude révèle un pourcentage élevé de polymorphisme. Il y a sept allèles différents qui sont : A, B, C, D, E, F, et G (Tableau 6) avec un total de 126 allèles observés chez tous les échantillons (Figure 32). Le taux des hétérozygotes pour cette amorce est de 0,750 (Tableau 8).

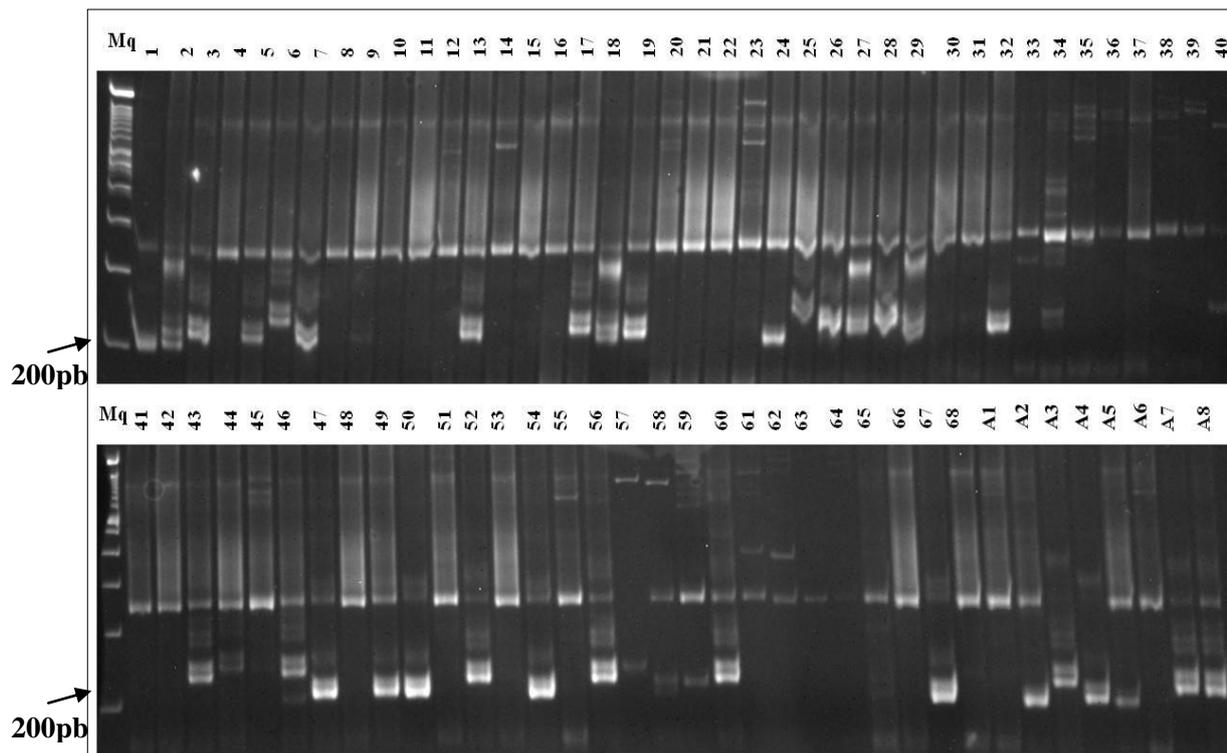


Figure 28: Profil d'amplification par l'amorce VFG 28 sur gel d'acrylamide à 8%.

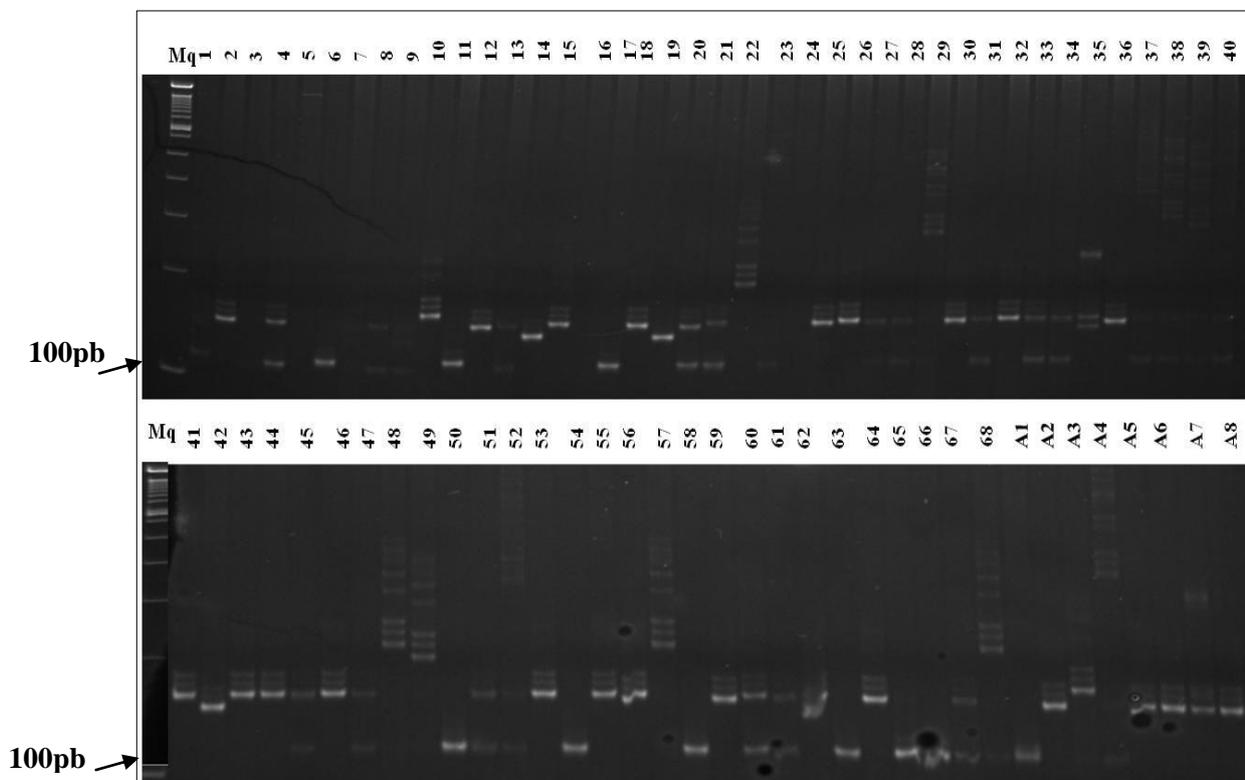


Figure 29: Profil d'amplification par l'amorce VFG 55 sur gel d'acrylamide à 8%.

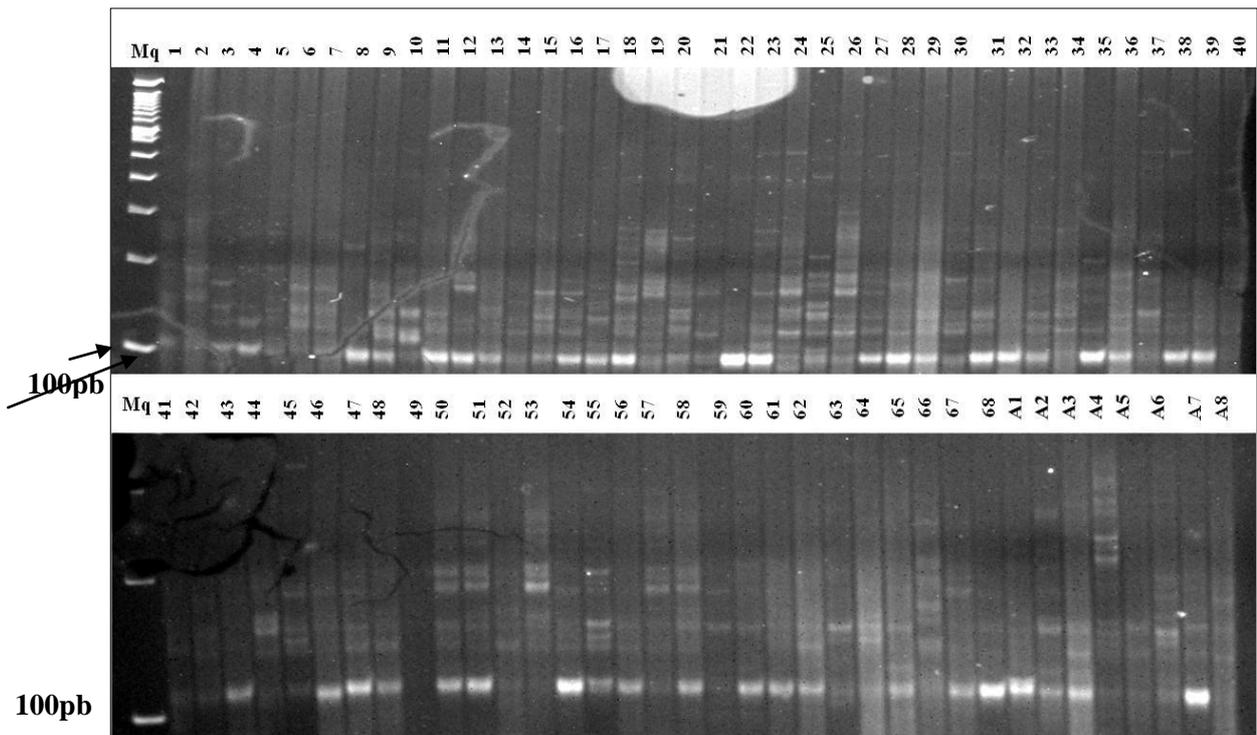


Figure 30: Profil d'amplification par l'amorce VFG 89 sur gel d'acrylamide à 8%.

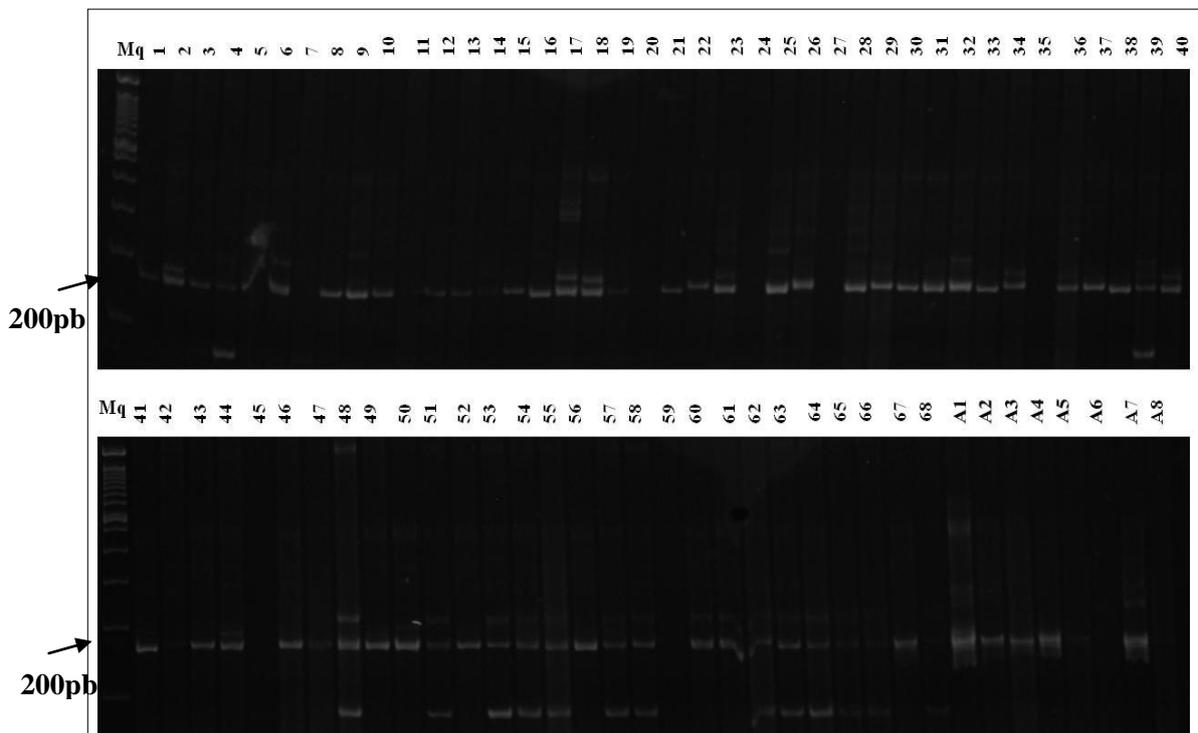


Figure 31: Profil d'amplification par L'AMORCE GB-SSR VF 52 sur gel d'acrylamide à 8%.

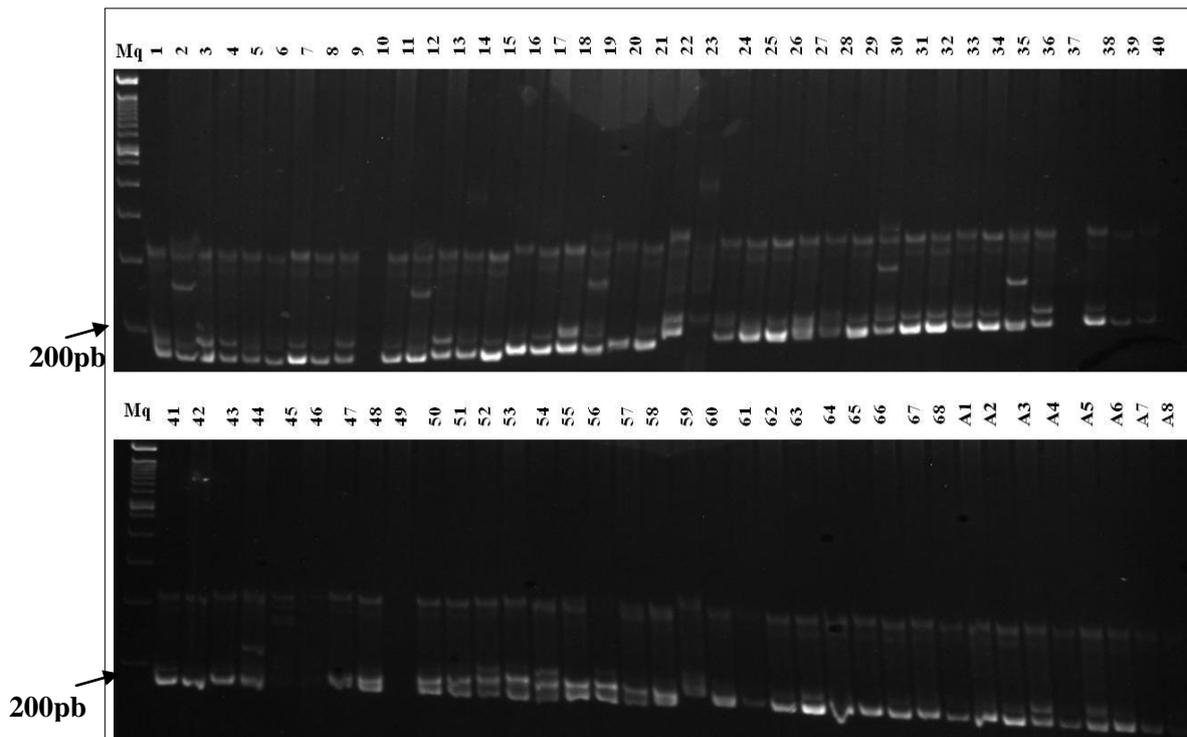


Figure 32 : Profil d'amplification par l'amorce GB-SSR VF 115 sur gel d'acrylamide à 8%.

La technique de marquage moléculaire basée sur les microsatellites est une technique performante qui nous permet d'évaluer la diversité génétique contenue dans les populations locales de fève et de féverole, et d'estimer la distribution de cette diversité au Maroc.

Sur la base des résultats d'amplification des sept amorces étudiées, une base de données est faite avec le principe de présence (1) absence (0).

Toutes les amorces utilisées dans cette étude génèrent un % de polymorphisme oscillant entre 80% pour l'amorce GB-SSR VF 52 et 100% pour les amorces VFG01, VFG 19, VFG 55, VFG 89, GB-SSR VF 115, avec un pourcentage moyen de polymorphisme de 94,73% pour les sept amorces (Tableau 6).

Ce pourcentage concorde, d'une part avec le travail de Zong (2009) qui a annoncé un pourcentage de polymorphisme de 96,72%, D'autre part, notre pourcentage de polymorphisme est très élevé en comparant avec celui de Razzak (2012) qui estime ce pourcentage à 69.72%, de Khwan *et al.* (2010) qui l'estiment à 69,6% et d'Aliouj (2011) qui annonce un pourcentage de polymorphisme de l'ordre de 59,26%.

II. ANALYSE DES DONNEES

1. FREQUENCES ALLELIQUES

Les fréquences alléliques des populations locales pour chaque allèle et pour chaque locus sont regroupées dans le tableau 7. La fréquence la plus élevée de 0,9 est enregistrée pour l'allèle A chez les populations locales de févete dont l'ADN est amplifié par l'amorce GB-SSR VF 52. La fréquence la plus faible est de 0,014 est enregistré pour les allèles C, D, F, et G chez les populations de fève dont l'ADN est amplifié par l'amorce GB-SSR VF 115.

Les fréquences alléliques, calculés chez toutes les populations locales de fève, de féverole ou de févete, mettent en évidence quelques distinctions entre les trois sous-espèces :

- Les allèles D et E de l'amorce VFG 01 ; les allèles B et D de l'amorce VFG 19 ; l'allèle D de l'amorce VFG 28 ; l'allèle D de l'amorce VFG 89 ; les allèles B et D de l'amorce GB-SSR VF 52 ; et enfin les allèles C et F de l'amorce GB-SSR VF 115 sont communs à la fève (*Vicia faba major*) et la féverole (*Vicia faba minor*), et absents chez la févete.
- Les allèles E, F et G de l'amorce VFG 55, ainsi que les allèles E et F de l'amorce GB-SSR VF 115, sont des allèles observés uniquement chez les accessions de la fève (*Vicia faba major*) par contre sont absents chez les accessions de la féverole ou la févete. L'allèle C, détecté dans les populations dont l'ADN est amplifié par l'amorce VFG 55, existe seulement chez les populations de féverole (*Vicia faba minor*) et de févete (*Vicia faba equina*). Cet allèle est absent chez les populations de fève. Tous ces allèles différencient la fève (*Vicia faba major*) par rapport à la féverole et la févete.
- Les allèles C et E de l'amorce GB-SSR VF 52 et l'allèle D de l'amorce GB-SSR VF 115 sont communs à la fève et la févete. Par contre, l'allèle E de l'amorce GB-SSR VF 52 est détecté seulement chez la féverole. Ces quatre allèles permettent de distinguer la féverole par rapport la fève et la févete.

Notons que tous ces allèles ont tous des fréquences très faibles qui avoisinent le zéro, ce qui veut dire qu'ils ne sont pas distinctifs ou « marqueur » de ces différentes sous espèces.

Tableau 7: Fréquences alléliques pour chaque loci SSR.

Locus	Allèle	<i>V. faba major</i> (fève) (n= 42 + 2 T)	<i>V. faba minor</i> (féverole) (n= 19 + 1Témoin)	<i>V. faba equina</i> (févette) (n= 7 + 5 témoins)
VFG 01	A	0,620	0,520	0,533
	B	0,120	0,120	0,200
	C	0,080	0,160	0,267
	D	0,080	0,160	-
	E	0,100	0,040	-
VFG 19	A	0,696	0,611	0,714
	B	0,151	0,056	-
	C	0,121	0,278	0,286
	D	0,030	0,056	-
VFG 28	A	0,046	0,133	0,053
	B	0,187	0,133	0,263
	C	0,078	0,033	0,053
	D	0,031	0,033	-
	E	0,015	0,033	0,053
	F	0,640	0,633	0,579
VFG 55	A	0,372	0,429	0,286
	B	0,491	0,429	0,500
	C	-	0,048	0,143
	D	0,033	0,095	0,071
	E	0,033	-	-
	F	0,016	-	-
	G	0,050	-	-
VFG 89	A	0,480	0,514	0,409
	B	0,454	0,429	0,500
	C	0,051	0,029	0,091
	D	0,012	0,029	-
GB-SSR VF 52	A	0,634	0,842	0,900
	B	0,095	0,053	-
	C	0,222	-	0,100
	D	0,047	0,053	-
	E	-	0,053	-
GB-SSR VF 115	A	0,528	0,500	0,625
	B	0,389	0,395	0,313
	C	0,014	0,079	-
	D	0,014	-	0,063
	E	0,028	-	-
	F	0,014	0,026	-
	G	0,014	-	-

(T : Témoin)

(n = nombre des accessions examinées + nombre d'échantillons témoins)

2. POLYMORPHIC INFORMATION CONTENT (PIC)

Le taux de polymorphisme (PIC) se trouve dans l'intervalle [0,333-0,5770] (Tableau 8). L'amorce VFG 55 génère le taux le plus grand et l'amorce GB-SSR VF 52 génère un faible taux de polymorphisme (Figure 32). Le taux de polymorphisme moyen pour toutes les amorces est de 0,4753.

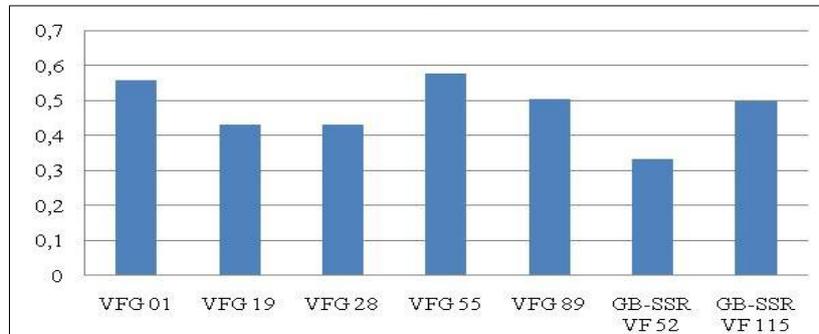


Figure 33 : Taux de polymorphisme détectés pour chacun des loci SSR.

3. DIVERSITE GENETIQUE (H)

L'indice de diversité génétique varie entre [0,3550 - 0,6381] (Tableau 8), la valeur la plus faible est enregistré l'amorce GB-SSR VF 52 et la valeur la plus élevée est obtenue chez les populations de *Vicia faba* L, dont l'ADN est amplifié par l'amorce VFG 55 (Figure 33). Par contre l'indice le plus faible est 0,3550 remarquée chez les populations dont l'ADN est amplifiée par l'amorce GB-SSR VF 52.

L'indice de diversité génétique H moyen pour les sept amorces utilisées est de 0,5243. Cet indice est plus faible que celui d'Aliouj *et al.* (2011) qui ont annoncé un indice de diversité H de 0.743 chez *Vicia faba* L, et supérieur à celui de Zong (2009) qui donne un indice de diversité H de 0,26 chez *Vicia faba* L.

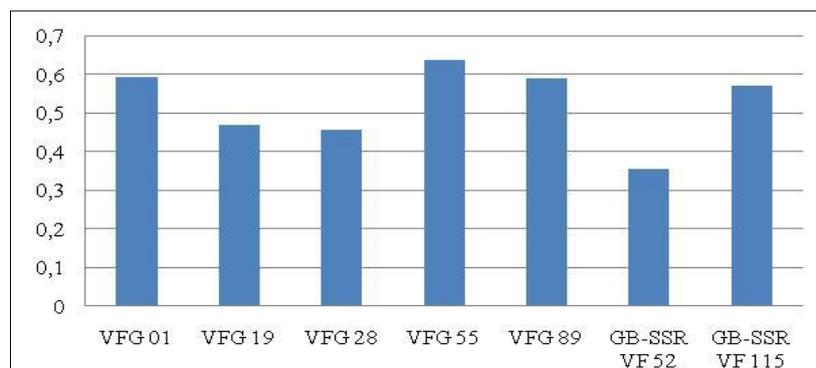


Figure 34: Indice de diversité génétique détectée pour chacun des loci SSR.

Tableau 8 : Diversité génétique, PIC, et taux des Hétérozygotes pour chaque amorce.

Locus	Diversité génétique	PIC	Taux des Hétérozygotes
VFG 01	0,5922	0,5575	0,2027
VFG 19	0,4696	0,4292	0,1600
VFG 28	0,4561	0,4294	0,5067
VFG 55	0,6381	0,5770	0,3380
VFG 89	0,5894	0,5030	0,8108
GB-SSR VF 52	0,3550	0,3333	0,4154
GB-SSR VF 115	0,5701	0,4978	0,7500
moyenne	0.5243	0.4753	0.4558

Enfin les taux des hétérozygotes oscillent entre [0,160 - 0,8108]. Le taux le plus élevé des hétérozygotes est enregistré chez l'amorce VFG 19, et le taux le plus élevé est celui de l'amorce VFG 89.

4. DISTANCE GENETIQUE ET ARBRE PHYLOGENETIQUE

Les distances génétiques, établies sur la base du coefficient de Jaccard, entre chaque paire de populations locales figurant dans l'Annexe 8. Une distance génétique nulle entre deux populations signifie que ces populations sont très proches génétiquement voir identiques, chose qui peut être rectifié par l'application d'autres amorces.

Il faut noter que les distances génétiques plus petites, entre deux populations différentes, indiquent une étroite relation génétique alors que les grandes distances génétiques indiquent que les populations en question sont très différents génétiquement.

La distance génétique la plus élevée de 0,4474 est enregistrée entre la population 18 et 19. Ces populations sont donc les plus éloignés génétiquement entre elles.

Par contre, la distance la plus faible, $D = 0$ est enregistrée entre les paires de populations : (21;16), (14;42), (53;62), (28;47), (43;46).

5. DENDROGRAMME PHYLOGENIQUE UPGMA

Les distances génétiques sont utilisées pour la conception d'un dendrogramme (Figure 34) à partir de la matrice de similarité basée sur le coefficient de Jaccard et la méthode de regroupement UPGMA (Unweighted Pair- Group Methode Arithmetic Averaging Algorithm). Ce groupement constitue un moyen efficace pour l'évaluation de la relation génétique entre les populations. En effet, cette classification a comme but de regrouper les individus les plus proches en classes.

Ce dendrogramme (Figure 34) permet d'une part, de mettre en évidence quatre groupes avec un pourcentage de similarité de 75%. D'autres parts, au fur et à mesure que le pourcentage de similarité augmente, on rassemble en sous groupes plus spécifiquement des populations locales qui se ressemblent :

- **Groupe I** : occupé par deux féveroles récoltées dans deux régions différentes, le 19 de Chefchaouen et le 24 de jorf el malha. Ces deux populations sont regroupées avec un pourcentage de similarité de 90%.
- **Groupe II**: constitué de trois fèves (2 de Taza, 34 & 44 de Sebt el oudaya), et de deux féveroles (18 de Souk el Had et 26 de Kariat ba mohamed). À partir d'un pourcentage de similarité de 90%, le dendrogramme regroupe la population 18 (féverole) et 2 (fève) comme plus proches. Ceci met en question la notion de sous espèces, qui doit être complétée par d'autres études moléculaires.
- **Groupe III** : occupé par un témoin qui est le A8 : févette, en plus de 2 fèves (37 de Sebt el oudaya, et 59 de Ouezzane). Ce résultat est non concordant avec la notion du témoin avec lequel on compare nos échantillons.
- **Groupe IV**: Ce groupe est composé de 59,1% de fèves (dont deux témoins A1 et A5), de 24,24% de féverole (dont un seul témoin A2) et de 16,67% de févette (dont quatre témoins A6, A7, A3, et A4) parmi tous échantillons de ce groupe. À partir d'un pourcentage de similarité de 90% ce groupe est subdivisé en 13 sous groupes.

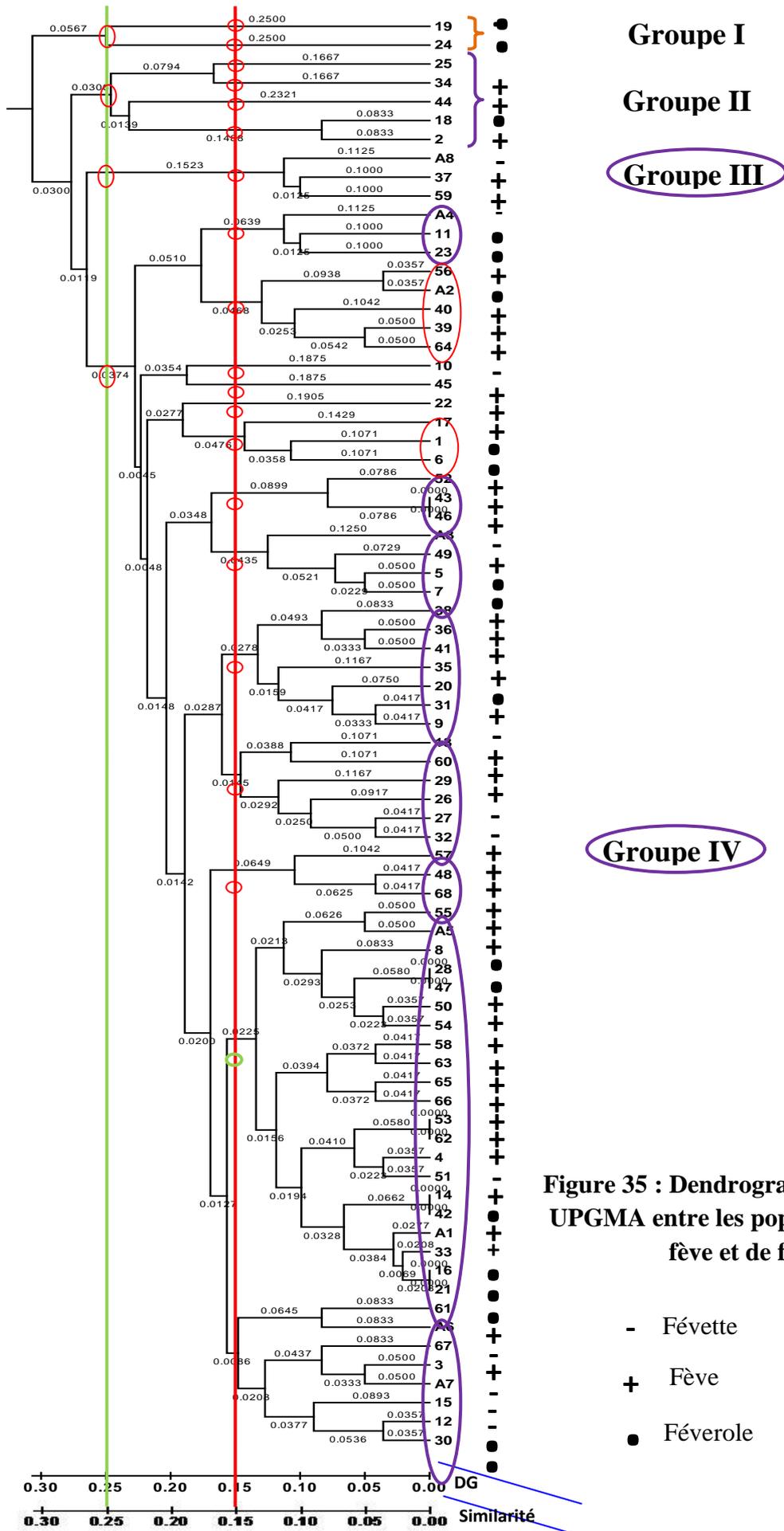


Figure 35 : Dendrogramme phylogénique UPGMA entre les populations locales de fève et de féverole.

Le sous groupe 11 est occupé par l'échantillon 57 de Ouezzane, 48 de la région d'après Bab merzouka et le 68 de Rhouazi. Ces trois accessions sont d'origines différentes mais sont génétiquement similaires. On peut en déduire que la répartition géographique n'est pas directement liée à l'identité génétique.

Le sous groupe 6 est occupé par un seul échantillon de fève (17) et deux féveroles (1 & 6). Ces échantillons sont génétiquement proches malgré qu'ils appartiennent à des sous espèces différentes.

D'après le dendrogramme les échantillons les populations 43 et 46, sont de même sous espèce (*Vicia faba major*) et de la même région (Sebt El Oudaya) sont génétiquement identiques. Par contre les échantillons, le 14 (féverole, d'origine Ouezzane) et le 42 (fève, d'origine Sebt el oudaya) sont aussi génétiquement identiques malgré qu'ils proviennent de deux origines différentes et deux sous espèces différentes.

D'après tous ces résultats et sur la base de l'utilisation de sept amorces SSR, on peut conclure que la répartition géographique ainsi que la différenciation de sous espèces n'implique pas forcément une ressemblance génétique.

L'objectif de cette étude est l'estimation de la diversité génétique dans 68 populations locales de *Vicia faba* L., récoltées à travers le Maroc. Et ce, dans le but d'avoir une idée sur l'importance et la distribution de la diversité génétique dans la région prospectée.

Le test de sept amorces a généré des niveaux de diversité et de polymorphisme très satisfaisants. Le nombre d'allèles détectés pour ces sept amorces oscille entre quatre allèles pour les amorces VFG 19 et VFG 89 à sept allèles pour les amorces VFG 55 et GB-SSR VF 115. Ce nombre d'allèles s'avère assez important. En effet, le pourcentage de polymorphisme moyen pour toutes les amorces est de 94,73 % avec seulement deux allèles monomorphes parmi 38 allèles différents au total. Ce résultat concorde avec celui de Zong (2009) qui annonce un pourcentage de polymorphisme de 96,72 % chez *Vicia faba* L., par contre, il dépasse les pourcentages annoncés par Khwan *et al.* (2010), Ouji (2011) et Razzak (2012) qui citent respectivement des pourcentages de polymorphisme de 69,6%, 59,26% et 69.72% chez *Vicia faba* L.

Le calcul des fréquences alléliques pour chacune des sous espèces, *Vicia faba* major, *Vicia faba* minor et *Vicia faba* equina, a permis de faire des distinctions entre ces sous espèces.

Le PIC moyen pour les sept amorces utilisées est de 0,4753. L'indice de diversité génétique H moyen est de 0,5243. Cet indice se trouve intermédiaire entre celui annoncé par Ouji *et al.* (2011) chez *Vicia faba* L. (H = 0.743), et celui annoncé par Zong (2009) chez (H = 0,26).

Sur les sept amorces testées dans le présent travail, l'amorce GBSSR-VF 52 montre à la fois le PIC et l'indice de diversité génétique les plus faibles (PIC = 0.333 ; H = 0.335), Par contre, l'amorce VFG 55 présente à la fois le PIC et l'indice de diversité génétique les plus élevés (PIC = 0.577; H = 0.638).

Les distances génétiques entre les populations locales étudiées donnent une idée sur les similarités génétiques entre ces populations. La distance la plus élevée est de 0,447 entre les populations 19 et 18. Ces deux populations sont donc les plus éloignés génétiquement. La distance génétique la plus faible (D = 0) est enregistrée entre les paires de populations: (21 et 16), (14 et 42), (53 et 62), (28 et 47), (43 et 46). Ceci indique que ces populations sont deux à deux génétiquement identiques.

Sur la base des résultats du dendrogramme phylogénétique UPGMA, et à un pourcentage de similarité de 85 %, le dendrogramme est subdivisé en quatre groupes (I, II, III, IV). L'analyse de cet arbre phylogénétique met en question deux notions principales ;

- Deux populations provenant de la même localité géographique, n'implique pas forcément une similarité génétique entre elles.
- La notion de sous-espèce : deux populations appartenant à deux sous-espèces différentes, peuvent être très proches génétiquement voir même avec une distance génétique nulle (Exemple : la population 28 (féverole) et la population 47 (fève) dans le groupe II, se montrent génétiquement identiques).

Pour conclure, on pense que l'identification de nouveaux marqueurs génétiques conçus spécifiquement pour la fève, va permettre d'enrichir les connaissances au niveau moléculaire pour cette espèce. De plus, elle facilitera la tâche aux sélectionneurs et aux améliorateurs pour rendre plus pratique les analyses de diversité génétique.

Au terme de ce travail, on propose en perspectives à venir :

- Tester de nouveaux marqueurs microsatellites et augmenter leur nombre ;
- Utiliser des marqueurs microsatellites liés aux traits agro-morphologiques ;
- Augmenter le nombre d'échantillons afin d'étudier les variations intra-populations et les variations en fonction des données micro-géographiques.

- **Abbad F.A. & J. Bachikh 2001.** Studies on the host range of *Dizylenchus Dipsaci* in Morocco. *Nematol. medit.* Eds : Bramel-Cox 29 : 51-57.
- **Alaoui S. B. 2009.** Référentiel pour la Conduite Technique de la fève (*Vicia faba* L). 92-101.
- **Arnaud J.F. 2006.** Passé, présent et avenir, Une brève histoire des marqueurs moléculaires utilisés en génétique des populations. 69p.
- **Bardakci F. 2001.** Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish journal of Biology.* 25: 185-196.
- **Beckmann J. S. & Soller M. 1986.** Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 35: 111-124.
- **Blackman R.L. & Eastop V.F., 2007.** Taxonomic issues (chapter I). in: *Van Edmen H F Harringto* eds: aphids as crop pests . CABI International, oxford shire, UK, 968-1003.
- **Blair M.W., Panaud O. & McCouch S. R. 1998.** Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 780-792.
- **Bond D.A., Laws D.A., Hawtin G.C., Saxena M.C. & Stephens J.H. 1985.** Faba bean (*Vicia faba* L.). In: *Grain Legume Crops.* R.J. Summerfield and E.H. Roberts (Editors). Collins, London, 199-265.
- **Boughdad A. 1996.** *Bruchus rufimanus*, un insecte ravageur des grains de *Vicia .faba* L. au Maroc. *Réhabilitation of faba bean* Ed actes, 179-184.
- **Chaux C. & C. Floury. 1994.** légumineuses potagères, légumes, fruits. Production légumière sec, Tome 3, *Technique et documentation Lavoisier* : 3-15.
- **Claros G.M. & Quesada,, A.R. 2000.** PCR as a specific, sensitive and simple method suitable for diagnostics. In : *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 28: 223-226.
- **Dajoz R., 2000** éléments d'écologie .Ed. Bordas Paris, 5^{ème} édition, 540p.
- **Daoui K. 2007.** Recherche de stratégies d'amélioration de l'efficacité d'utilisation du phosphore chez la fève (*Vicia faba* L.) dans les conditions d'agriculture pluviale au Maroc. Thèse présentée de Doctorat en Sciences agronomiques et ingénierie biologique, 215p.
- **De Marco A., De Simone C., Raglione M. & Lorenzoni P. 1995.** Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Genet. Toxicol. Environ. Mutag*, 5-12.

- **De Vienne M., Chausse A., Maurice & S. Santoni 1998.** Les marqueurs moléculaires et leurs utilisations. 95^{ème} Edition, 1-5.
- **Diaz-Ambrona H.C. & Minguez M.I. 2001.** Cereal-legume rotations in a Mediterranean environment: biomass and yield production. *Field Crops Research* 70: 139-151.
- **Dorette M.S & Kroschel J. 2005.** The potential of *Ulocladium botrytis* for biological control of *Orobanche* spp. *Biological Control* 33: 301–306.
- **Duc G., B. Shiyang, B. Michael, R. Bob, M. Sadiki, M. Jose & M. Vishniakova 2010.** Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. *Field Crops Research* 53: 99-109.
- **Elalaoui A.C. 2000.** Mécanisation de la culture des légumineuses au Maroc. N° 64. Bulletin mensuel d'information et de liaison de PNTTA, 1-4.
- **Eltun R., Bjerke O., Alfoldi T., Lockertz W. & Niggli U. 2000.** Yields and pre-crop effects of pulse crops in organic crop rotations. In Proceedings 13th International IFOAM Scientific Conference, Basel, Switzerland, 3-8.
- **Fatemi Z. 1996.** Situation de la culture des fèves au Maroc, in: *Réhabilitation of faba bean*. Ed actes, Rabat Maroc, 33-38.
- **Ferrara G., Loffredo E. & Senesi N. 2004.** Anticlastogenic, antitoxic and absorption effects of humic substances on the mutagen maleic hydrazide tested in leguminous plants. *Eur. J. Soil Sci.* 55: 449-458.
- **Ferreira M.Y. & Grattapaglia D. 1998.** Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. *Embrapa-cenargen*. Brasilia, DF, Brasil. 221 p.
- **Gepts P., W.D. Beavis, E.C. Brummer, R.C. Shoemaker & H.T. Stalker, 2005.** Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology* 137: 1228– 1235.
- **Gerard C. 1990.** La féverole, Encyclopédie Technique Agricoles, Paris. *Production Végétale* ; 213p.
- **Gordan M.M. 2004.** Haricots secs: situation, prospective et agroalimentaires. Botanique, édition Masson, Canada, 1-7.
- **Graham P.H. & Vance C.P. 2003.** Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol*, 131: 872-877.
- **Green C.F., Hebblethwai A. & Hellene R. 1986.** The practice irrigating of faba bean. *Revue fabis news letter* N°5 Ed ICARDA Syria,: 26-31

- **Hadrys H., Balick M. & Schierwater B. 1992.** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in: *Molecular Ecology*.1: 55-63.
- **Hamadache A. 2003.** La féverole. *Inst. Tech. Gr. Cult (T.T.G.C)*, 13p.
- **Harlan J.R. 1975.** Crops and Man, In: American Society of Agronomy and Crop Science Society of America, Madison, Wisconsin, 188: 21-617.
- **Harry M. 2003.** Faba bean, In: *Agfact second*, edition; Division of Plant Industries Peter Matthews, District Agronomist, Temora , Research Agronomist, Tamworth, pp: 4-27.
- **Hartl D.L. 1988.** A primer of population genetics. 1st edition. Sinauer Associates, Sunderland, 305 p.
- **Huygue C. 2005.** Prairies et cultures fourragères en France entre logiques de production et enjeux territoriaux, INRA, 228p.
- **Kanaya N., Gill B.S., Grover I.S., Murin A., Osiecka R., Sandhu S.S. & Andersson H.C. 1994.** *Vicia faba L*, chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 310 (2): 231-247.
- **Khaldi R., Zekri S., Maatougui M.E.H. & Ben Yassine A. 2002.** l'économie des légumineuses alimentaires au Maghreb et dans le monde. Proceeding du 2^{ème} séminaire du réseau remafeve/remala. « le devenir des légumineuses alimentaires dans le Maghreb ». Hammamet, Tunisie, 100p.
- **Kochert G. 1994.** RFLP technology, In: *Phillips R.L. and Vasil I.K.* (Eds.), DNA-based Markers in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 8-38.
- **Kwon I.S., Jinguo H. Clarice J. & Coyne 2010.** Genetic diversity and relationship among faba bean (*Vicia faba L.*) germplasm entries as revealed by TRAP markers. In: *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*. NIAB. 204-213.
- **Laumonier R. 1979.** Cultures légumières et maraichères, Tome III. Ed. J.B.bailliere, 276p.
- **LePenne M. & Beninger P.G. 1991.** Reproductive system. In: *Scallops : Biology, Ecology and Aquaculture* (Ed.Shumway, S.E.), 177-223.
- **Lezrek B.F. 2008.** Analyse de la diversité génétique et systématique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago Truncatula* et recherche des QTL. 245p.
- **Link W., C.F. Balko & L. Stoddard 2010.** Winter hardiness in faba bean: Physiology and breeding. *Field Crops Research* 115 (3): 287-296.

- **Lynch M. & Milligan B.G. 1994.** Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99.
- **Maatougui M.E.H. 1996.** la situation des fèves en Algérie et perspectives de reliance, in: *Réhabilitation of faba bean*. Ed actes, Rabat Maroc, 17-32.
- **Mansholt U.J. 1909.** L'Agronomie, guide concis à la connaissance des Pays-Bas Chen agriculture. 3e édition révisée, pt 2. Culture végétale. Zwolle, 228p.
- **MAPM 2011** Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime ; Situation de l'agriculture Marocaine : N°9. Novembre 2011.
- **MAPM 2012** Ministère de l'agriculture et de la pêche maritime ; l'agriculture marocaines en chiffres.
- **Maria, A., 1992.** Secteur des légumineuses alimentaires au Maroc, 360p.
- **McPherson M.J. & Moller S.G., 2000.** The Basics PCR. BIOS. *Springer-Verlag New York Inc. USA*, 276p.
- **Melake B. 2000.** Molecular marker techniques, In: *International Institute of Tropical Agriculture (IITA)*, Ibadan, Nigeria, 13-15.
- **Morgante M. & Olivieri A.M. 1993.** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The plant journal: cell and molecular biology*. 3(1) :175-82.
- **Moule C. 1972.** Plantes sarclées et diverses, tome III. *Phytotechnie spéciale*. (eds): La maison rustique, Paris, : 3-14
- **Najimi B., El Jaafari S., Jlibène M. & Jacquemin J.M. 2003.** Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 7: 17-35.
- **Ouji A., S. El Bok., N.H., Syed, R. Abdellaoui., M. Rouaissi., A.J. Flavell & M. El Gazzah 2011.** Genetic diversity of faba bean (*Vicia faba* L.) populations revealed by sequence specific amplified polymorphism (SSAP) markers, In: *Full Length Research Paper*.2163-2168.
- **Planquaert P.H. & Girard G. 1987.** La féverole d'hiver, revue, *ITCF* 3eme Tim, 32p.
- **Plomion C. 2003.** Marqueurs génétiques moléculaires.. Principes des techniques de biologie moléculaire, In : *Tagu D., Moussard C.*, eds 2ème édition. INRA Editions, Paris, France, 143-146.
- **Polhill R., M. Raven. & Stirton C.H. 1981.** Evolution and systematic of Leguminous. In: *Advances in legume Systematics*. Eds. Polhill, R.M, and Royal, P. P. Botanic Gardens, Kew, UK. 191-208.

- **Powel W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J. & Tingey S, 1996.** A comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Mol Breed* 2: 225-238.
- **Rachef S.A., Oumer F & Ouffroukh A. 2005.** Inventaire des ravageurs de la fève en Algérie (identification), 16.36-41.
- **Radetski C.M., Ferrari B., Cotelle S., Masfarau J.F. & Ferard J.F. 2004.** Evaluation of the génotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leaf chates. *Sci. Total Environ.* 33: 209-216.
- **Razzak A., M. Alfrmawy., H.M. Ibrahim & A.A. El-Hanafy. 2012.** Genetic Diversity in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers and Protein Analysis. In: *Life Science Journal.* 497-503.
- **Rhaim A. 2002.** Studies on the pathogenic variability among isolates of botrytis spp. from Tunisia and resistance of faba bean genotypes to chocolate spot. In : *11 congress of the mediterranean phytopathological union*, 146-148.
- **Ribaut J.M., William H.M., Khairallah M., Worland A.J & Hoisington D. 2001.** Genetic Basis of Physiological Traits. Application of Physiology in: *Wheat Breeding*, 3: 29-47.
- **Rochester I.J., Peoples M.B., Hulugalle N.R., Gault R.R & Constable G.A. 2001.** Using legume to enhance nitrogen fertility and improve soil condition in cotton cropping systems. *Field Crops Research* 70: 27-41.
- **Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A. & Allard R.W. 1984.** Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in *barley*: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018.
- **Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T. & Erlich H.A. 1985.** Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences & restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. In: *Sciences*, 1350-1354.
- **Sang N. & Li G. 2004.** Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba* L. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 560 (2):159-165.
- **Santoni S., Rampant P., Prado E. & Prat D. 2000.** Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers Agricultures*, 9: 311-327.
- **Schindler J. 1918.** Quelques remarques sur l'élevage et économique importance des races locales de cultures. *Deutsche Landwirt. Presse* 45 (25): 155–156.

- **Schultz S., Keatinge J.D.H. & Wells G.J. 1999.** Productivity and residual effects of legumes in rice-based cropping systems in a warm-temperate environment. Legume biomass production and N fixation. *Field Crops Research*, 23-35.
- **Sundan S., Jong H.P., Gyu T.C., Ho S L., Hyung J.B., Sok Y.L. & Jong W.C. 2013.** Development and Molecular Characterization of 55 Novel Polymorphic cDNA-SSR Markers in Faba Bean (*Vicia faba* L.) Using 454 Pyrosequencing. *Molécules*, pp: 1845-1856.
- **Swynghedauw B. 2000.** Biologie et génétique moléculaire. *Aide-mémoire*. 2e édition. Dunod, Paris. France, 156p.
- **Tagu D. & Moussard C. 2003.** Principes des techniques de biologie moléculaire. 2^{ème} édition. INRA, Paris, 176p.
- **Tanksley S.D., Young N. D., Paterson A. H. & Bonierbale M. 1989.** RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-264.
- **Udupa S.M., R.S. Malhotra & M. Baum 1999.** Tightly linked di- and tri-nucleotide microsatellites do not evolve in complete independence: evidence from linked (TA)_n and (TAA)_n microsatellites of chickpea (*Cicer arietinum* L.) 97: 299-307.
- **Udvardi M.K., Tabata S., Parniske M. & Stougaard J. 2005.** *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci.* 10: 222-228.
- **Vekemans X. & Jacquemart A.L. 1997.** Perspectives on the use of molecular markers in plant population biology. *Belgian Journal of Botany*, 129: 91-100.
- **Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijns M., Van de Lee T. & Hornes M. 1995.** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.
- **Wathman F., 1967.** Fleurs du bassin méditerranéen. VI^{ème} édition, Paris.56-61.
- **Welsh J. & McClelland M. 1990.** Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acid Research*, 18: 7213-7218.
- **White T.J., Arnheim N. & Erlich H. 1989.** The polymerase chain reaction. *Trends in: Genetics*, 5: 185-188.
- **Wilhelm O. 1885.** Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz , Gera, Germany.
- **Williams J.G.K., Rubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531- 6535.

- **Zeid, M., S. Mitchell, W. Link, M. Carter, A. Nawar, T. Fulton & S. Kresovich 2009.**
Simple sequence repeats (SSRs) in faba bean: new loci from Orobanche-resistant cultivar Giza 402, *Plant Breeding*. 1-7.
 - **Zeven A.C. 1998.** Landraces: A review of definitions and classifications. *Euphytica 104*, Academic Publishers. Printed in: the Netherlands, 139p.
 - **Zong J., Ren J., Guan S., Wang Q., Liu J., G. Paull & R. Redden 2010.** Molecular variation among Chinese and global germplasm in spring faba bean areas. In: *Plant Breeding*. 508-513.
-
- bayer.warinteractive.com La bruche de la fève
 - http://faostat3.fao.org/home/index_fr.html?locale=fr#SEARCH_DATA
 - http://faostat3.fao.org/home/index_fr.html?locale=fr#VISUALIZE
 - <http://sante.planet.fr/dictionnaire-de-la-nutrition-feve.738.380.html>
 - iStockphotos.com Quelques graines de légumineuse
 - jardiniersdartois.forumactif.com Mildiou sur une feuille de la fève
 - visualsunlimited.photoshelter.com La maladie de tâche chocolat sur une feuille de la fève
 - www.els.net L'orbanche crékata
 - www.greeningofgavin.com La rouille de la fève
 - www.plantwise.org L'antracnose de la fève
 - www.rustica.fr Le puceron noir de la fève

Annexe 1

Populations classées en sous-espèces

Pop	ss-esp		
1	féverole	13	49
5		17	50
6		22	51
7		29	52
8		31	53
11		32	54
12		34	55
14		35	56
16		36	57
18		37	58
19		38	58
20		39	60
21		40	61
23		41	62
24		42	63
25		43	64
28		44	65
30		45	66
33		46	67
		47	68

Pop	ss-esp
3	Févette
4	
9	
10	
15	
26	
27	

Pop	ss-esp	Pop	ss-esp
2	Fève	48	Fève

Lignées	Lignées	ss-esp
De Fes	A1	Fève
663-4	A5	
Alfia05	A2	Féverole
S87182-6-m-4	A3	Févette
S87182-8-m-4	A4	
FH 1032	A6	
Sel.88Lat18105	A7	
FH 1031	A8	

Annexe 2

Coordonnées des populations classées par ordre de numéro

D'expérimentation

N	N° de collecte	Longitude	Latitude	Altitude	Localité	Origine
1	COLL12_1	W 4°36,000'	N 34°04,552'	332	Oulad Ayad	
2	COLL12_5	W 04°00,811'	N 34°12,481	589	Taza	
3	COLL12_8	W 04°39,673'	N 34°17,320'	490	El Bsabsa	
4	COLL12_9	W 04°39,673'	N 34°17,320'	490	El Bsabsa	
5	COLL12_10	W 04°39,673'	N 34°17,320'	490	El Bsabsa	
6	COLL12_17	W 05°31,800'	N 34°29,239'	72	Jorf El Malha	
7	COLL12_18	W 05°30,762'	N 34°29,531	68	Jorf El Malha	Ain Dfali
8	COLL12_19	W 05°30,762'	N 34°20,531	68	Jorf El Malha	
9	COLL12_20	W 05°32,985'	N 34°35,771'	130	Ain Dfali	
10	COLL12_21	W 05°34,646'	N 34°48,03'	269	Ouezzane	
11	COLL12_23	W 05°34,646'	N 34°48,03'	269	Ouezzane	
12	COLL12_24	W 05°34,646'	N 34°48,03'	269	Ouezzane	
13	COLL12_29	W 05°34,646'	N 34°48,03'	269	Ouezzane	
14	COLL12_31	W 05°34,646'	N 34°48,03'	269	Ouezzane	
15	COLL12_32	W 05°34,646'	N 34°48,03'	269	Ouezzane	
16	COLL12_36	W 05°24,354'	N 35°01,734'	146	Souk el Had	
17	COLL12_37	W 05°24,354'	N 35°01,734'	146	Souk el Had	
18	COLL12_38	W 05°24,354'	N 35°01,734'	146	Souk el Had	
19	COLL12_39	W 05°16,204'	N 35°09,906'	527	Chefchaoun	

20	COLL12_40	W 05°16,204'	N 35°09,906'	527	Chefchaoun	
21	COLL12_42	W 05°21,404'	N 35°19,144'	601	El Hamra	
22	COLL12_43	W 05°21,404'	N 35°19,144'	601	El Hamra	
23	COLL12_45	W 05°30,633'	N 34°29,366'	66	Jorf El Malha	
24	COLL12_46	W 05°30,529'	N 34°29,343'	68	Jorf El Malha	
25	COLL12_47	W 05°20,476'	N 34°29,207'	72		
26	COLL12_49	W 05°12,668'	N 34°22,296'	170	Karia Ba Mohamed	
27	COLL12_50	W 05°12,668'	N 34°22,296'	170	Karia Ba Mohamed	
28	COLL12_51	W 05°12,668'	N 34°22,296'	170	Karia Ba Mohamed	
29	COLL12_52	W 05°12,638'	N 34°22,226'	170	Karia Ba Mohamed	
30	COLL12_53	W 05°12,638'	N 34°22,226'	170	Karia Ba Mohamed	
31	COLL12_54	W 05°03,762'	N 34°12,605'	391		
32	COLL12_55	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
33	COLL12_56	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
34	COLL12_57	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
N	N° de collecte	Longitude	Latitude	Altitude	Localité	Origine
35	COLL12_58	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
36	COLL12_59	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
37	COLL12_60	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
38	COLL12_61	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
39	COLL12_62	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
40	COLL12_63	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
41	COLL12_64	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
42	COLL12_65	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
43	COLL12_66	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
44	COLL12_67	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
45	COLL12_68	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
46	COLL12_69	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
47	COLL12_70	W 05°05,215'	N 34°03,156'	432	Sebt Loudaya	
48	COLL12_3	W 04°06,104'	N 34°12,721'	392	Après Bab Marzouka	
49	COLL12_4	W 04°00,811'	N 34°12,481'	589	Taza	
50	COLL12_7	W 04°39,673'	N 34°17,320'	490	El Bsabsa	
51	COLL12_13	W 34° 31,895'	N 04° 38,242'	567	Taounate	
52	COLL12_22	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	
53	COLL12_25	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	
54	COLL12_30	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	Hjaoua (près de Sidi Redouane)

55	COLL12_41	W 05°16,204'	N 35°09,906'	527	Chefchaoun	
56	COLL12_12	W 04°42,140'	N 34°26,932'	254	Ain Aicha	
57	COLL12_26	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	
58	COLL12_27	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	
59	COLL12_28	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	
60	COLL12_33	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	
61	COLL12_34	W 05°34,646'	N 34°48, 03'	269	Ouezzane	
62	COLL12_35	W 05°24,354'	N 35°01,734'	146	Souk el Had	
63	COLL12_44	W 05°30,633'	N 34°29,366'	66	Jorf El Malha	
64	COLL12_11	W 04°41,685'	N 34°18,487'	216		
65	COLL12_14	W 05°19,21	N 34°01,399'	311		
66	COLL12_15	W 05°21,276'	N 34°03,579'	249		
67	COLL12_6	W 04°32,064'	N 34°11,566'	406	Ain Gdeh	
68	COLL12_48	W 05°15,113'	N 34°28,49'	99	Rhouazi	

Annexe 3

Solutions nécessaires pour l'extraction

Solution stock de Tris-HCl:

Tris base (Amresco) 12.114 g
 Eau distillée Compléter jusqu'à 100 mL
 Ajuster le pH avec le HCl concentrée jusqu'à pH 8.

Solution stock de NaCl (5 M):

NaCl (Merck) 73.05 g
 Eau distillée Compléter jusqu'à 250 mL

Solution stock d'EDTA (0.5 M) (pH 8):

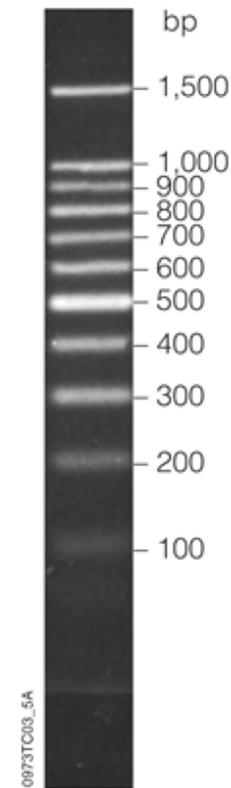
EDTA (Amresco) 18.6 g
 Eau distillée Compléter jusqu'à 100 mL
 Ajuster le pH avec les pelletes de NaOH jusqu'à pH 8.

Solution stock du tampon d'extraction 2x CTAB:

1 M Tris-HCl (pH 8)	5 mL	25 mL
5 M NaCl	14 mL	70 mL
0.5 M EDTA (pH 8)	2 mL	10 mL
CTAB (Amresco)	1 g	5 g

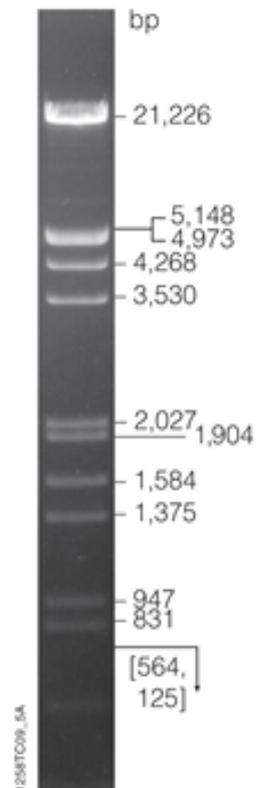
Annexe 4

Marqueurs de taille utilisés



2% agarose

Marqueur de taille
Bench Top 100 bp DNA Leader Cat. #
G8291 (Promega)



0.7% agarose

Marqueur de taille
Lambda DNA/EcoRI + HindIII Cat. #
G1731 (Promega)

Annexe 5

Solutions stock pour les gels

Tampon de migration 5 X TBE:

5 X TBE	Pour 1 L
Acide borique (Amresco)	27.5 g
Tris base (Sigma)	54 g
0.5 M EDTA (pH 8)	20 mL
Eau distillée	Compléter jusqu'à 1 L

Ajuster le pH avec l'acide borique jusqu'à pH 8.

Gel de 1.2% agarose:

Solution d'agarose	Pour 90 mL	Pour 300 mL
Agarose (Promega)	1.08 g	3.6 g
5 X TBE	18 mL	60 mL
Eau distillée	Compléter jusqu'à 90 mL	Compléter jusqu'à 300 mL

Préparation d'ammonium persulfate:

Solution d'ammonium persulfate (10 mL)	10%	25%
Ammonium persulfate (Pharmacia Biotech)	1 g	2.5 g
Eau distillée	10 mL	25 mL

Annexe 6

Solutions pour la coloration des gels

Solution de bromure d'éthidium (BET):

Solution dilué de Bromure d'éthidium	Pour 1 L
Bromure d'éthidium (10 mg/mL)	100 µL
Eau distillée	1 L

Annexe 7

Produits nécessaires pour PCR

Préparation de 2 mM dNTPs:

2 mM dNTPs	Pour 1000 μL
100 mM dATP (Promega)	20 μ L
100 mM dTTP (Promega)	20 μ L
100 mM dCTP (Promega)	20 μ L
100 mM dGTP (Promega)	20 μ L
Eau bi-distillée stérile	920 μ L

Préparation de l'amorce 10 pmol/ μ L:

Amorce F / R	Pour 500 μL
100 μ M Amorce Forward (Sigma)	50 μ L
100 μ M Amorce Reverse (Sigma)	50 μ L
Eau bi-distillée stérile	400 μ L

Annexe 8

Solutions stock pour la préparation des gels

Solution de 40% acrylamide:

Acrylamide (Promega)	19.33 g	96.65 g
Bis acrylamide ou N, N'-	0.67 g	3.35 g
Methylenebiacrylamide (Sigma)		
Eau distillée	50 mL	250 mL

Solution de 8% acrylamide natif:

40% Acrylamide natif	10 mL	50 mL
5 X TBE	10 mL	50 mL
Eau distillée	30 mL	150 mL

Solution de 6% acrylamide dénaturé:

20% Acrylamide	24 mL	75 mL
Urée (Amresco)	38 g	118.75 g
5 X TBE	8 mL	25 mL
Eau distillée	Compléter jusqu'à 80 mL	Compléter jusqu'à 250 mL

Préparation du gel 8% acrylamide natif:

8% Acrylamide	30 mL	60 mL
TEMED (Pharmacia Biotech)	15 µL	30 µL
25% Ammonium persulfate	75 µL	150 µL

Annexe 9

Solutions utilisées dans la coloration des gels

Préparation du bleu d'agarose:

1 M Tris-HCl (pH 8)	0.5 mL
0.5 M EDTA (pH 8)	0.1 mL
50% Glycérol (Acro Organics)	5 mL
Bleu de bromophénol	20 mg

Préparation du bleu d'acrylamide:

Formamide (Roche)	24.75 mL
Bleu de bromophénol	12.5 mg
Xylène cyanole (Sigma)	12.5 mg
Eau distillée	1.25 mL