

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale



N° d'ordre : 65/D3C/2016

N° de série : 06/ECO/2016

Thèse

Présentée en Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat 3ème cycle
Option « Biotechnologie et Génomique Végétales »

Thème

Production de génotypes mutants chez le blé dur (*Triticum durum*) : une source de variabilité génétique pour la tolérance à la sécheresse

Présentée par **Mme. LOUALI Yamouna**

Soutenu le : 01/12/2016

Devant le jury composé de :

Président :

Pr. Nadia Ykhlef

Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur :

Pr. Abdelhamid Djekoun

Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Examineurs :

Pr. Amar Benmahammed

Professeur Université Ferhat Abbas Sétif

Pr. Louhichi Brinis

Professeur Université Badji Mokhtar Annaba

Pr. Med. Abdelhafid Hamidechi

Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale



N° d'ordre : 65/D3C/2016

N° de série : 06/ECO/2016

Thèse

Présentée en Vue de l'Obtention du Diplôme de Doctorat 3ème cycle
Option « Biotechnologie et Génomique Végétales »

Thème

Production de génotypes mutants chez le blé dur (*Triticum durum*) : une source de variabilité génétique pour la tolérance à la sécheresse

Présentée par **Mme. LOUALI Yamouna**

Soutenu le : 01/12/2016

Devant le jury composé de :

Président :

Pr. Nadia Ykhlef

Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Rapporteur :

Pr. Abdelhamid Djekoun

Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Examineurs :

Pr. Amar Benmahammed

Professeur Université Ferhat Abbas Sétif

Pr. Louhichi Brinis

Professeur Université Badji Mokhtar Annaba

Pr. Med. Abdelhafid Hamidechi

Professeur Université des Frères Mentouri Constantine

Remerciements

Il y a un bon nombre de personnes que je remercierai pendant toutes ces années, bien du monde est passé de façon éphémère ou plus durable. Tous y ont laissé leurs empreintes. Quelques mots dans ma thèse, c'est encore très peu pour leur montrer toute ma gratitude.

Tout d'abord je remercie Dieu tout puissant, qui m'a donné la Santé, le courage et la patience de faire cette thèse, et surtout y arriver au bout. **HAMDOULILAH.**

Je remercie mon directeur de thèse le professeur **Djekoun Abdelhamid** qui a accepté de m'encadrer, malgré ses multiples charges, tout le long de ces années d'études. Je le remercie pour son aide, sa patience, ses conseils précieux qui ont conduit à l'achèvement de ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus profond respect et ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier le professeur **Ykhlef Nadia**, qui m'a fait l'honneur de présider le jury, qui nous a toujours soutenues par sa disponibilité et sa patience. Vous m'avez personnellement été d'une grande aide, vos conseils, votre présence, vos remarques. Merci pour tout Madame.

Je remercie les membres de jury **Pr. Brinis Louhichi, Pr. Benmahammed Amar, et Pr. Hamidechi Med. Abdelhafid**, Merci d'avoir pris le temps d'examiner et juger ce travail. Et merci pour votre déplacement.

Je tiens à remercier plus précisément **Mr Benbelkacem Abdelkader**, autant qu'ancien enseignant ainsi que pour tous ses conseils, son aide précieuse et l'intérêt qu'il a donné à nos projets de recherches.

Mr Belbkri Nadir, je tiens à vous remercier pour tout ce que vous avez fourni à cette équipe pendant ces années. Merci pour vos conseils, votre aide, vos remarques, et surtout votre soutien moral.

Ryma ohh ryma qu'est ce que je peux bien te dire, un GRAND merci, tu as été une amie, une prof, une informaticienne une ingénieure...et j'en passe...Ryma au secours, t'as toujours été là. Je tiens vraiment à te remercier pour tous ce que tu m'as apportés durant mes années de thèse.

Mr Bouzid charaf, je tiens vraiment à vous remercier pour l'aide que vous m'avez procuré pour les microsats, je sais que je vous ai cassé la tête avec mes mails, mais malgré vos responsabilités j'ai toujours eu une réponse immédiate. Vraiment Merci.

L'équipe COMENA, je tiens à remercier toutes l'équipe du Commissariat À L'énergie Atomique, directeurs, secrétaires, et ingénieurs pour leurs accueils, leurs gentillesse, et surtout leurs sérieux.

Radia je tiens à te remercier pour ta bonne humeur, pour les rires lors des pauses, tu as toujours su comment changer l'atmosphère au labo.

Chafika, la nouvelle recrue, je sais qu'on n'a pas travaillé ensemble, mais je tenais à te dire bienvenue au laboratoire.

Mr Kellou, Mme Rym, Mme Benamara, Mme Kacem, Mme bousbaa, Mr Karim, Mme fethia ; Mlle Maya je tiens à vous remercier, chacun d'entre vous m'a aidé à sa façon. Une petite question répondue, un problème posé réglé. Autant que membre de l'équipe, autant que mes anciens enseignants vous trouverez ici ma gratitude.

Adra, je te remercie pour tes cours en stat, en physio, je te remercie aussi pour le sourire que tu propage au laboratoire, en rentrant t'es la première que je veux voir pour

booster ma journée. Je te le dis toujours garde ce sourire, il fait des heureux (moi en premier).

Mahmoud je tiens à te remercier pour toutes les réponses à mes questions (et tu en as eu toujours)...comme on le dit toujours entre nous les doctorantes demandez à Mahmoud.

Zheira, Chorok, Amina, Soumia, Wassila, Meyou, durant toutes ces années on a passé des moments allant du pire au merveilleux ...On a rit, pleuré, piqué des crises, des fous rires...une multitude de sentiments...et surtout on a été patientes. Alors pour celles qui n'ont pas encore soutenues dites vous qu'il en reste pas beaucoup. Bon courage.

Un petit clin d'œil à **Seif, Fateh, Hichem** je vous souhaite bon courage pour votre thèse.

UN MERCI SPECIAL à mes amies **Karima, Meriem (Moon), Meriem(Chouchou)**, et **Narymen**. On a toujours été là pour se remonter le moral, changé d'atmosphère, décompressé quand il le faut. Merci aussi pour la lecture de ma thèse et les remarques pertinentes que vous me donniez. Moon j'ai beaucoup appris de tes remarques...je vous souhaite Bon courage pour la finalisation de votre thèse... Le bout de tunnel est presque.

Un clin d'œil à ma chérie **Sihem**, ma dentiste préférée. Cette thèse à surtout eu son effet sur mes dents, hein docteur ?!

Mes familles Louali et Mecheri surtout mes tantines **Salima, Nadira, Mebarka, Nora**. Chère cousine **Samia** merci tu as été la meilleure nourrisse, tu m'a beaucoup aidé en gardant mon petit ange.

Mes beaux parents **Benzitouni Moussa** et **hafiani nora**, je vous remercie, vous m'avez accueillis comme votre fille. Vous étiez à mes cotés lors de mes dernières années de thèse et vous avez compensés l'aide de mes parents.

Mes beaux frères **Mehdi, youcef**, mes belles sœurs, **Sara, Maya, mellissa**, je vous remercie pour votre présence à mes cotés.

Fifi, malouka, je vous remercie pour votre aide, pour votre patience je sais qu'il y a des moments où je vous ai énervé, pour les gardes de simo aussi, je vous adore mes petites sœurette.

Lamine mon frère chéri, merrrrrrrrrci, je n'oublierai jamais les journées de 35°C où tu aslavé les pots avec moi, les journées où tu m'as ramené des quintaux de terre, ayayay ça fait mal au dos. Tu as toujours été présent (sur le plan professionnel que personnel) et sans oublier les jours où tu es resté des heures à m'attendre le soir au laboratoire...Merci infiniment. Je souhaite que du sucées pour ta femme **sarsoura** que je remercie aussi pour son aide lors de la rédaction de mon article.

A ma petite nièce chérie **Miral**

A mon cher époux **Mahrez**, je te remercie pour tes encouragements, ton soutien inconditionnel et ta patience surtout. Notre couple a servi de socle solide à l'épanouissement de mon projet scientifique. Merci pour les va et viens, pour les centaines de pots que tu as lavé avec moi. Maintenant je te donne le feu vert pour jeter mon laptope à condition que tu m'en achète un nouveau.

Je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné mon chéri ma raison de vivre mon petit bout de chou qui a illuminé ma vie, mon bébé **Racim**.

Et comme on dit le meilleur pour la fin ...eh oui mes parents : **PAPA et Maman** mes remerciements ne peuvent suffire, je ferai toute une thèse pour citer ce que vous m'avez réalisé. **PAPA** tu étais toujours à mes cotés, tu as eu confiance en moi, tu m'as épaulé, aidé durant toute ma vie et ces années de doctorat spécialement. Je sais que tu pourras facilement présenter mon travail à ma place, même après mon mariage tu a toujours était présent. Je te remercie pour l'intérêt que tu as donné à mon travail. **MAMA** avec ta douceur ta présence tu m'as donné toujours envie de continuer, mes moments de faiblesse tu étais là pour m'encourager, et m'assister. Cette thèse est pour vous deux.

Oups j'allais l'oublier, celui qui ne m'a pas laisser une seconde, euh plutôt qui n'a pas laissé mon laptope une seconde le **FAMEUX virus électronique**, comment j'allais t'oublier alors que tu as toujours été présent et jusqu'à la dernière minute !!

Table des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction générale..... 1

Synthèse bibliographique

I. Production du blé..... 4

I.1. Production mondiale de blé 2015/2016..... 4

I.2. Production de blé en Algérie et importation..... 4

I.3. Importance du blé..... 5

II. Stress hydrique et les réponses de la plante..... 5

II.1. Réponses de la plante à la sécheresse : mécanismes d'adaptation..... 6

II.2. Impact des changements climatiques sur l'agriculture 11

III. Mutagenèse..... 12

III.1. Types de mutations 14

III.2. Induction des mutations 15

III.2.1. Méthodes physiques 16

III.2.2. Effet de la mutagenèse physique sur l'agriculture 16

III.2.3. Méthodes chimiques..... 18

III.2.4. Effet de la mutagenèse chimique sur la plante 20

III.3. Culture *in vitro* et mutagenèse 21

III.4. Différence entre transgénèse et mutagenèse 22

IV. Marqueurs moléculaires 24

IV.1. Différents marqueurs moléculaires..... 24

IV.2. Les microsatellites SSR..... 25

V. Objectif de la thèse	28
--------------------------------------	-----------

Matériels et méthodes

I. Expérimentation 1 : Mutagénèse physique.....	30
I.1. Matériel végétal.....	30
I.2. Conduite et organisation des essais	30
I.3. Protocole expérimental.....	30
I.4. Culture hydroponique.....	31
I.4.1. Pré germination.....	31
I.4.2. Mise en culture hydroponique	31
I.4.3. Mesures effectués	32
I.5. Culture sous serre	33
I.5.1. Préparation des pots et le semis	34
I.5.2. Induction du stress hydrique	34
I.5.3. Paramètres étudiés.....	34
I.6. Culture <i>in vitro</i>	36
I.6.1. Matériel végétal	36
I.6.2. Mise en Germination	36
I.6.3. Induction de callogénèse.....	36
I.6.4. Induction de la mutation par les rayons Gamma	37
I.6.5. Mesures étudiés	38
II. Expérimentation 2 : Mutagénèse chimique	39
II.1. Matériel végétal	39
II.2. Mutagénèse	39
II.3. Préparation des pots et semis	39
II.4. Paramètres étudiés.....	40
III. EXPERIMENTATION 3 : Détermination du profil protéique par SDS-PAGE	42
III.1. Induction du stress hydrique au PEG6000.....	42
III.2. Extraction des protéines totales	42

III.3. Dépôt des échantillons et migration	43
IV. EXPERIMENTATION 4 : Analyse moléculaire par les SSRs	44
IV.1. Semis des graines en chambre de culture	44
IV.2. Extraction d'ADN au CTAB	44
IV.3. Purification de l'ADN	45
IV.3.1. Dosage d'ADN sur gel d'agarose	45
IV.3.2. Dosage d'ADN par NANODROP	46
IV.4. Amplification PCR/SSR.....	47
IV.4.1. Choix des amorces	47
IV.4.2. L'électrophorèse de l'amplification de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)	51
Résultats et discussion	
Mutagenèse physique	53
I. Effet de l'irradiation Gamma sur des graines de blé dur en culture hydroponique.....	53
I.1. Effet des rayons Gamma sur les paramètres morphologiques de la plante	53
I.2. Effet des rayons Gamma sur les paramètres cytogénétiques de la plante	62
I.3. Effet des rayons Gamma sur la teneur en chlorophylle.....	63
II. Effet du stress hydrique sur des graines de blé dur irradiées par des rayons Gamma en culture sous serre	69
II.1. Effet des rayons Gamma et du stress hydrique sur la germination et les paramètres physiologique de la plante.....	69
II.2. Effet du stress hydrique sur les plantes mutées par les rayons gamma sur les paramètres biochimiques	75
III. Effet de l'irradiation Gamma sur des cals embryogénique <i>in vitro</i>.....	81
III.1. Pourcentage de callogénèse.....	81
III.2. Effet de différentes expositions de l'irradiation gamma sur la prolifération des cals.	82
Mutagenèse chimique.....	84
I. Effets de l'EMS sur la germination, le rendement et ses composantes	84
II. Analyse statistique des données	89

Analyse des protéines foliaire par SDS-PAGE	91
I. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE des mutant Gamma.....	91
II. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE des mutant EMS	93
Etude du polymorphisme par les microsatellites	96
I. Résultats d'extraction d'ADN	96
II. Résultats d'amplification par PCR-SSR.....	97
Conclusion générale et perspectives	104
Valorisation scientifique.....	107
Références bibliographiques.....	110
Annexes.....	127

Liste des figures

Figure 1 : Les voies de signalisations impliquées dans les réponses à différents stress dont la sécheresse (F. Tardieu <i>et al.</i> , 2000).....	11
Figure 2: Les variétés de plantes dérivés des mutations a) le nombre de variétés mutantes dans différent continents, b) la proportion de différentes plante types. Source: FAO/IAEA Database of mutant varieties and genetic stock, http://mvgs.iaea.org , 17 November, 2008.....	14
Figure 3 : la mutagenèse par l'ethyl méthansulfonate.....	20
Figure 4 : Schéma représentant les diverses étapes de la réaction en chaine de polymérisation de l'ADN (PCR) (Moulet <i>et al.</i> , 2008)	27
Figure 5: Exemple d'un marqueur de type microsatellite SSR (Moulet <i>et al.</i> , 2008).....	27
Figure 6 : Culture hydroponique après une semaine de la variété Djenahkhotifa.....	31
Figure 7 : Induction des cals à partir d'embryons matures	37
Figure 8: Descals de Djenah khotifa après six jours de culture	37
Figure 9 : (1) Des cals de waha après irradiation, (2) waha après un mois d'irradiation, (3) Gta/dur après trois mois de callogenèse par observation microscopique (3) , (4) Djenah khotifa après trois mois de callogenèse, (5) Gta/dur par observation microscopique après deux mois et demi de callogenèse .	38
Figure 10 : Semis des graines mutés avec l'EMS sous serre	40
Figure 11 : La carte génétique des différents marqueurs microsatellites (wmc 134, barc8, wmc322, wmc246, wmc24, wms6) et les loci voisins (http://wheat.pw.usda.gov/).	48
Figure 12 : La carte génétique des différents marqueurs microsatellites (wmc124, wms497, wmc177, wmc 131) et les loci voisins (http://wheat.pw.usda.gov/).	49
Figure 13 : Germination des graines de Gta/dur après 5 jours dans l'étuve.....	53
Figure 14 : Capacité de germination enregistrée chez les génotypes Gta/dur, BM, DK, traités avec les rayonnements Gamma.....	53
Figure15: Vitesse de germination enregistrée chez les génotypes Gta/dur, BM, DK, traités avec les rayonnements Gamma.....	54
Figure 16: Capacité de germination enregistrée chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	54
Figure 17: Vitesse de germination enregistrée chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	55
Figure 18: Longueurs des racines enregistrées chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	55
Figure 19 : Longueurs des racines de la variété Djenahkhotifa, et Gta/dur	56
Figure 20: Longueurs des feuilles de la variété Djenah khotifa et Gta/dur.....	56
Figure 21: Longueurs des racines enregistrées chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	57

Figure 22: Poids frais des feuilles enregistré chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	57
Figure 23: Poids frais des feuilles enregistré chez les géotypes Waha, GGR, M, traités avec les rayonnements Gamma.....	58
Figure 24: Poids secs des feuilles enregistré chez les géotypes Gta/dur ; BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	58
Figure 25: Poids secs des feuilles enregistré chez les géotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	58
Figure 26: Poids frais des racines enregistré chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	59
Figure 27: Poids frais des racines enregistré chez les Waha, GGR ; M traités avec les rayonnements Gamma.....	59
Figure 28: Poids secs des racines enregistré chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	59
Figure 29: Poids secs des racines enregistré chez les géotypes Waha, GGR,M traités avec les rayonnements Gamma.....	60
Figure 30: Volume racinaire enregistré chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	60
Figure 31: Volume racinaire enregistré chez les géotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	60
Figure 32: Indice mitotique enregistré chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	62
Figure 33: Indice mitotique enregistré chez les géotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	62
Figure 34: Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de chlorophylle (a) et (b) des variétés de blé dur Gta/dur, BM, DK.....	64
Figure 35 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de chlorophylle totale des variétés de blé dur Waha , GGR,M.....	64
Figure 36 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de chlorophylle (a) des variétés Gta/dur, BM, DK de blé dur.....	65
Figure 37 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de la chlorophylle (a) des variétés de blé dur Waha , GGR,M.....	65
Figure 38 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de la chlorophylle (b) des variétés de blé dur Gta/dur, BM, DK.....	65
Figure 39 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de la chlorophylle (b) des variétés de blé dur Waha , GGR,M.....	66

Figure 40 : La teneur relative en eau enregistrées chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	69
Figure 41 : La teneur relative en eau enregistrées chez les géotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	70
Figure 42 : La teneur en chlorophylle enregistrées chez les géotypes Gta/dur, BM, et DK traités avec les rayonnements Gamma	72
Figure 43 : La teneur en chlorophylle enregistrées chez les géotypes Waha, GGR et M traités avec les rayonnements Gamma.....	74
Figure 44 : le potentiel osmotique enregistrés chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	75
Figure 45 : Le potentiel osmotique enregistré chez les géotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	77
Figure 46 : La température foliaire enregistrées chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.....	78
Figure 47 :Les températures foliaires enregistrées chez les géotypes W, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.....	79
Figure 48 : Pourcentage de callogenèse des trois variétés BM, DK,Gta/dur	81
Figure 49 : poids frais des cals après irradiation au rayonnement Gamma.....	82
Figure 50 : (1) cals après irradiation par les rayons Gamma au microscope, (2) brunissements des cals après irradiations	83
Figure 51 : Capacité de germination enregistrées chez les géotypes Waha, Gta/dur, et Djenah khotifa traité avec l'EMS.....	84
Figure 52 : longueurs des tiges enregistrées chez les géotypes Waha , Gta/dur, Djenah khotifa traité avec l'EMS.....	85
Figure 53 : Nombre d'épis enregistrés chez les géotypes Waha , Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS	86
Figure 54 : nombre de grain/épis enregistrés chez les géotypes Waha , Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS.....	86
Figure 55 : Poids de 100 graines enregistrés chez les géotypes Waha, Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS.....	87
Figure 56 : Rendement en grains enregistrés chez les géotypes Waha, Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS.....	87
Figure 57 : Profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par 1D SDS PAGE variété GTA/dur (1-T ;2-M100Gy, 3-M180Gy, 4-M220Gy) et BM (1-T, 2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy). 91	
Figure 58 : profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par sds page variété DK (1-T, 2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy) et Waha (1-T, 2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy).....	91

Figure 59 : profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par sds page variété GGR(1-T ;2-M100Gy, 3-M180Gy, 4-M220Gy) et M (1-T ;2-M100Gy, 3-M180Gy, 4-M220Gy).....	91
Figure 60 : profil électrophorétique montrant les différences entre les contrôles et les mutées aux rayonnements Gamma.....	92
Figure 61 : profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par sds page variété wahaM1(1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et GTA M1 (5-T ;6-M0.24 %, 7-M0.5%, 8-M0.7%).....	93
Figure 62 : profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par sds page variété DK M1(1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et WAHA M2 (5-T ;6-M0.24 %, 7-M0.5%, 8-M0.7%).....	94
Figure 63 : profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par sds page variété GTA M2(1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et DK M2 (1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%)	94
Figure 64 : profil électrophorétique montrant les différences entre les contrôles et les mutées à l'EMS	95
Figure 65 : Qualité de l'adn des mutant Gamma GTA/DUR (1-T ;2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy) , BM (5-T ;6-M10Gy, 7-M25Gy, 8-M50Gy), DK(9-T ;10-M10Gy, 11-M25Gy, 12-M50Gy) , WAHA(13-T ;14-M100Gy, 15-M180Gy, 16-M220Gy) GGR(17-T ;18-M100Gy, 19-M180Gy, 20-M220Gy), M(21-T ;22-M100Gy, 23-M180Gy, 24-M220Gy)	96
Figure 66 : Qualité de l'adn des mutant EMS Waha M1 (1-T ;2-M0.24%, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et GTA/DUR M1(5-T ;6-M0.24%, 7-M0.5%, 8-M0.7%) DK M1(9-T ;10-M0.24%, 11-M0.5%, 12-M0.7%) et WAHA M2(13-T ;14-M0.24%, 15-M0.5%, 16-M0.7%) GTA/DUR M2(17-T ;18-M0.24%, 19-M0.5%, 20-M0.7%) et DKM2 (21-T ;22-M0.24%, 23-M0.5%, 24-M0.7%)	96
Figure 67 : Profil électrophorétique sur gel d'acrylamide des échantillons mutés avec les rayons Gamma amplifiés avec l'amorce wms 497 (a) et l'amorce X1 (b)	99
Figure 68 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec les rayons GAMMA amplifiés avec l'amorce wmc134.....	102
Figure 69 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec GAMMA amplifiés avec l'amorce wms6	102
Figure 70 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec les rayons GAMMA amplifiés avec l'amorce wms124	102
Figure 71 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec les rayons GAMMA amplifiés avec l'amorce wms497	102
Figure 72 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec l'EMS amplifiés avec l'amorce wmc134	103
Figure 73 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec l'EMS amplifiés avec l'amorce wms124	103
Figure 74 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec l'EMS amplifiés avec l'amorce wms177	103

Liste des tableaux

Tableau 1 : Différences entre mutagénèse et transgénèse (Mohan J. <i>et al.</i> , 2010)	23
Tableau 2: Comparaison des marqueurs moléculaires les plus utilisés chez les céréales (Viktor Korzun, 2002).....	25
Tableau 3 : Origine des différentes variétés.....	30
Tableau 4: Composition du milieu de culture KNOPS(EI-Hamdouni <i>et al.</i> , 2000).....	32
Tableau 5: Programme PCR-SSR.....	50
Tableau 6 : Les séquences des marqueurs, leurs températures ainsi que leurs chromosomes	50
Tableau 7 : Effets des rayons Gamma (10, 25, 50Gy), sur le taux de germination, la longueur des racines, le poids frais et secs des racines et des feuilles, le volume racinaire, et l'indice mitotique des trois variétés Gta/dur ; benimestina et djnah khotifa.....	67
Tableau 8 : Effets des rayons gamma (100, 180, 220Gy), sur le taux de germination, la longueur des racines, le poids frais et secs des racines et des feuilles, le volume racinaire, et l'indice mitotique des trois variétés Waha, GoumghoumRkham et Mridj.....	68
Tableau 9 : L'effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur la teneur relative en eau des variétés de blé dur.....	70
Tableau 10: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur la teneur relative en eau des variétés de blé dur.....	71
Tableau 11: L'effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur la teneur en chlorophylle des variétés de blé dur.....	73
Tableau 12: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur la teneur en chlorophylle des variétés de blé dur.....	73
Tableau 13 : L'effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur le potentiel osmotique des variétés de blé dur.....	76
Tableau 14: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur le potentiel osmotique des variétés de blé dur.....	77
Tableau 15 : L'effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur la température foliaire des variétés de blé dur.....	79
Tableau 16: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur la température foliaire des variétés de blé dur.....	80
Tableau 17: l'effet de la concentration EMS sur la germination des variétés de blé dur.....	89
Tableau 18: l'effet de la concentration EMS sur la longueurs de la tige des variétés de blé dur.....	89
Tableau 19: l'effet de la concentration EMS sur le nombre d'épi par pots des variétés de blé dur	89
Tableau 20: l'effet de la concentration EMS sur le nombre de grains par épis des variétés de blé dur.....	90
Tableau 21: l'effet de la concentration EMS sur le poids de 100 grains des variétés de blé dur.....	90
Tableau 22: l'effet de la concentration EMS sur le rendement en grains des variétés de blé dur.....	90

Tableau 23 : Les marqueurs SSR, le nombre total d'allèles, le nombre d'allèles polymorphes, et le pourcentage du polymorphisme des 18 mutants ainsi que le contrôle de 6 variétés des mutants Gamma et 3 variétés des mutants EMS..... 101

Liste des Abréviations

ABA : abscissic acid
ABRE : ABA Responsive Elements
ADNT: ADN de transfert
ADN: acide désoxyribonucléique
AREB: ABA Responsive Element Binding proteins,
ARN: acide ribonucléique
ARNm: acide ribonucléique messenger
Ca: chlorophylle a
Cb: chlorophylle b
Cic : Conseil international des céréales
Cnis : Conseil national de l'information statistique
CTAB : Cetyl triméthylammonium
DES : Diethyl sulphate
DREB : DRE-Binding proteins
EI : éthylène imine
EMS : éthyl méthanesulfonate
ENU: Ethylnitrosourea
FAO: Food and Agriculture Organization
CG: Capacité de germination
Gy: Gray
IAEA: International Atomic Energy Agency
ITGC : Institut Technique des Grandes Cultures
MSE : Méthane sulphonate d'éthyl
NMIJ : Nitroso méthyl uréa
OAIC : Office Algérien Interprofessionnel des Céréales
OGM: Organisme génétiquement modifié
PEG 6000: Polyéthylène glycol
PF : Poids frais
PO : Potentiel osmotique
PS : Poids secs
PSII : Photosystème II
PT: Poids de turgescence
S: Speed of germination
SAM : Sélection assistées par marqueur moléculaire
SDS PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SNP: Single nucleotide polymorphisme
SSR: Single sequence repeats
TCT: taux de chlorophylle totale
TILLING: Targeting Induced Local Lesions in Genomes
TRE : Teneur relative en eau
UVB: Ultraviolet B

Résumé

Production de génotypes mutants chez le blé dur (*Triticum durum*) : une source de variabilité génétique pour la tolérance à la sécheresse.

L'exploitation de la diversité génétique naturelle et induite est la condition de base pour l'amélioration de la plante dans le développement de variétés avec des caractères souhaités. A cet effet l'application de la mutagenèse physique et chimique a été établie. Quatre expérimentations ont été faites :

la première concernant la mutation physique par les rayons Gamma sur six variétés, Une étude en culture hydroponique a été faite pour déterminer les effets de l'irradiation Gamma sur Des paramètres physiologiques et morphologiques des plantes ; Le pourcentage de germination augmente chez les plantules irradiées avec la dose 25Gy et 100Gy comparé au contrôle non irradié dans le milieu Knops, ces mêmes doses ont amélioré la longueur des feuilles et racines, le volume racinaire et le poids frais et secs.

Un autre essai sous serre qui a fait l'objet d'une étude du comportement des variétés de blé dur suite à un stress hydrique induit à la 4ème feuille, nous a permis de trouver quelques mutants qui répondent mieux à ce stress par rapport au contrôle, pour la variété Waha mutée avec les rayonnement Gamma pour la dose 180Gy, la variété GGR mutée par la dose 220Gy, et la variété GTA/dur traitée avec la dose 50Gy. Ces nouvelles populations ont eu la possibilité de bien répondre au manque d'eau, leur adaptation à ce stress a été relevée suite à l'étude du taux de la Chlorophylle, la Température foliaire, la Teneur relative en eau et le potentiel osmotique.

Un troisième essai *in vitro* a été mené à fin d'observer les variations induites par les rayons Gamma sur des cals de trois variétés de blé dur Waha, Gta/dur et Benimestina. Après l'irradiation, les cals ont présenté des brunissements dus à un stress oxydatif.

Une seconde expérimentation visant à étudier les effets de la mutation chimique par l'EMS sur trois variétés de blé dur par l'étude du rendement en grain et ses composantes. Ainsi que la collection de la M2 pour l'étude moléculaire.

Une troisième expérimentation a été faite pour la détermination du taux des protéines totales des feuilles pour tous les échantillons irradiés M1 et mutés avec l'EMS M1 et M2 par SDS-PAGE. Les différences observées concernant les bandes protéiques révélées, se traduisent en termes de poids moléculaire et d'intensité.

Une quatrième visant à analyser les variations dues à la mutation : L'analyse moléculaire par les microsatellites SSR faite avec 12 Amorces a révélé un polymorphisme par l'absence et la présence de nouvelles bandes entre les contrôles et les variétés traitées. Ces 48 échantillons d'ADN ont été amplifiés par la majorité des amorces sauf pour BARC8 et WMC322 où il n'y a pas eu d'amplification. Concernant les mutants Gamma : parmi les 12 marqueurs, 7 sont polymorphes (84%) et pour le cas d'EMS : parmi les 12 amorces, 6 sont polymorphes (50%).

Cette étude a montré que la mutagenèse aléatoire provoque des modifications dans le génome qui peuvent avoir un effet défavorable, comme elles peuvent augmenter la croissance des plantes et leur développement, cela dépend de la variété et de la dose ou la concentration.

Mots clés : blé dur, mutagenèse, EMS, irradiation gamma, SSR, Stress hydrique

Abstract

Production of mutant genotypes in durum wheat (*Triticum durum*): A source of genetic variability for drought tolerance.

The exploitation of natural and induced genetic diversity is the basic condition for the improvement of the plant in the development of varieties with desired traits. For this purpose the application of physical and chemical mutagenesis has been established. Four experiments were done:

The first one for the physical mutation by gamma rays in six varieties, an hydroponic culture study was conducted to determine the effects of Gamma irradiation physiological and morphological parameters of the plant, The germination percentage increases in seedlings irradiated with 25Gy dose and 100Gy compared to non-irradiated control in the middle Knops, these same doses improved the length of the leaves and roots, root volume and the fresh and dry weight.

Another test in greenhouse that was the subject of a study of the behavior of durum wheat varieties due to water stress induced in the 4th sheet, allowed us to find some mutants that respond better to stress compared to control, for Waha variety mutated with Gamma radiation dose for 180Gy, variety GGR mutated by 220Gy dose, and variety GTA / dur treated with 50GY dose. These new populations were able to respond well to water stress, their adaptation to this stress was relieved following the study of the rate of chlorophyll, leaf temperature, relative water content and osmotic potential.

A third in vitro test was conducted at the end of observing the variations induced by gamma rays on callus of three varieties of durum wheat Waha, Gta / dur and Benimestina. After irradiation, the callus showed browning due to oxidative stress.

A second experiment to study the effects of chemical mutation by EMS on three varieties of durum wheat, by studying grain yield and its components. And the collection of the M2 for molecular study.

A third experiment was made to determine the total protein levels of leaves for all the irradiated samples M1 and mutated with EMS M1 and M2 by SDS-PAGE . The observed differences revealed protein bands, result in molecular weight and intensity.

A fourth to analyze the variations due to the mutations: Molecular analysis by SSR microsatellite made with 12 primers revealed polymorphism by the absence and presence of new bands between treated and control varieties. These 48 DNA samples were amplified by the majority of the primers except for BARC8 and WMC322 where there was no amplification. Regarding Gamma mutants: among the 12 markers, 7 are polymorphic (84%) and for the case of EMS among the 12 primers, 6 are polymorphic (50%).

This study showed that random mutagenesis causes changes in the genome that may have an adverse effect, it can also increase plant growth and development, it depends on the variety and dose or concentration.

Key words: durum wheat, mutagenesis, EMS, Gamma irradiation, SSR, Water stress

ملخص

إنتاج الانماط الوراثية الطافرة في القمح القاسي (الحنطة القاسي): مصدر التباين الجيني لتحمل الجفاف

استغلال التنوع الجيني الطبيعي والذي يسببه الانسان هو شرط أساسي لتحسين النبات في استنباط أصناف مع الصفات المطلوبة. لهذا الغرض تم تطبيق الطفرات الفيزيائية والكيميائية. وقدمت أربع تجارب

أول تجربة متعلقة بالطفرة الفيزيائية بواسطة أشعة جاما على ستة أصناف من القمح القاسي، أجريت دراسة في المختبر لتحديد آثار أشعة جاما على معايير فسيولوجية ومورفولوجية للنباتات. ارتفعت نسبة الإنبات في البذور المشعة بالجرعات Gy25 و Gy100 مقارنة مع الشاهد غير المشع في وسط Knops و هذه الجرعات نفسها تحسن طول الأوراق والجذور، حجم الجذور و الأوزان الرطبة والجافة.

دراسة أخرى في البيوت المحمية حيث كان موضوعا لدراسة سلوك أصناف القمح القاسي بسبب الإجهاد المائي في الورقة الرابعة، سمح لنا أن نجد بعض الطفرات التي تستجيب بشكل أفضل للإجهاد مقارنة مع الشاهد. الواحة المتحورة بجرعة إشعاع جاما Gy 180 ، GGR المتحورة بجرعة Gy220 ، و GTA بجرعة Gy50 . وكانت هؤلاء الأصناف الجديدة قادرة على التصدي لنقص المياه ، و زيادة كیفهم مع هذه الضغوط بعد دراسة قياس نسبة الكلوروفيل، ودرجة حرارة الورقة، المحتوى النسبي للمياه، والإمكانية الأسموزية.

أجريت دراسة ثالثة في المختبر لمراقبة التغيرات الناجمة عن أشعة جاما على كالس ثلاثة أصناف القمح القاسي الواحة جتا/صلب و بن مستينا . بعد التشعيع ظهر اسمرارالكالس بسبب الإجهاد التأكسدي

و التجربة الثانية لدراسة آثار الطفرات الكيميائية عن طريق EMS ثلاثة أصناف القمح القاسي من خلال دراسة محصول الحبوب ومكوناته . و جمع M2 للدراسة الجزيئية .

التجربة الثالثة تم تحليل البروتينات الكلية بتقنية الهجرة SDS-PAGE لأوراق جميع العينات المشعة و الغير المشعة . الفروق الملحوظة للبروتينات ، تنتج في الوزن الجزيئي و الشدة

التجربة الرابعة لتحليل الاختلافات بسبب الطفرة : التحليل الجزيئي بالصغرية س.س.ر المصنوع من اثني عشر فتلة كشفت عن وجود تعدد الأشكال بغياب عصابات ووجود جديدة بين الأصناف المعالجة والشاهد. وتضخمت هذه 48 عينة من الحمض النووي من قبل الغالبية العظمى من الفتلات باستثناء BARC8 WMC322 و حيث لم يكن هناك التضخيم. وفيما يتعلق المسوخ جاما : بين 12 فتلة ، 7 هي متعددة الأشكال (84 %) و بالنسبة لحالة EMS بين 12 فتلة ، 6 هي متعددة الأشكال (50 %) .

وأظهرت هذه الدراسة أن الطفرات العشوائية تتسبب في إحداث تغييرات في الخريطة الوراثية التي قد يكون لها تأثير سلبي ، كما يمكن أن يكون لها تأثيراجابي وذلك بزيادة نمو و تطورالنبات ، وهذا يعتمد على مجموعة متنوعة والجرعة أو التركيز.

كلمات البحث: القمح القاسي، الطفرات، أشعة جاما، الواسمات الجزيئية، الإجهاد المائي

Introduction

Introduction générale

Les céréales constituent une part importante des ressources alimentaires de l'homme et de l'animal, parmi ces céréales le blé qui est une culture importante dans le monde en termes de superficie cultivée contribuant à l'approvisionnement alimentaire mondial ainsi que l'assurance d'une sécurité économique. Le blé est l'une des principales cultures consommées par les humains et il est cultivé dans des environnements différents; malheureusement sa productivité végétale et la croissance des plantes sont sérieusement limitées par les contraintes environnementales. Son rendement est fortement confronté à ces contraintes, dont la sécheresse, où près d'un tiers des terres arables au niveau mondial souffrent de ce déficit en eau. Dans la plupart des régions du monde, les rendements céréaliers sont périodiquement affectés par des stress hydriques. Pour cette cause, un nombre de questions est à poser:

- Comment développer des plantes résistantes à la sécheresse qui permettraient de résoudre -pour partie- les problèmes d'autosuffisance alimentaire ?
- Comment utiliser et caractériser les ressources génétiques qui restent la clé de voûte des programmes d'amélioration des plantes ? ,
- Quelles seraient les approches à utiliser pour avoir une nouvelle variété plus développée et résistante au déficit hydrique ?

Souvent, l'amélioration génétique d'une espèce, telle que le blé dur, repose en grande partie sur l'apport continu, la gestion et l'exploitation de la variabilité qu'elle présente, mais cette variabilité peut être restreinte, voire absente pour certains caractères (Ykhlef *et al.*, 2007). Le choix d'une technologie de création d'un matériel végétal tolérant aux contraintes biotique et abiotique, notamment à la sécheresse, permettrait d'étendre les aires de cultures et d'assurer une meilleure suffisance alimentaire

De nouvelles sources de tolérance à la sécheresse viendront compléter les efforts en cours pour augmenter le rendement dans des conditions limitées d'eau. L'amélioration génétique de la tolérance à la sécheresse devrait se concevoir selon une stratégie de façon à utiliser de nouvelles approches de sélection basées sur des outils non conventionnels, on a recours aux biotechnologies pour remédier aux problèmes qui surviennent.

Cette étude consiste à répondre à ces questions en utilisant de nouvelles approches de sélection basées sur des outils non conventionnels tels que : les mutations induites qui ont pour but : gain du temps ainsi la précision de la sélection.

Les mutations induites sont provoquées par l'action d'agents mutagènes ou d'éléments d'ADN transposables afin de créer et d'augmenter la variabilité au sein d'une population. D'une façon générale, les mutations entraînent des modifications dans n'importe quelle région de l'ADN. Ces modifications se caractérisent soit par des gains ou des pertes de fonction. L'exploitation des mutants permet de localiser et d'identifier des gènes affectés et de déterminer leurs fonctions biologique (**Meunier, 2005**)

L'objectif est d'induire une mutation désirée à un nombre maximal comportant le minimum de dommages physiologiques et génétiques pour le blé dur, afin d'obtenir une variété améliorée dans des délais courts. L'obtention et l'exploitation de cette diversité biologique nécessite parfois de longues années d'épreuves. L'induction des mutations par des méthodes physiques ou chimiques constitue un raccourci pour l'obtention de la diversité biologique souhaitée par les sélectionneurs.

Après le criblage physiologique et morphologique ; l'étude moléculaire des mutants à été faite par les Marqueurs microsatellites qui sont largement utilisés pour évaluer la diversité génétique dans des populations naturel ou populations expérimentales. Leur haut degré de polymorphisme reflète leurs haut taux de mutations. Les estimations des taux de mutation sont donc nécessaires lors de la caractérisation de la diversité dans les populations. Pour cette raison qu'ils ont été utilisés dans notre travail, a fin d'étudier les variations génétiques induite par les rayons Gamma et l'EMS, ils vont ainsi contribuer à l'évaluation des altérations d'ADN causés par les mutations.

Cette thèse est structurée comme suit :

Un premier chapitre dans lequel nous effectuons une synthèse bibliographique tout en mettant l'accent sur la présentation des blés et leurs importance et du stress hydrique qui affecte la production du blé, ainsi que la mutagénèse et son induction sur les plantes a fin d'avoir une nouvelle variété. Et on va mettre en évidence l'apport de l'analyse moléculaire par les marqueurs microsatellite SSR à l'étude du polymorphisme trouvé.

Introduction Générale

Un deuxième chapitre comportant le matériel végétal et toutes les méthodes expérimentales qui lui ont été appliquées.

Un troisième chapitre dans lequel nous exposerons les résultats obtenus, tout en discutant ces résultats avant de conclure et dégager les perspectives possibles.

Synthèse

bibliographique

I. Production du blé

La culture du blé a été un élément fondateur des premières civilisations humaines (INRA, 2005). En plus de son intérêt comme une des principales céréales apportant l'énergie dans l'alimentation, le blé est aussi "la première source de protéines dans les pays en voie de développement".

Les réserves mondiales de blé sont en nette diminution (FAO, 1997). Par conséquent, il est important d'améliorer la rusticité et la qualité nutritionnelle du blé et cela dans une perspective d'agriculture durable, plus économe en intrant et plus respectueuse de l'environnement. (Zahid H. 2007)

En effet une production insuffisante pour couvrir les besoins du marché national et alimenter les stocks pousse à faire un recours systématique aux importations (FAO, 2007).

Cette faiblesse de la production de blé en Algérie était toujours liée aux effets du stress hydrique qui se fait ressentir de manière très importante depuis la dernière décennie (Chaise *et al.*, 2005).

I.1. Production mondiale de blé 2015/2016

Après une année 2014 de tous les records sur les cinq continents de la planète, aucun d'eux n'échapperait à une diminution de sa production durant la prochaine campagne. Attendue à 92 Mt, la récolte insuffisante de l'Inde pourrait même contraindre le pays à importer plusieurs millions de tonnes de blé pour satisfaire sa demande domestique. En Europe, la France, l'Italie et l'Espagne se démarquent de leurs voisins avec des prévisions très prometteuses. (Frédéric H, 2015)

Confrontée à une saison céréalière frappée de crispation au même titre que l'année précédente (2015), l'Algérie réinvestit désormais le marché international pour assurer l'approvisionnement et l'équilibre du marché local.

I.2. Production de blé en Algérie et importation

Les importations algériennes de céréales (blé, maïs, orge) ont atteint 1,89 milliard de dollars au 1^{er} semestre 2015, contre près de 1,77 milliard à la même période de 2014, soit une hausse de 7,3%, selon les Douanes. En 2014, l'Algérie avait importé

pour 3,54 milliards de dollars de céréales, en hausse de 12% par rapport à 2013 (Anonyme, 2015).

L'appel d'offre lancé par l'OAIC intervient toutefois dans un contexte marqué par une relative stabilité des cours du blé sur les principales places boursières mondiales avec des cours qui oscillent entre 180 et 200 dollars/tonne. Durant le premier trimestre de l'année en cours, l'Algérie a importé pour plus de 35 millions de quintaux de céréales pour une valeur de 940 millions de dollars selon le centre de l'informatique et des statistiques de Douane, (Cnis). Avec des prévisions de production au niveau national moins favorables, compte tenu des conditions climatiques marquées par une sécheresse qui s'est prolongée durant les mois d'avril et mai, l'ancien ministre de l'Agriculture, Abdelwahab Nourri a avoué le 14 mai 2015 que la production nationale pour la campagne en cours ne saurait dépasser le niveau enregistré en 2014, lorsque la production a baissé de plus de 30% pour s'établir à 34 millions de quintaux seulement. (Mourad A., 2015)

I.3. Importance du blé

Le blé est la source de protéines la plus importante au monde et la deuxième source de calories après le riz. D'ici 2050, une augmentation de 60 % de la production mondiale de blé sera nécessaire pour répondre à la demande d'une population croissante. Les actions prioritaires à engager pour relever ce défi viennent d'être présentées par la Wheat Initiative,

II. Stress hydrique et les réponses de la plante

Il existe de nombreuses définitions du terme 'sécheresse'. Tout d'abord, elle se réfère toujours à un déficit de pluviométrie et l'on parle de sécheresse au sens météorologique. Actuellement, cette caractérisation météorologique de la sécheresse est essentiellement limitée à la durée des périodes sans pluie (nombre de jours consécutifs sans pluie). Lorsque ce déficit de pluviométrie est systématique sur une région donnée, cette région devient une zone aride. Dans ce contexte, une plante tolérante à la sécheresse est une plante qui survit à des situations de contrainte hydrique sévère. Hors de ces régions, la sécheresse peut être considérée comme un phénomène climatique aléatoire qui se caractérise davantage par une déviation par rapport à une valeur moyenne de pluviométrie. Dans ce contexte, et pour un agronome, une sécheresse se définit par tout manque d'eau qui ne permet pas aux plantes cultivées d'exprimer le rendement qui serait attendu en situation favorable, ou qui peut

affecter la qualité des produits récoltés. Une plante tolérante est dans ce cas, celle qui permet d'atteindre une production aussi élevée que possible dans un scénario donné de sécheresse. **(Philippe G., 2008)**

La sécheresse risque d'être une des conséquences majeures du changement climatique pour une grande partie de la planète, qu'il s'agisse des tropiques ou des régions tempérées d'Europe ou d'Amérique du Nord. Mais la sécheresse est aussi la contrainte la plus lourde de conséquences à laquelle se heurtent chaque année la plupart des agriculteurs du monde **(Syed S. 2006, Motoaki S. et al., 2001)**

Depuis qu'il s'est lancé dans l'agriculture, l'homme sait combien l'eau est la condition de la croissance des plantes, et donc de la production agricole. **(Syed S. 2006)**, Il existe plusieurs façons de faire face à la sécheresse.

La conséquence majeure du changement climatique pour les agricultures tropicales et méditerranéennes sera l'accroissement des risques de sécheresse. L'existence d'un réchauffement climatique (augmentation de la température moyenne de surface de la Terre) est quasi générale. Ses effets sur l'agriculture sont déjà observables : avancement avéré des dates de floraison en verger, de vendange, de moisson **(Gaufichon, L et al., 2010)** Cette augmentation des températures a des effets directs sur la demande en eau (augmentation de la demande évaporative par accroissement du déficit de saturation de l'air), et des effets indirects par des impacts sur le cycle de développement des cultures (allongement de la période de végétation d'espèces pérennes et raccourcissement du cycle d'espèces annuelle **(Amigues et al., 2006)**).

II.1. Réponses de la plante à la sécheresse : mécanismes d'adaptation

Des génotypes soumis aux mêmes contraintes hydriques ne perçoivent pas de la même façon ces contraintes. Des mécanismes très variés, résumés par **Tardieu et al., (2007)** entrent en jeu à des pas de temps différents. De plus, une importante variabilité génotypique est associée à ces mécanismes chez la plupart des espèces cultivées.

La compréhension des mécanismes d'adaptation à une alimentation en eau déficitaire est nécessaire pour orienter la recherche d'espèces ou de variétés cultivées moins exigeantes en eau et pour piloter l'irrigation de la façon la plus économe possible **(Chaves et al., 2009)**

En physiologie végétale, la résistance des plantes à la sécheresse a souvent été étudiée en soumettant les végétaux brusquement et sur un temps très court à des conditions de stress hydrique, ce qui expose les cellules à un stress sévère. Mais en conditions agronomiques,

et particulièrement sous nos climats tempérés, les plantes ont rarement à faire face à de telles situations car elles mettent en œuvre des régulations précoces qui la plupart du temps préservent les cellules du stress.

Les régulations physiologiques et morphologiques qui permettent aux plantes de s'adapter à une alimentation en eau déficitaire s'opèrent à différentes échelles (**Y. Sakuma, et al., 2006**). Dès qu'un déficit hydrique apparaît, la plante ajuste, rapidement et de façon réversible, les flux d'eau qui la traversent par la fermeture de ses stomates (petits orifices des feuilles, qui règlent les échanges gazeux entre plante et atmosphère). Des déficits hydriques plus longs induisent des changements plus irréversibles, notamment de morphologie (réduction des surfaces d'évaporation). Dans les situations de sécheresse très longue et sévère, cette réduction peut devenir complète, la question alors posée est celle de la survie des organes essentiels (méristèmes, racines) pour assurer une reprise de croissance lorsque les conditions hydriques sont à nouveau favorables (cas des espèces pérennes soumises aux climats méditerranéens).

II.1.1. Réponses à court terme

A l'échelle de quelques minutes, la plante peut réduire sa transpiration en fermant ses stomates (pores microscopiques sur les feuilles par lesquels s'effectuent les échanges gazeux (H_2O et CO_2)). Ce degré de fermeture des stomates est déterminé par la mesure de la conductance stomatique. La fermeture stomatique est un processus clé du contrôle de l'état hydrique de la plante, et elle devient plus sensible à la contrainte hydrique. La fermeture stomatique s'accompagne d'une réduction de l'assimilation de CO_2 dans les feuilles (par diminution de diffusion) et d'une augmentation de la température des feuilles (le flux transpiratoire contribue à une dissipation de l'énergie radiative incidente) qui peut entraîner une altération des processus photochimiques de la photosynthèse, le taux de la réduction de l'activité photosynthétique est en grande partie liée au degré de fermeture des stomates et celui de la réduction de l'activité des PSII (**Ykhlef et al. 2000**), et la synthèse de composés toxiques à caractères oxydants dans les cellules (stress oxydatif).

La régulation de la conductance stomatique reste le mécanisme majeur intervenant à court terme pour limiter les pertes d'eau : le potentiel hydrique foliaire sera maintenu d'autant plus longtemps que la fermeture des stomates est précoce. Celle-ci peut intervenir à des potentiels hydriques foliaires différents en fonction du génotype (**Mojayad, 1993**) et du stade de développement (**Morizet et Merrien, 1990**). La régulation de la conductance stomatique dépend, à un instant donné, du potentiel hydrique foliaire et de l'humidité de l'air au champ. Les génotypes à faible conductance sont plus sensibles au déficit de vapeur de l'air

et à la baisse du potentiel hydrique foliaire que les génotypes à forte conductance. Une faible conductance est généralement proposée comme un trait favorable à l'adaptation à la sécheresse (**Jones, 1979**).

Si la fermeture des stomates n'est pas totale, en raison de la différence entre les coefficients de diffusion de l'eau et du CO₂ dans la feuille, la transpiration est plus réduite que l'assimilation nette : l'efficacité d'utilisation de l'eau est alors augmentée. En revanche, une telle sensibilité des stomates à la diminution de potentiel hydrique peut augmenter la fréquence des épisodes de photoinhibition. La chaîne de transport des électrons est alors rétro-réglée afin de dissiper l'énergie lumineuse en excès. Il est admis que le photosystème II (PSII) joue un rôle central dans les processus d'utilisation et de régulation de l'énergie lumineuse (**Baker, 1991**).

Lorsque la fixation du CO₂ ne consomme plus assez d'énergie, d'autres voies métaboliques, telles que la photorespiration, peuvent contribuer au maintien du transfert non cyclique des électrons. Lorsque cette 'voie photochimique' est saturée, la dissipation thermique, par l'intermédiaire du cycle des xanthophylles, joue un rôle important au sein des mécanismes photoprotecteurs en limitant la destruction des PSII (**Demmig-Adams et Adams, 1992**). Cependant, une augmentation supplémentaire de l'énergie lumineuse absorbée, conduit à une inactivation des PSII plus ou moins réversible, liée à des modifications structurales de la protéine D1 (**Critchley et Russel, 1994**). Ces modifications du fonctionnement photochimique peuvent être associées à une altération de la biochimie du chloroplaste.

II.1.2. Réponses à moyen terme (heures, jours)

A l'échelle de quelques heures à quelques jours, la plante peut maintenir la turgescence de ses tissus. Les processus de croissance sont particulièrement sensibles à la déshydratation et la performance des plantes soumises à des contraintes hydriques dépend des capacités d'amélioration de l'acquisition de l'eau, mais également. Elle est liée à la capacité des organes à maintenir leurs fonctions physiologiques (**Morgan, 1984**).

Le maintien de la turgescence au cours du déficit hydrique contribue à limiter les effets négatifs du stress hydrique sur la conductance stomatique et la photosynthèse (**Maury et al., 2000**), ainsi que sur l'expansion cellulaire (**Cosgrove, 1986**), la croissance (**Barlow, 1986**), notamment celle des racines. Comme la turgescence est le moteur de la croissance, de nombreux programmes génétiques ont visé à favoriser son maintien lors d'un déficit hydrique via l'accumulation de solutés dans la cellule. D'autres mécanismes sont

impliqués dans le maintien de la croissance comme la division cellulaire (Granier *et al.*, 2000), les caractéristiques mécaniques des parois cellulaires (Cosgrove *et al.*, 2005), le maintien d'une conductivité hydraulique élevée via des protéines membranaires, les aquaporines (Martre *et al.*, 2002) et la signalétique hormonale (Sharp, 2002).

II.1.3. Réponse à long terme (semaines)

A l'échelle de quelques semaines, la plante ajuste sa transpiration par une diminution des surfaces foliaires. Il s'agit d'un mécanisme adaptatif qui consiste à limiter la croissance des tissus foliaires.

De la même façon, les racines sont concernées avec une conséquence majeure : le maintien de croissance permet de prospecter des couches de sol plus profondes, là où les réserves d'eau sont plus importantes. Lors de sécheresses précoces, la réduction de la surface foliaire est associée à une diminution de l'expansion foliaire plus qu'à une sénescence accélérée des feuilles. L'optimisation de l'absorption d'eau est liée à un ensemble complexe de caractères morphologiques des racines : masse et volume, ramification, profondeur (Ramanjulu et Bartels, 2002).

De nombreuses plantes adaptées aux zones arides ne contrôlent que très peu leurs pertes en eau par transpiration, mais possèdent un enracinement très profond capable d'extraire l'eau du sol. La croissance racinaire en conditions sèches peut être maintenue par l'ajustement osmotique qui limite la baisse du potentiel de turgescence (Turner, 1986).

Il existe des mécanismes moléculaires actifs, spécifiques du déficit hydrique.

- ✓ **Les outils de la génomique révèlent une réorganisation profonde et rapide de l'expression des gènes en déficit hydrique** : l'analyse des réponses au déficit hydrique au niveau de l'expression des gènes est analysée depuis le début des années 2000 en suivant simultanément les variations d'accumulation de milliers de transcrits de ces gènes (transcriptome). Ceci permet d'identifier des gènes qui sont induits lors d'un déficit hydrique et participent ainsi potentiellement aux réponses de la plante, et de les comparer à ceux induits lors d'autres types de stress comme les stress salin ou froid, ou à l'application d'hormones de stress sans le stress lui-même (Seki *et al.*, 2002 ; Rabbani *et al.*, 2003).

Par exemple, l'expression des gènes est modifiée différemment par une sécheresse seule et par une sécheresse accompagnée d'un stress thermique chez *Arabidopsis thaliana* (Rizhsky *et al.*, 2004). D'autres analyses ont étudié plus précisément la dynamique de la réponse, et les différences entre génotypes de ces dynamiques (Kawasaki *et al.*, 2001, chez le riz).

Des différences de réponses entre organes ont enfin été analysées, par exemple en montrant des différences importantes de réponse au déficit dans le placenta et l'albumen du grain de maïs (Yu et Setter, 2003).

- ✓ **Il existe une signalétique mettant en jeu des dialogues entre gènes, et entre gènes et hormones de stress** : l'expression des gènes est contrôlée par des facteurs de transcription, des protéines qui se fixent au promoteur (séquence d'ADN en amont de la partie transcrite) des gènes qu'ils contrôlent. Ils se fixent sur un promoteur s'ils y reconnaissent des séquences particulières appelées éléments *cis*. Des éléments *cis* et des facteurs de transcription impliqués dans la réponse à la sécheresse ont été identifiés. Certains sont impliqués dans l'induction par l'ABA (éléments ABRE, ABA Responsive Elements, et facteurs de transcription AREB, ABA Responsive Element Binding proteins, (Skriver *et al.*, 1991 ; Uno *et al.*, 2000 ; Abe *et al.*, 1997), d'autres dans l'induction par la sécheresse indépendamment de l'ABA (DRE, Drought Responsive Element, et facteurs de transcription DREB, DRE-Binding proteins, (Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994 ; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Les gènes régulés par ces facteurs de transcription ont été recherchés en analysant les conséquences de leur sur-expression à l'échelle du génome (Seki *et al.*, 2001 ; Abe *et al.*, 2003 ; Sanchez *et al.*, 2004).

Le déficit hydrique affecte aussi la traduction des transcrits en protéines, ainsi que le devenir des protéines : tous les ARNm ne sont pas traduits dans les mêmes proportions, et le taux de traduction est modifié au cours du déficit hydrique (Kawaguchi *et al.*, 2004). Les quantités de protéines ne sont donc que partiellement corrélées aux quantités d'ARNm. Par ailleurs les protéines subissent ensuite des modifications (post-traductionnelles) qui ont une influence sur leur activité. Différentes analyses de la réponse à des déficits hydriques, à un stress salin ou à l'ABA ont été effectuées dans différentes espèces (Riccardi *et al.*, 1998 ; Costa *et al.*, 1998 ; Hajheidari *et al.*, 2005) parfois en analysant un compartiment subcellulaire particulier (Rey *et al.*, 1998). Il a par exemple été montré que l'induction de protéines par le déficit hydrique dépend du stade de développement de l'organe considéré (Vincent *et al.*, 2005) et du génotype (de Vienne *et al.*, 1999 ; Riccardi *et al.*, 1998 et 2004 ; Salekdeh, 2002).

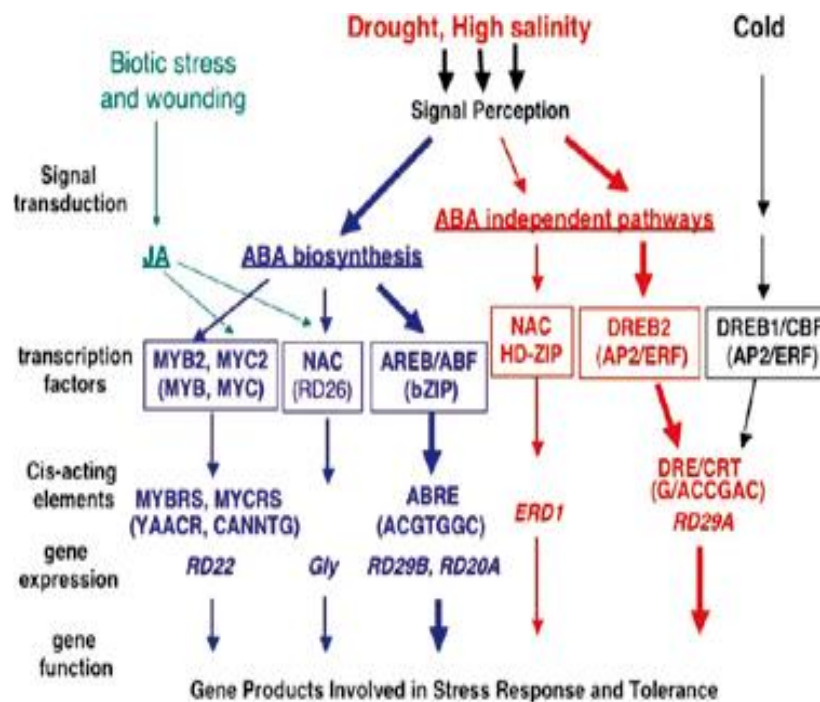


Figure 1 : Les voies de signalisations impliquées dans les réponses à différents stress dont la sécheresse (F. Tardieu *et al.*, 2000)

Le déficit hydrique met en jeu une série de mécanismes à l'échelle de gènes et de protéines. Il existe un grand nombre de fonctions induites par le déficit hydrique, vraisemblablement impliqués dans les réponses de la plante. (F. Tardieu *et al.*, 2000) (figure 1)

II.2. Impact des changements climatiques sur l'agriculture

L'agriculture est totalement dépendante de ressources, météorologiques et climatiques. L'industrialisation massive et la grande croissance de la population humaine mettent progressivement une grande pression sur les ressources en eau existantes, les terres arables, l'environnement, les ressources de matériel génétique, et les pratiques forestières.

Une des principales raisons de ce problème pourrait être l'impact des changements climatiques tels que la pollution par des Gaz, appauvrissement de l'ozone atmosphérique, augmentation des niveaux de radiation UV-B, l'augmentation du CO₂ atmosphérique, extrême variabilité du temps et des emplacements de précipitations, longueurs des saisons irrégulières, période de sécheresse intermittente, le réchauffement climatique, des températures élevées, la dégradation des ressources en eau et des sols. (Mohan J., 2010)

En outre, les planificateurs doivent surmonter les incertitudes inhérentes qui sont complexes tels que:

L'incapacité à faire une région spécifique de prédictions du taux, la nature et l'ampleur des changements climatiques en particulier de la pluviométrie, la menace des dommages irréversibles aux écosystèmes, un horizon de planification très long, la longueur des délais entre les émissions de gaz à effet de serre et les effets du climat, de grandes variations régionales dans les causes et effets, la portée globale du problème et la nécessité d'envisager plusieurs gaz à effet de serre et des aérosols. Le réchauffement climatique peut devenir désastreux pour la production agricole en particulier par apparition de nouveaux insectes, parasites, maladies et certains déjà existants peuvent disparaître.

L'augmentation des niveaux de CO₂ dans l'atmosphère et le potentiel du changement climatique mondial peuvent modifier les taux de croissance, la distribution des mauvaises herbes et les insectes nuisibles, et leur impact sur la productivité agricole. Une augmentation des niveaux de CO₂ peut améliorer le taux de plantes qui pourraient compenser la compétitivité de la croissance entre les plantes cultivées et les mauvaises herbes. Il semble que le coton est très sensible aux taux élevés de CO₂ par contre le blé est beaucoup moins sensible. **(Mohan J., 2010)**

En outre, l'augmentation du niveau de rayonnement UV-B au niveau du sol à la suite d'une diminution de la protection du bouclier d'ozone de la stratosphère pourrait conduire à des effets négatifs pour la vie sur terre: Le changement du régime spectral au sein de feuilles après l'exposition aux rayonnements UV-B amélioré à pour cause des structures modifiées. La concentration d'ozone ambiant seule ou en combinaison avec d'autres polluants diminue aussi le rendement de plusieurs cultures importantes. **(Mohan J., 2010)**

III. Mutagénèse

Alors que les sélectionneurs ont eu recours à l'induction de mutations pour élargir la base génétique du germoplasme, et ont utilisé les lignées mutantes directement comme de nouvelles variétés ou comme source de nouvelle variation dans des programmes de croisement, la connaissance de la nature précise des mutations induites n'a pas été nécessaire. Intuitivement un niveau conservateur du réarrangement et de la suppression de la petite paire de base a été considéré comme idéal. Aujourd'hui, l'utilisation de techniques de mutation a été élargie au-delà des applications dans l'élevage à la découverte des gènes et la génétique inverse. Ces nouvelles applications à haut débit nécessitent des classes spécifiques de mutations qui sont induits avec un rendement élevé sur les génomes des plantes

de cultures entières, et par conséquent la connaissance de la nature précise de la mutation induite devient un problème

L'exploitation de la diversité génétique naturelle et induite est la condition de base de la reproduction de la plante dans le développement de variétés végétales pour la production alimentaire durable. Les sélectionneurs de plantes sont handicapés en raison d'un manque de disponibilité ou la non-existence de génotypes souhaités (**Claire et al., 2006**) Cependant, ils ont recombinaison avec succès les gènes souhaités à partir du pool de gènes disponibles et les espèces végétales liées par hybridation sexuelle, et développer avec succès de nouveaux cultivars avec des traits désirables tels que un rendement élevé, résistance au stress biotiques et abiotiques.

Le but de l'induction des mutations est d'améliorer le taux de fréquence des mutations afin de sélectionner les variantes appropriées pour l'amélioration des plantes.

Le taux de la fréquence de mutations spontanées est plutôt très faible et difficile à exploiter par les sélectionneurs de végétaux. Les mutations sont induites par des traitements mutagènes physiques (par exemple rayonnement gamma) et chimiques (par exemple éthylméthane sulfonate) à la fois des semences et des cultures à multiplication végétative.

Le traitement mutagène brise l'ADN nucléaire et au cours du processus de mécanisme de réparation de l'ADN, de nouvelles mutations sont induites au hasard. (**Mohan J.,2010**)

Les changements peuvent se produire également dans des organites cytoplasmiques, et entraînent également des mutations chromosomiques ou génomiques qui permettent aux sélectionneurs de plantes de sélectionner des mutants utiles telles que la couleur des fleurs, la forme de la fleur, la résistance aux maladies, (**P. Crino**) Un avantage spécifique d'induction de mutation est la possibilité d'obtenir une variation génétique non sélectionnée, l'amélioration des plantes à multiplication végétative quand un ou quelques caractères d'un cultivar exceptionnel doivent être modifiés.

L'utilisation des mutations induites ont au cours des 50 dernières années jouées un rôle majeur dans le développement de variétés des cultures supérieures se traduisant par un impact économique énorme sur l'agriculture et la production alimentaire qui est actuellement évalué en milliards de dollars et des millions d'hectares cultivés.

Il n'y a aucune différence entre la production artificielle d'induction des mutations, et les techniques. Ceci est exactement ce qui se passe dans la nature (à travers l'évolution) et conduit à la fixation des événements de mutations.

Tout ce que font les sélectionneurs de plante est d'imiter la nature à cet égard. Il faut également noter que, dans la plupart des cas, les mutations induites sont que des «matières

premières» qui pour que leurs potentiels soit réaliser, ils doivent être intégrés dans des régimes de sélection établie.

Ainsi, l'induction des mutations est un système flexible, pratique, non réglementée, non dangereux et alternative à faible coût pour les organismes génétiquement modifiés (OGM).

le site Web de l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) et l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (<http://www-mvd.iaea.org/>) qui couvre plus de 3000 nouvelles variétés de cultures dans certains 170 espèces, y compris les cultures de semences et végétatifs propagé comme le riz, le blé, l'orge, les pommes, les agrumes, la canne à sucre, la banane, entre autres.(Mohan J., 2010). Différents continents ont utilisés cette technique sur différentes plantes a fin de les améliorer, La figure 2 montre le nombre de variétés mutantes dans différent continents ainsi que les variétés de plantes dérivés des mutations.

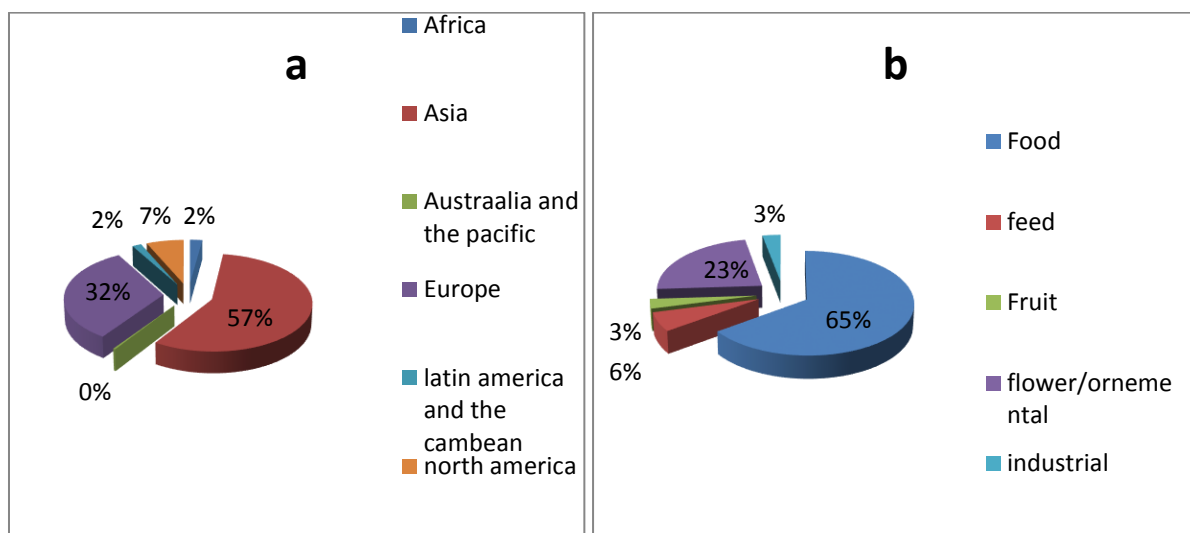


Figure 2: Les variétés de plantes dérivés des mutations a) le nombre de variétés mutantes dans différent continents, b) la proportion de différentes plante types. Source: FAO/IAEA Database of mutant varieties and genetic stock, <http://mvgs.iaea.org>, 17 November, 2008.

III.1. Types de mutations

Il existe trois types principaux de mutations.

Les mutations sont des modifications permanentes dans l'ADN. Lorsque ces changements se produisent dans la séquence d'un gène qui code pour une protéine, ils peuvent induire différentes conséquences.

- Tout d'abord, ils peuvent provoquer le remplacement d'un acide aminé par un autre, il s'agit des mutations faux-sens.

- Ils peuvent ensuite provoquer le remplacement d'un acide aminé par l'instruction "stop" provoquant l'arrêt de la synthèse de la protéine concernée, il s'agit alors des mutations non-sens.
- Le dernier type de mutation concerne les délétions ou les insertions. Les délétions sont des pertes d'ADN (qui peuvent aller d'une seule base à plusieurs dizaines de milliers). Les insertions sont des gains d'ADN (d'une base à plusieurs milliers). Dans ces deux derniers cas (délétions et insertions) le résultat pour la protéine concernée est ce que l'on appelle un "décalage du cadre de lecture" qui provoque généralement l'apparition prématurée d'une instruction "stop" provoquant l'arrêt de la synthèse de la protéine concernée (**Anonyme 1, 2016**)

III.2. Induction des mutations

Les agents mutagènes peuvent être classés en trois catégories: (par exemple, les rayons gamma) physiques, chimiques (par exemple, éthyle méthane sulfonate) et des éléments transposables (tels que les transposons, rétrotransposons, l'ADN-T, les rétrovirus).

À l'heure actuelle, peu de données sont disponibles sur la capacité des effets génétiques induites au niveau moléculaire dans les plantes et sur la spécificité et l'efficacité relative de ces différentes catégories d'agents. Ces effets impliquent des dommages à l'ADN, ce qui entraîne des changements de paires de bases (polymorphismes nucléotidiques unique simple, ou SNP), de petites insertions et délétions (indels) et de réarrangements chromosomiques.

En sait encore moins sur la façon dont la mutation induite interagit avec les processus épigénétiques, tels que méthylation, l'activation du rétro-éléments, et la perturbation de la structure de l'ordre le plus élevée de l'ADN.

Ce changement permet de repérer la mutation, en la rendant perceptible au niveau de l'organisme, les mutations peuvent se produire à trois niveau différents (**alberts et al.,2002 ; Feuk et al., 2006**)

- Les mutations géniques, ponctuelles, impliquent des erreurs de petite taille dues au changement d'une base par une autre ou l'addition ou la délétion de quelques nucléotides dans une séquence d'ADN.
- Les altérations chromosomiques entraînant des modifications importantes de la structure des chromosomes (telles que les translocations, délétions, inversion) par gain, perte ou réarrangement de segments chromosomique.

- Les mutations génomiques concernent le changement d'un nombre de chromosomes sans changement de structure de ces derniers (aneuploidies et polyploidie).

Les mutations sont induites soit par :

III.2.1. Méthodes physiques

Les radiations ionisantes: rayons X, alpha, bêta, gamma produits par des substances radioactives, protons, neutrons, induisent des mutations de différents types. Ces mutations peuvent être de simples mutations géniques généralement récessives mais peuvent également être des mutations de structure chromosomique généralement létales.

Le végétal peut être irradié soit de l'extérieur par les rayonnements soit de l'intérieur à l'aide d'un radioisotope qui, souvent, agit de plus comme substance métabolique (phosphore, soufre). Les rayonnements peuvent être électromagnétiques (cas des rayons X ou des rayons gamma) ou corpusculaires (rayon alpha, bêta, neutrons, protons). (**Mongi M., 2008**)

Les rayons alpha et bêta, sont peu utilisés en radiogénétique par suite de leur pouvoir de pénétration faible. Les rayons X et gamma sont très utilisés car leur pouvoir de pénétration est grand. Par contre, le milieu ambiant à une grande influence sur leur action, Chaque type de radiation diffère de l'autre par son origine et la variété de ses propriétés physiques. La dissipation d'énergie dans un tissu quelconque, entraîne, soit l'excitation, soit l'ionisation des molécules constituant ce tissu. (**Tall M., 2000**)

III.2.2. Effet de la mutagenèse physique sur l'agriculture

Les rayons gamma appartiennent aux rayonnements ionisants et sont les rayonnements électromagnétiques les plus efficaces, ayant le niveau d'énergie autour de 10 kilos électrons volts (keV) à plusieurs centaines de keV. Par conséquent, elles sont plus pénétrantes que d'autres types de rayonnements tels que les rayons alpha et bêta. Il ya plusieurs usages des techniques nucléaires dans l'agriculture. Dans l'amélioration des plantes, l'irradiation des semences peut causer une variabilité génétique, qui permet aux sélectionneurs des plantes de sélectionner les nouveaux génotypes avec des caractéristiques améliorées, telles que la précocité, la tolérance à la salinité, le rendement en grains et de la qualité (**Ashraf, 2003**).

Les rayonnements ionisants sont également utilisés pour stériliser certains produits agricoles afin d'augmenter leur temps de conservation ou de réduire la propagation des agents pathogènes lors du commerce de ces produits dans le même pays ou de pays à pays (**Melki et Salami, 2008**)

Un certain nombre de paramètres radiobiologiques sont couramment utilisés dans l'évaluation précoce de l'efficacité de rayonnement pour induire des mutations. Les méthodes basées sur les changements physiologiques tels que l'inhibition de la germination des graines, l'élongation des tiges et des racines ont été signalés pour la détection des céréales et de légumineuses irradiées. **Chaudhuri (2002)** a rapporté que l'irradiation des semences de blé réduit la longueur des feuilles et des racines lors de la germination. Le rayonnement gamma peut être utile pour la modification de caractères physiologiques (**Kiong et al., 2008**). L'effet biologique des rayons gamma est basée sur l'interaction avec des atomes ou des molécules dans la cellule, en particulier de l'eau, pour produire des radicaux libres (**Kova'cs & Keresztes 2002**). Ces radicaux peuvent endommager ou modifier des composantes importantes de cellules végétales et ont été reportés d'affecter de façon différentielle la morphologie, l'anatomie, la biochimie et la physiologie des plantes en fonction de la dose de rayonnement (**Ashraf et al., 2003**).

Ces effets incluent des changements dans la structure cellulaire de la plante et du métabolisme, par exemple, la dilatation des membranes thylakoidiens, l'altération de la photosynthèse, la modulation du système antioxydant, et l'accumulation de composés phénoliques (**Kova'cs & Keresztes 2002; Kim et al., 2004; Wi et al., 2007; Achraf, 2009**). D'après les observations ultra-structurel des cellules végétales irradiés, les importants changements structurels de chloroplastes après rayonnement avec 50 Gy ont révélé que les chloroplastes étaient plus sensibles à une forte dose de rayons gamma que les autres organites cellulaires. Des résultats similaires ont été signalés à être induite par d'autres facteurs de stress environnementaux tels que les UV, les métaux lourds, les pluies acides et la lumière élevée (**Molas, 2002;. Barbara et al., 2003; Quaggiotti et al., 2004**). Cependant, l'irradiation à faible dose n'a pas provoqué ces changements dans la structure des chloroplastes. L'irradiation des semences avec des doses élevées de rayons gamma perturbe la synthèse des protéines, l'équilibre hormonal, l'échange de gaz chez les feuilles, l'échange d'eau et l'activité enzymatique (**Hammed et al., 2008**). En raison de limiter la variabilité génétique parmi les génotypes de blé existants, **Ifraqet Nawab (2001)** ont ouvert une nouvelle ère pour l'amélioration des cultures et maintenant l'induction de mutations est devenu un outil mis en

place dans la sélection des plantes qui peuvent compléter le matériel génétique existant et peut améliorer les cultivars dans certains traits spécifiques (**Ifraq et Nawab 2001**).

De différentes mutations positives ont été créées dans le domaine d'agriculture en utilisant les irradiations Gamma, des cultures avec des caractéristiques améliorées ont été développées par des inductions mutagènes (**Rehman et al., 1987; Javed et al., 2000; Gustaffson et al., 1971**)

Effet des rayonnements Gamma sur la morphologie, la physiologie, et la cytologie de la plante

L'étude des effets des rayonnements sur les plantes est un domaine vaste et complexe.

L'irradiation gamma a été trouvée pour augmenter la croissance des plantes et leur développement en induisant des changements cytologiques, génétiques, biochimiques, physiologiques et morphogénétiques dans les cellules et les tissus en fonction du niveau d'irradiation (**Guncken et Sparrow, 1961**)

C'est l'un des importants agents physiques utilisés pour améliorer les caractères et la productivité de nombreuses plantes (**Jaywardena et Peiris, 1988, Sharma et Rana, 2007**).

Les rayons gamma ont eu un effet défavorable sur des traits de plantes et cela dépendait des espèces ou variétés végétales et la dose d'irradiation (**Artk et Peksen 2006**).

Ces effets incluent des changements dans la structure cellulaire de la plante et le métabolisme, par exemple, la dilatation des membranes thylacoïdes, altération de la photosynthèse, la modulation du système anti-oxydant et de l'accumulation de composés phénoliques (**Kim et al., 2004, Wi et al., 2005**).

Mokobia et Anomohanran 2005 ont constaté que l'irradiation gamma était très utile non seulement pour la stérilisation de la médecine, mais aussi pour la conservation des aliments et des céréales dans l'alimentation et l'agriculture.

III.2.3. Méthodes chimiques

Elle consiste en général en un trempage du matériel végétal dans des solutions aqueuses des mutagènes, à température fixe 24°C et pendant un temps déterminé (selon les expériences: 8 h à 24 h). Les mutagènes chimiques, par leur similitude ou leur réactivité avec certains constituants chimiques du matériel génétique, provoquent des altérations des acides nucléiques (ADN-ARN), porteurs de l'information héréditaire. Les traitements chimiques sont fréquemment appliqués aux semences, aux bourgeons, ou aux grains de pollen. Les substances chimiques ont souvent l'avantage, chez les plantes à reproduction sexuée,

de produire un pourcentage de survie relativement élevé. L'utilisation des produits chimiques provoque, par conséquent, plus de mutations géniques que d'aberrations chromosomiques que si la méthode physique était utilisée. Les substances chimiques présentent des modes d'action différents suivant leurs caractéristiques:

- cas des substances chimiques qui transforment la base (substances qui peuvent par exemple désaminer la cytosine et transformer le NH₂ en OH donnant l'uracile),
- cas des substances chimiques qui perturbent la réplication en s'intercalant dans l'ADN,
- cas des substances chimiques qui se comportent comme des analogues de bases.

Plusieurs produits chimiques présentent des potentiels mutagéniques dans divers systèmes, de test. Toutefois, seuls quelques uns sont réellement utilisés pour l'induction des mutations en amélioration des plantes. Plusieurs d'entre eux appartiennent au groupe des agents alkylsants tels que: le méthane sulphonate d'éthyl (MSE), le diethyl sulphate (DES), l'éthylène imine (EI), le nitroso méthyl uréa (NMIJ). **(Tall M.,2000)**

Le traitement avec des mutagènes casse l'ADN nucléaire et pendant le processus de mécanisme de réparation d'ADN, de nouvelles mutations sont induites aléatoirement et qui sont héritable. Les changements peuvent aussi touché dans les organelles cytoplasmique et les chromosomes ou des mutations génomiques et cela permettent aux sélectionneurs de plante de choisir des mutants utiles comme la couleur, forme de fleur, résistance de maladie, à la sécheresse, un avantage spécifique de l'induction de mutation est la possibilité d'obtenir des variations génétique non choisies, l'amélioration de plantes végétale propagées quand un ou peu de caractères d'une variété cultivée remarquable sont à modifiés. **(Mohan J. et al., 2010)**

La réussite de la mutagenèse relève en grande partie d'un certain nombre de conditions préliminaires. L'ajustement de la teneur en eau à un niveau désiré, s'avère être très importante pour l'irradiation des graines et leur traitement aux produits chimiques. Le trempage des graines dans de l'eau est une pratique habituelle de prétraitement lors de l'utilisation des mutagènes chimiques. Il permet ainsi de drainer l'ensemble des substances solubles à l'eau et hydrate la membrane cellulaire et les macromolécules. L'eau devra être changée toutes les 15 à 20 minutes pour empêcher l'accumulation des produits d'hydrolyse.

La température étant adéquate pour une bonne germination, le trempage peut initier le métabolisme et la synthèse de l'ADN. Ce phénomène peut être évité en submergeant les graines dans de l'eau. La température de l'eau et la durée de trempage adéquates pourront être déterminées par des expérimentations dans lesquelles, les graines trempées à différentes températures et durées seront exposées à une dose unique de mutagène. Le pourcentage de la

germination et la croissance des plantules pourront identifier le traitement le plus approprié (Tall M., 2000)

III.2.4. Effet de la mutagenèse chimique sur la plante

Les agents chimiques jouent un rôle majeur et sont devenus particulièrement populaire dans l'utilisation. éthyl méthanesulfonate (EMS), un agent d'alkylation, est particulièrement efficace car il forme des liaisons avec des nucléotides les obligeant à altérer les bases complémentaires, introduisant ainsi des changements de base après la réplication (Haughn G; *et al.*, 1987, Ashburner M. 1990). En outre, l'effet de mutagenèse à l'EMS se traduit souvent par un grand nombre de mutations récessifs dans l'ensemble du génome (Lightner J, Caspar T. 1998). Autres agents alkylants, tels, que ethylnitrosourea (ENU), ont également été utilisées pour induire efficacement des mutations non spécifiques (Lightner J, Gaspar T. 1998)

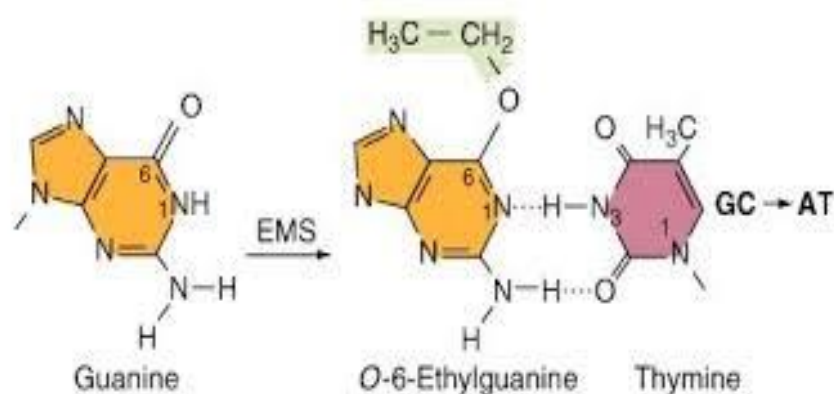


Figure 3 : la mutagenèse par l'éthyl méthansulfonate

Un avantage spécifique de la mutagenèse EMS est qu'une série de mutations alléliques peut être obtenue, affichant une gamme de phénotypes qui peuvent servir comme base des études de fonction de la structure détaillée. Chez *Arabidopsis*, cinq pour cent des mutations induites par l'EMS dans les régions codantes ciblées entraînent une soudaine terminaison du produit de gène, alors que cinquante pour cent des résultats dans faux-sens de mutations qui modifient la séquence amino-acide de la protéine codée (Greene EA, *et al.*, 2003)

Les mutations par mutagenèse à l'EMS sont générées aléatoirement dans l'ensemble du génome et peuvent permettre un haut degré de saturation mutationnelle sans des dommages excessive de l'ADN qui peuvent provoquer l'aneuploïdie, réduction de la fertilité, et la létalité dominante. Compte tenu ces avantages, la mutagenèse chimique a maintenu

sa popularité, même avec l'avènement de techniques transgéniques sophistiquées. Elle est devenue un outil puissant en particulier pour la génétique inverse en espèces végétales en utilisant l'approche de TILLING. L'utilisation de TILLING peut faciliter la manipulation de l'envergure découverte de mutations ponctuelles induites par les populations qui sont nécessaires. Cette nouvelle méthode de dépistage peut être appliquée chez plusieurs espèces petites ou grandes, diploïdes ou allohexaploïde et peut fournir une approche rapide pour la génétique inverse par l'identification des variations induites et naturelles dans de nombreuses espèces. Lorsque les variations commercialement appropriés sont découvertes, le TILLING à l'avantage d'être exemptés des exigences d'approbation réglementaire qui sont strictement obligés pour les cultures transgéniques. Ces propriétés font de l'approche TILLING un outil précieux pour l'analyse de la mutation. (Soner R., 2006)

III.3. Culture *in vitro* et mutagenèse

Il est possible d'améliorer des clones par le changement de traits spécifiques par mutations induites. La disponibilité de grandes populations pour la mutagenèse est l'un des pré-requis de base pour obtenir des variations suffisantes. Les techniques de mutation en association avec la culture de tissu, des méthodes moléculaires (Mohan J., 1998) fournissent une puissante technologie pour améliorer les plantes propagées (IAEA, VIENNA, 2001) tel que les bananes, plantains, pomme, ananas, dattier, Pomme de terre, patate douce, manioc, oeillet, chrysanthèmes, Roses et tulipes.

Presque toutes les plantes peuvent être régénérées et multiplié *in vitro*, permettant la production de grandes populations dans un petit espace et un temps court. L'irradiation du palmier *in vitro*, pomme, pomme de terre, patate douce et ananas fournit maintenant un moyen de traiter de grandes populations, que n'aurait pas été possible auparavant. L'irradiation des plantes propagées, embryons matures, méristèmes Apical, régénération des cultures de cals, anthères, les microspores et des embryons somatiques est une version miniaturisée d'arbres et graines dans la Boîte de Petri au lieu du champ. (B.S. Ahloowalia *et al.*, 2001, Cemalettin Yaflar *et al.*, 2006)

Dans les expériences de mutagenèse, que se soit avec les produits chimiques ou des mutagènes physiques, il est nécessaire de faire progresser le matériel traité par quelques générations de graine ou propagations végétatives. Les mutants récessifs sont d'habitude choisis dans le deuxième (M2) ou la troisième (M3) génération après le traitement. Dans les plantes végétativement propagées, après la mutagenèse, Plusieurs cycles de propagation sont nécessaires pour dissoudre les chimères et obtenir des mutants solides.

Les sous culture *in vitro* du matériel irradié par V2 à V4 peuvent être réalisés rapidement et sans perte n'importe quel génotype sous des conditions libre. Dans plusieurs plantes, comme la banane et la pomme de terre, cette procédure peut réduire la durée de 5 ans dans le champ à moins de neuf mois dans le laboratoire. De plus, quand les plantes sont régénérés de cultures de suspension cellulaires capables de produire des embryons somatiques, il y a plus de chances que les régénérées pourrait être des mutants solides. **(B.S. Ahloowalia et al., 2001)**

III.4. Différence entre transgénèse et mutagénèse

Avec l'expansion des informations sur les séquences d'ADN génomique et les connaissances des fonctions des gènes spécifiques dans des traits d'importance agronomique, il est désormais possible d'envisager de créer des traits spécifiques d'une manière dirigée. Une approche consiste à utiliser des transgènes pour transférer un simple ou multiple gène d'intérêt à l'intérieur ou à travers les espèces. **(Zerihun Tadele, 2010)**

Appliquée aux plantes, la transgénèse est une technique de laboratoire permettant d'insérer au moins un gène n'appartenant pas à l'espèce dans l'ADN des cellules végétales. Ces plantes génétiquement modifiées présentent un caractère nouveau, par exemple la tolérance à un herbicide.

Bien que très puissantes, les approches transgéniques ont été atteints avec un niveau élevé de désapprobation du public, l'utilisation des méthodes de production alimentaire est actuellement interdite dans de nombreux pays. **(Zerihun Tadele, 2010)**

Bien que la mutagénèse et la transgénèse impliquent toutes les deux la modification du génome, il y'a des différences entre les deux techniques, Le tableau 1 ci-dessous présente les différences entre mutagénèse et transgénèse : **(Mohan J. et al., 2010)**

Tableau 1 : Différences entre mutagénèse et transgénèse (Mohan J. *et al.*, 2010)

Transgénèse	Mutagénèse
- L'utilisation des outils de la biologie moléculaire pour incorporer les gènes dans la plante	- Les mutations sont aléatoires.
- C'est une technique plus précise que la mutagénèse.	- Requiert une présence d'une large population pour une sélection des mutants désirés.
- Le transgène est intégré aléatoirement dans le génome	- Les changements d'ADN ne peuvent pas être directs. Elle ne peut pas être directe
- Les changements d'ADN et de protéines sont bien compris.	- Les mutants peuvent introduire d'autres changements dans l'ADN
- Peut introduire de nouveaux gènes dans la plante. Ces gènes peuvent être de n'importe quelle source, y compris les animaux, les insectes, les plantes, et les bactéries.	- Elle peut uniquement modifier les gènes de l'organisme. Le traitement mutagène des fragments d'ADN en premier, suivi par le mécanisme de réparation de l'ADN, et qui entraîne des mutations.
- Les consommateurs manquent de confiance envers les aliments transgéniques	- Les consommateurs acceptent les aliments issus de mutagénèse.
- Elle nécessite des protocoles de culture de tissus pour la régénération des plantes transgéniques.	- La mutagénèse <i>in vitro</i> exige également des cultures de tissus pour la régénération des plantes mutantes.
- Les plantes transgéniques ont peu de probabilités d'effectuer d'autres changements dans leurs ADN.	- Le système de sélection est placé sous la sélection des mutants des traits désirables.
- Les marqueurs moléculaires sont utilisés pour confirmer l'intégration de la transgénèse dans la plante.	- De nouvelles stratégies tels que le TILLING, génétique inverse.
- Des recherches coûteuses, les pays en voie de développement peuvent avoir un problème de le soutenir en raison de manque d'infrastructures de financement pour soutenir la recherche.	- Moins cher, l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA) offre des services gratuits de l'irradiation Gamma de matériel expérimental.
- La biosécurité est un grand problème	- Pas de problème avec la biosécurité
- La mutagénèse ADN-T ou transposons conduit à la perte de fonction par disparition génique.	- Donne lieu à de nombreux allèles mutants avec des degrés divers de la modification du trait de plantes.

IV. Marqueurs moléculaires

Les développements récents de la génomique ont fournis de nouveaux outils pour la découverte et le ciblage de nouveaux allèles et des gènes, qui peuvent améliorer l'efficacité de la multiplication des plantes en utilisant la sélection assistées par marqueur moléculaire (SAM) (Guimaraes E., *et al.*, 2007).

L'utilisation des SAM dans la reproduction de plante est appropriée à toutes les récoltes ciblées :

- 1- Les traits qui sont difficiles à trouver par la sélection phénotypique conventionnelle parce qu'elles sont chères ou qui consomme du temps.
- 2- Des traits dont la sélection dépend d'environnements spécifiques ou le développement des étapes qui influencent l'expression du phénotype ciblé.
- 3- Les traits qui maintiennent des allèles récessifs pendant le backcross ou pour accélérer la reproduction du backcross en général.
- 4- Pyramidage de multiples traits monogéniques (parasite et résistances de maladie ou trait de qualité) ou plusieurs QTL pour un seul trait cible avec succession complexe comme la tolérance à la sécheresse. (Mohan J. *et al.*, 2010) Jusqu'ici, la plupart des secteurs privés se sont tournés vers la reproduction moléculaire pour les récoltes à plus grand intérêt commerciale comme maïs, soja, coton et tournesol. Cela a mené au développement de stratégies de reproduction moléculaires pour le développement des variétés pour produire un génotype idéal basé sur des segments chromosomiques favorables, y compris des SAM pour des traits multiples (sélection basée sur les informations des marqueurs seulement) comme le rendement, le stress biotique et abiotique ... (Mohan J. *et al.*, 2010)

IV.1. Différents marqueurs moléculaires

L'étude des génomes, la détermination et la comparaison de génotypes ne peuvent aujourd'hui être réalisées par séquençage systématique que pour quelques espèces modèles, essentiellement pour une raison de coût. Malgré l'émergence de nouvelles technologies permettant un séquençage plus rapide et moins cher - dont le système « genome sequencer 20 » de la société ROCHE qui permet en un seul cycle de 4h, de séquencer, d'ordonner et de comparer 20 millions de bases avec une exactitude voisine de 100 % l'alternative au séquençage choisie par de nombreux laboratoires à travers le monde reste l'utilisation de marqueurs moléculaires.

Ces méthodes peuvent être regroupées en deux grandes catégories : les marqueurs de type RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et les marqueurs basés sur la méthode PCR (Polymérase Chain Reaction) dont RAPD(Random Amplified polymorphic DNAs), AFLPs(Amplified Fragment Length Polymorphisms), SSRs (Simple Sequence Repeats). Et d'autres qui ont été développés et appliqués à différentes espèces incluant les céréales. Le choix du système de marquage dépend de l'objectif précis fixé, des moyens et des compétences disponibles au laboratoire,

Les différents avantages et inconvénients de ces techniques sont synthétisés dans le tableau 2 ci-dessous :

Tableau 2: Comparaison des marqueurs moléculaires les plus utilisés chez les céréales (**Viktor Korzun, 2002**)

Caractère	RFLPs	RAPDs	AFLPs	SSRs	SNPs
ADN nécessaire (ug)	10	0.02	0.5-1.0	0.05	0.05
Qualité d'ADN	élevé	élevé	Modéré	modéré	élevé
Basé sur la PCR	non	oui	Oui	oui	oui
Nombre de loci polymorphe analysés	1.0-3.0	1.5-50	20-100	1.0-3.0	1.0
Facilité d'utilisation	Pas facile	facile	Facile	facile	facile
Prête à l'automatisation	bas	modéré	Modéré	élevé	élevé
Reproductibilité	élevé	Non fiable	Elevé	élevé	élevé
Prix	bas	bas	Modéré	bas	bas
Prix par analyse	élevé	bas	Modéré	bas	bas

IV.2. Les microsatellites SSR

Les empreintes génétiques des espèces de céréales et les variétés cultivées ont une longue histoire scientifique. Lorsque la technologie du profil d'ADN est utilisée en premier, les RFLPs ont été considérés comme l'art officiel. La technologie de RFLP a été suivie par les RAPDs, suivie par AFLPs, et les plus récemment utilisés sont les marqueurs microsatellites ou single sequence repeat SSR. (**Viktor Korzun, 2002**)

Les génomes de tous les eucaryotes contiennent une classe de séquences, appelées microsatellites (**Litt et Luty 1989**) ou des répétitions de séquences simples (SSR) (**Tautz et al., 1986**).

Les microsatellites avec des répétitions en tandem d'un motif de base de <6 pb ont émergé comme une source importante de marqueurs génétiques ubiquitaires pour de nombreux génomes eucaryotes (**Wang et al., 1994**). L'analyse de microsatellites est basée sur l'amplification en chaîne par polymérase (PCR), qui est beaucoup plus facile à réaliser que l'analyse RFLP et est prête à l'automatisation.

Chez les plantes, il a été démontré que les microsatellites sont hautement informatifs, des marqueurs de locus spécifiques chez de nombreuses espèces. Parce qu'ils sont multialléliques, les microsatellites ont un fort potentiel pour une utilisation dans les études évolutives (**Schloetterer et al., 1992; Buchanan et al., 1994**) et les études concernant les relations génétiques.

Les microsatellites montrent un niveau de polymorphisme et informatif en blé panifiable hexaploïde beaucoup plus élevé que tout autre système de marqueur (**Plaschke et al., 1995; Roder et al., 1995; Ma et al., 1996; Bryan et al., 1997**).

Toutefois, en raison de la grande taille du génome, le développement de marqueurs microsatellites dans le blé est extrêmement long et coûteux. Seulement 30% de tous les couples d'amorces développées à partir de séquences microsatellites sont fonctionnel et adapté à l'analyse génétique (**Roder et al., 1995; Bryan et al., 1997**). La majorité de ces marqueurs sont hérités d'une manière codominante et, dans la plupart des cas, elles sont spécifiques du chromosome. Cette fonctionnalité est utile dans un génome hexaploïde.

Avantage des marqueurs SSRs :

- La méthode est relativement simple et peut être automatisée.
- La plupart des marqueurs sont monolocus et montrent une hérédité Mendélienne.
- Les marqueurs SSR sont hautement informatifs.
- Un grand nombre des paires d'amorces SSR sont disponibles.
- Rentable par génotype et amorces (similaire à ceux des RAPD). (**Viktor Korzun, 2002**)

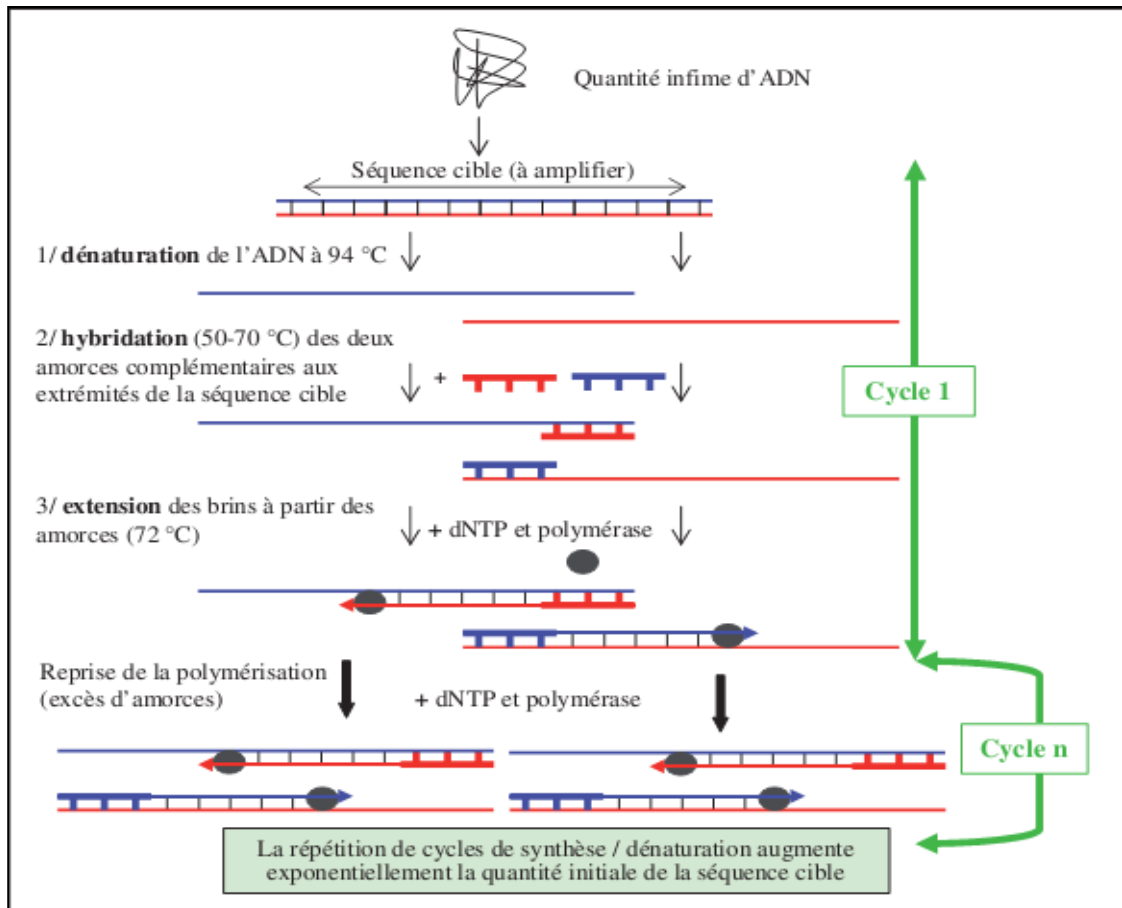


Figure 4 : Schéma représentant les diverses étapes de la réaction en chaîne de polymérisation de l'ADN (PCR) (Moulet *et al.*, 2008)

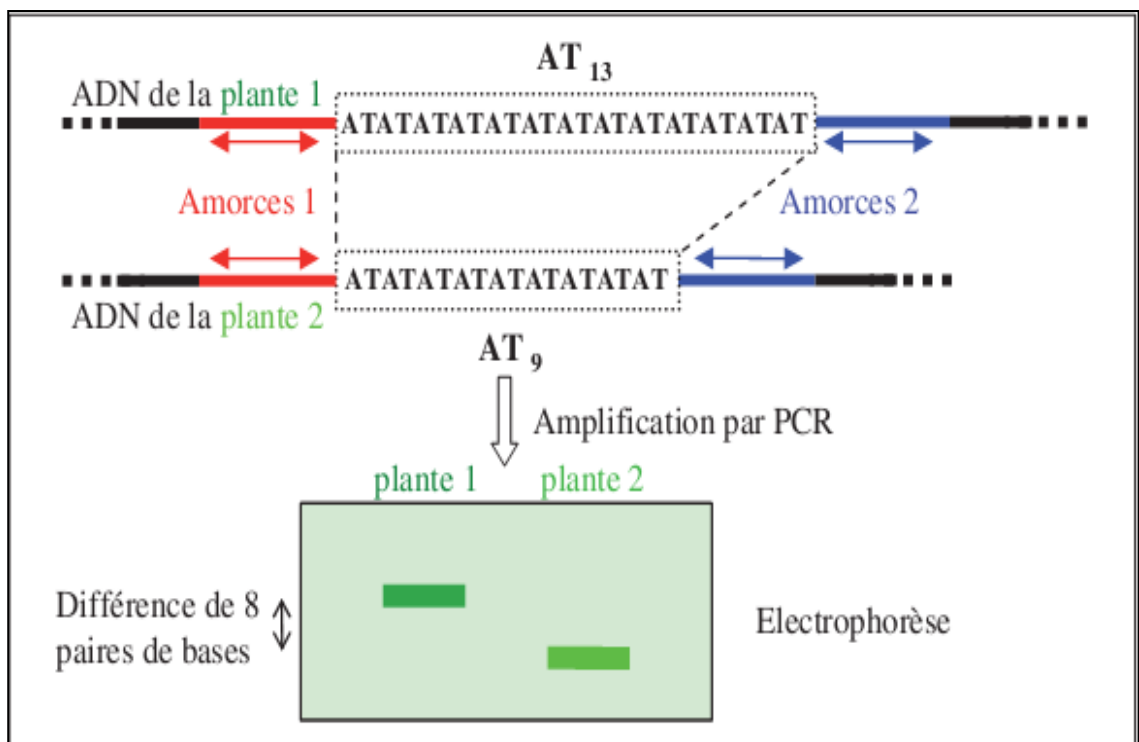


Figure 5: Exemple d'un marqueur de type microsatellite SSR (Moulet *et al.*, 2008)

V. Objectif de la thèse

Afin d'augmenter et de créer la variabilité au sein de la population du blé dur et pour développer des variétés plus tolérantes au stress hydrique dans des délais plus courts. L'induction des mutations par des rayons Gamma et de mutagène chimique EMS a été le travail entrepris au niveau du laboratoire BGGV à l'université des frères Mentouri Constantine.

Dans ce cadre de travail une problématique a été établie. Le travail expérimental a abordé les points suivants :

- La première partie de ma thèse a été consacrée à la mutagenèse physique où ses effets ont été mis en évidence et les variétés les plus tolérantes au stress hydrique ont été sélectionnées par trois expérimentations :
- ✓ La première a été de mettre un système de culture hydroponique de six variétés traitées avec différentes doses de rayons Gamma. Des travaux préliminaires se sont principalement orientés sur l'effet des rayons Gamma sur les racines et les feuilles du blé dur après culture hydroponique, les caractéristiques du système racinaire jouent un rôle dans la résistance au stress hydrique, car un système racinaire extensif peut exploiter un grand volume du sol par la suite absorber une quantité d'eau suffisante, ainsi que la partie aérienne qui sera bien développée si la plante absorbe plus d'eau. C'est dans ce contexte que cette partie a été faite.
- ✓ L'essai sous serre a été mis en place après irradiation des six variétés de blé dur avec des doses différentes de rayons Gamma, où un stress hydrique a été induit à la quatrième feuille par arrêt d'arrosage 8 jours, des indicateurs pour mettre en évidence l'état hydrique de la plante ont été utilisés. Comme la teneur relative en eau, où les plantes les plus tolérantes à la sécheresse maintiennent une TRE plus élevée. Un autre indicateur de tolérance est le taux de la chlorophylle qui apporte des informations complémentaires du comportement de la plante vis-à-vis le stress hydrique, sa chute est la conséquence de la réduction de l'ouverture des stomates ce qui laisse la plante hydratée en limitant les pertes en eau. Concernant le potentiel osmotique qui a été étudié au cours de ce travail de thèse comme paramètre de tolérance au stress hydrique, où sa diminution est l'une des réponses prononcées au stress hydrique. L'une des techniques de criblage pour la résistance au stress la température foliaire a aussi été utilisée dans cette étude, les plantes les plus tolérantes ont une température foliaire basse elles ont plus de capacité à extraire l'eau du sol et à se rafraîchir.

- ✓ Une expérimentation *in vitro* à été faite a fin d'étudier l'effet du mutagène physique par les rayons Gamma Co60 sur des cals embryogénique. la technique de mutation en association avec la culture *in vitro* fournissent une puissante technologie pour l'amélioration des plantes propagés, cela permet la production de grandes populations dans un petit espace, les chances d'avoir une mutation via la culture *in vitro* sont plus grande que la mutation induite seule(variation soma clonale+mutagenèse).
- Dans un second temps la mutagenèse chimique par l'EMS à été abordé, la mutagenèse été appliquée sur des graines de trois variétés de blé dur avec différentes concentrations d'EMS. Les mutagènes chimiques par leurs similitudes ou leurs réactivité avec certains constituants chimique du matériel végétal provoque des altérations des ADN et ARN. L'EMS est un agent d'alkylation particulièrement efficace car il forme des liaisons avec des nucléotides les obligeant à altérer les bases complémentaires. En vue de déterminer l'effet du mutagène sur les différentes variétés traités et contrôles, la capacité de germination, la longueur de la tige, le rendement et ses composantes été les différents paramètres étudier sur la M1 au cours de cette partie de travail. On a récolté la M2 qui à fait l'objet d'une analyse des protéines et analyse moléculaire.
 - Dans un troisième temps une analyse par SDS-PAGE des protéines foliaire après irradiation des graines de six variétés avec différentes doses ainsi que trois variétés traitées avec l'EMS avec différentes concentrations de la première et deuxième génération (M1 et M2) et induction du stress hydrique par le PEG6000 dans le milieu de culture. L'agent osmotique PEG à été utilisé en culture hydroponique car il présente l'avantage de ne pas être absorber par les tissus de la plante, il serait l'agent le plus proche d'un arrêt d'arrosage dans la terre. Le profil des protéines nous donne plus d'informations sur l'effet de la mutation entre les différents traitements et variétés, si la mutation touche le gène, une modification survient au niveau des bases qui après transcription et traduction changera la protéine initiale.
- Cette thèse à eu aussi pour but de mettre en évidence la variation que les mutations ont induisent, le polymorphisme à été révélé par le marqueur moléculaire SSR. L'ADN de tous les échantillons à été extraites par l'extraction CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) à partir des feuilles, et ont été amplifiés par douze amorces Les microsatellites peuvent fournir une méthode efficace pour caractériser la variabilité génétique induite artificiellement dans les plantes. Car ils servent souvent à modifier les gènes avec lesquelles ils sont associés, donc si la mutation touche les SSR elle changera le gène qui vient en aval, et par la suite changer sa fonction.

.

Matériels et méthodes

I. Expérimentation 1 : Mutagenèse physique

Cette partie de la thèse consiste à déterminer les effets des rayons Gamma sur des variétés de blé dur, locales et introduites, avec différentes doses. Cette étude comporte trois essais qui visent à étudier de nombreux paramètres. Ces derniers vont permettre de sélectionner les variétés les plus tolérantes au stress hydrique. Un essai est conduit dans une serre en conditions contrôlées, deux autres dans une chambre de culture en milieu hydroponique et un essai *in vitro*.

I.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est formé de six variétés de blé dur (*Triticum durum*. Desf.) (Locales et introduites) (Tableau 3), fournies par l'institut technique des grandes cultures (ITGC) El khroub Constantine

Tableau 3 : Origine des différentes variétés

Géotypes	Codes	Origines	Essais
Waha	W	Algérie F cymmyt	1, 2, 4, 5
Djnahkhotifa	DK	Tunisie	1, 2, 3,4, 5
Benimestina	BM	Algérie ICARDA	1, 2,3, 5
Mridj	M	Algérie	1, 2, 5
Ghoumghoumrkham	GGR	Algérie	1, 2, 5
Gta/dur	GDUR	Mexique cymmyt	1, 2, 3, 4, 5

Essai 1 : Culture hydroponique (mutants Gamma)

Essai 2 : Culture sous serre (mutants Gamma)

Essai 3 : Culture *in vitro* (mutants Gamma)

Essai 4 : Culture sous serre (mutants EMS)

Essai 5 : Détermination des Protéines foliaire, et caractérisation moléculaire par les SSR

I.2. Conduite et organisation des essais

Trois essais contrôlés ont été menés pour cette mutagenèses ; le premier dans la chambre de culture (culture hydroponique), le second sous serre (*in vivo*), et le troisième *in vitro*.

I.3. Protocole expérimental

Les grains des six variétés ont été irradiés avec différentes doses de gamma C60, trois variétés (DK, BM, GDUR) avec les doses : 10Gy, 25Gy, 50Gy, les trois autres variétés (W, M, GGR) ont été traitées avec les doses 100Gy, 180Gy, 220Gy avec une vitesse de : 2.84Gy/sec au centre COMENA à ALGER. Les grains irradiés et non irradiés utilisés dans

cette expérimentation ont été désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium 12% et rincés 3 fois avec de l'eau distillée.

I.4. Culture hydroponique

Cet essai a été réalisé en 2012, et deux autres répétitions ont été réalisées en janvier 2013 et avril 2013 pour confirmer les résultats obtenus lors du premier essai.

I.4.1. Pré germination

Les grains sont mis en pré germination dans des boîtes de Pétri (30 grains/BP), ces dernières sont placées dans un incubateur pendant 5 jours à 20°C. L'expérience est réalisée dans un dispositif complètement aléatoire et est répétée 3 fois (**Petersen, 1985 Petersen, R., 1985**).

I.4.2. Mise en culture hydroponique

Les grains germés ont été placés dans des tubes stériles contenant le milieu de culture Knops (tableau 4), (trois répétitions pour chaque traitement), les tubes sont mis dans une chambre de culture (à 25°C la journée et 16°C la nuit) ou la température et la photopériode étaient de 25°C la journée et 16°C la nuit (**Hayek et al., 2000**)

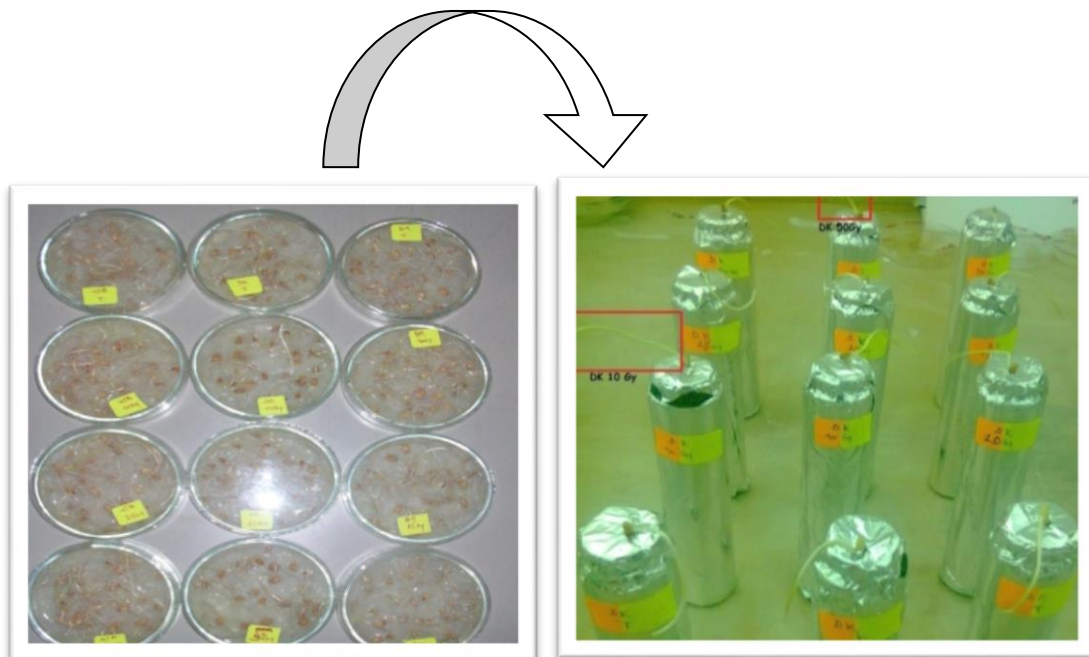


Figure 6 : Culture hydroponique après une semaine de la variété Djenahkhotifa

Tableau 4: Composition du milieu de culture KNOPS(El-Hamdouni *et al.*, 2000)

Eléments	Quantité (g/l)
Ca(NO ₃) ₂	1.00
KNO ₃	0.25
MgSO ₄	0.25
KH ₂ PO ₄	0.25
FeCl ₃	0.001

I.4.3. Mesures effectuées

Les caractéristiques du système racinaire jouent un rôle dans la résistance au stress hydrique s'ils sont bien développés avant même l'installation du déficit hydrique. Car un système racinaire extensif peut exploiter un grand volume du sol, par la suite absorber une grande quantité d'eau et avoir un bon rendement. Cette absorption dépend de la longueur des racines, du volume racinaire et le poids de ces racines ainsi que les parties aériennes qui nous donnent un aperçu de l'état hydrique de la plante. Si la plante absorbe plus d'eau les feuilles sont plus développées et ont une matière sèche plus grande. Dans ce contexte les paramètres mesurés sont celles des racines et des feuilles.

Le taux de germination : Les graines germées sont notées dans une base quotidienne et la vitesse de germination est déterminée selon la formule suivante (**Chiapusioet al., 1997**)

$$S(\text{seeds day-1}) = (N_1 \times 1) + (N_2 - N_1) \times 1/2 + (N_3 - N_2) \times 1/3 + \dots + (N_n - N_{n-1}) \times 1/n$$

Avec N₁.N₂.N₃...N_n le nombre de grains germés observé après 1.2.3...n jours

Le nombre de grains germés en 5 jours est utilisé pour déterminer la GC (**Chiapusio et al., 1997**):

$$CG\% = \text{nombre totale des graines germées} / 30 * 100$$

- **La longueur des racines :** C'est un paramètre plus fréquemment retenu, mesuré en centimètre à l'aide d'une règle plate. Répéter 3 fois.
- **La longueur des feuilles :** paramètre mesuré en cm. Répéter la mesure 3 fois
- **Le poids frais des racines et des feuilles :** mesuré en gramme à l'aide d'une balance.

- **Le poids secs des racines et feuilles:** exprimé en gramme, il a été déterminé après séchage à l'étuve à 60°C pendant 96 heures (**Heitholt 1989**).
- **Le volume racinaire :** exprimé en cm³, a été apprécié selon la méthode de **Musick et al. (1965)** en comparant les niveaux d'eau, avant et après immersion de la totalité des racines dans un volume d'eau connu.
- **L'indice mitotique :** étude de l'indice mitotique : les grains irradiés et les non irradiés ont été mis dans l'eau distillée pendant une heure dans la chambre de culture. chaque groupe de graines est ensuite transféré sur des boîtes Pétri durant 24 à 48 h à approximativement 21°C, les grains germés ont été pris par leurs tiges et les racines de 1 à 1.5cm sont coupés pour la préparation de l'indice mitotique. les racines sont traitées dans l'eau glaciale 24h puis fixée dans 3 :1 éthanol acide acétique pendant 24h, elles sont ensuite rincées 3 rinçages pendant 5 min chacune et transférées dans l'alcool 70% et gardées à 4°C jusqu'à utilisation. (**Yasemin Eroglu, 2007**)

Les racines sont hydrolysées dans 1NHCL pendant 6min à 65°C dans un bain marie, elles sont mises dans une solution de carmin acétique 1h et enfin les chromosomes sont mis en évidence par la technique Squash.

La fréquence de la mitose est déterminée chez les grains traités et non traités, par le comptage du nombre des cellules divisées dans un total de 100 cellules avec 3 répétitions.

- **Détermination de la teneur en chlorophylle :** la teneur en chlorophylle des plantes irradiées et non irradiées a été déterminée, les feuilles ont été homogénéisées dans de l'acétone 80% et centrifugées à 10000g pour 10min. le surnageant est utilisé pour la détermination de la chlorophylle avec le spectrophotomètre, à 646nm et 663nm. La teneur en milligramme par litre de la chlorophylle a (Ca) et b (Cb) a été déterminée selon la formule ci-dessous, après qu'elle soit exprimée en milligramme par gramme du poids frais du matériel végétal (**Kiong, 2008**)

$$\text{Chlorophyll } a, C_a = 12.25 (\text{OD}_{663}) - 2.79 (\text{OD}_{646})$$

$$\text{Chlorophyll } b, C_b = 21.50 (\text{OD}_{646}) - 5.10 (\text{OD}_{663})$$

$$\text{Chlorophyll totale, } C_a + C_b = 7.15 (\text{OD}_{663}) + 18.71 (\text{OD}_{646})$$

I.5.Culture sous serre

Cet a été réalisé en novembre 2014 sous serre des conditions semi contrôlées.

I.5.1. Préparation des pots et le semis

Les grains ont été mis en germination à l'obscurité, suite à laquelle le taux de germination a été relevé, les plantules sont transplantées ensuite dans des pots de 5 Kg qui ont été remplis par un mélange de sol agricole de la pépinière de l'Université Mentouri de Constantine et du sable dans les proportions 2 :1. Les pots ainsi préparés sont répartis à raison de 12 pots /génotypes. Pour chaque génotype 4 traitements et 3 pots/traitements sont définis. Dans chaque pot 6 plantes ont été repiquées ainsi nous avons eu 18 Plants / traitements /génotypes.

I.5.2. Induction du stress hydrique

Les pots ont été placés sous serre, ils sont irrigués régulièrement 2 fois par semaine jusqu'à l'obtention de la 4ème feuille, à ce stade le stress hydrique est appliqué par l'arrêt de l'irrigation pendant une semaine. Pour calculer ce niveau d'irrigation (80%) par apport à la capacité au champ du pot, nous avons pesé des pots contenant 5Kg de substrat sec utilisé dans l'expérimentation, P1 (P1 = poids de sol sec). En suite nous avons irrigué ces derniers jusqu'à saturation, tout en couvrant les pots à l'aide d'un plastique noir pour éviter l'évaporation de l'eau par la surface. Après 24h de repos, les pots sont pesés de nouveau P2 (P2 = poids à saturation). La différence entre P2 et P1 est la quantité d'eau retenue par le sol et qui représente la capacité au champ des pots. On estime la capacité au champ (C.C) par l'équation suivante :

$$C.C = (P2 - P1) / P1.100$$

Avec un témoin non irradié irrigué et un témoin irradié irrigué, ainsi nous aurons un témoin non irradié irrigué, un témoin non irradié stressé, et des irradiés stressées.

I.5.3. Paramètres étudiés

- **La teneur relative en eau (TRE « % »)**

Comme indicateur de l'état hydrique de la plante sous stress, la teneur relative en eau de la feuille a été déterminée par la méthode décrite par **Barrs, (1968)**. Selon cette méthode, les feuilles sont coupées à la base du limbe, elles sont pesées immédiatement pour obtenir leur poids frais (PF), pour chaque échantillon 3 répétitions ont été faites. Ces feuilles sont mises par la suite dans des tubes à essai remplis d'eau distillée et placés à l'obscurité dans un endroit frais, après 24h les feuilles sont retirées, passées dans un papier buvard pour absorber l'eau de

la surface, pesées de nouveau pour obtenir le poids de la pleine turgescence (PT). Les échantillons sont enfin mis à l'étuve régler à 80°C pendant 48h et pesés pour avoir leur poids sec (PS). La teneur relative en eau est calculée par la formule suivante (la formule de Clark et Mac-Caig, 1982) :

$$\text{TRE (\%)} = [(\text{PF}-\text{PS}) / (\text{PT}- \text{PS})].100$$

- **Mesure du taux de chlorophylle totale (TCT« unité de SPAD »)**

Le taux de chlorophylle au niveau des feuilles a été mesuré à l'aide d'un chlorophylle mètre SPAD 502 de Minolta (Nouri,et al.,2002). L'appareil a la forme d'une pince que l'on tient dans la main ; il est compact et léger et entre dans n'importe quelle poche. Il mémorise jusqu'à 30 mesures, qui peuvent être affichées une à une. Les valeurs classiquement retrouvées se situent entre 0 et 50 (unités SPAD). Le chlorophylle mètre est utilisé pour évaluer la teneur en azote des feuilles puisque la majeure partie de l'azote est contenue dans la chlorophylle. Il suffit de fermer la pince vide sur elle-même pour étalonner l'instrument. Par la suite, trois prises de mesure sont effectuées au niveau de la feuille sur trois différents (sommet, milieu, et base). La moyenne des trois valeurs s'affiche sur l'écran à la fin (unité SPAD). Sachant que le temps de chaque mesure est de l'ordre de deux secondes.

- **Potentiel osmotique**

Le potentiel osmotique tend à faire pénétrer l'eau du milieu hypotonique vers le milieu hypertonique. Il dépend de la concentration des solutés dans les cellules. Les mesures ont été effectuées sur des échantillons congelés. on extrait le jus, où on imprègne des disques de papier filtre de 6 mm, (chaque disque dans 10 µl). On insère les disques imprégnés dans l'osmomètre dont la fermeture initialise la séquence des mesures automatiques à l'aide d'une micropipette on prend 10 µl de ce dernier, avec les quelles nous allons imprégner les disques de papier filtre de 6 mm que nous allons insérer dans la chambre à échantillon de l'osmomètre. Dont la fermeture initialise la séquence des mesures automatiques. Avec trois répétitions pour chaque mesure.

Le potentiel est calculé par l'équation de Van't hoff, Suite à la lecture de la concentration de la solution en mmol/kg le Po est converti en mégapascal .

PO(Pa)= - RTC

R : 8.314 constantes des gaz parfaits

T : Température en K (22C =295,15K)

C : l'osmolarité qui à été donnée par l'osmomètre

Pa : Pascal

- **Température foliaire (thermomètre infrarouge)**

Avec le thermomètre infrarouge, on mesure la température de la 5ème feuille à 8h, 12h , et 16, pour calculer la température moyenne dans la journée.

I.6. Culture *in vitro*

L'essai de la culture *in vitro* a été réalisé en 2011, en chambre de culture avec des conditions contrôlées.

I.6.1. Matériel végétal

Le matériel végétal sur lequel la callogenèse a été induite consiste en des embryons matures de trois variétés de blé dur : GTA/DUR, Benimestina, et Djenahkhotifa

I.6.2. Mise en Germination

600 graines de chaque variété ont été stérilisées

- Mettre 5min dans l'éthanol 70%
- Rincer 3fois à l'eau distillée
- 20 min dans l'eau de javel 5%
- Rincer 8 fois à l'eau distillée stérile.
- Les graines sont mises dans des tubes remplies d'eau stérile, dans l'obscurité pendant 20heures dans la chambre de culture, les embryons matures sont par la suite extraits à partir des graines à l'aide d'un scalpel et une pince.

I.6.3. Induction de callogénèse

- ✓ Touts le matériel est stérilisé.
- ✓ Le milieu MS est préparé
- ✓ Transfert des embryons mature dans le milieu dans des boites Petri (7 embryons/boites)
- ✓ Laisser 20 jours à l'obscurité à 25°

- ✓ Le 21^{ème} jour les premiers repiquages des cals ont eu lieu
- ✓ Les cals sont par la suite mises dans la lumière photopériode 16/8. Pendant quatre mois, et chaque 20 jour le milieu est changé.



Figure 7 : Induction des cals à partir d'embryons matures



Figure 8: Descals de Djenah khotifa après six jours de culture

I.6.4. Induction de la mutation par les rayons Gamma

La mutation physique par l'irradiation gamma à été induite aux cals après 3 mois de maintenance dans le milieu de callogénèse, au centre nucléaire COMENA, avec différentes doses 10, 25 et 50Gy pour chaque variété, à un débit de 2.28Gy/min.

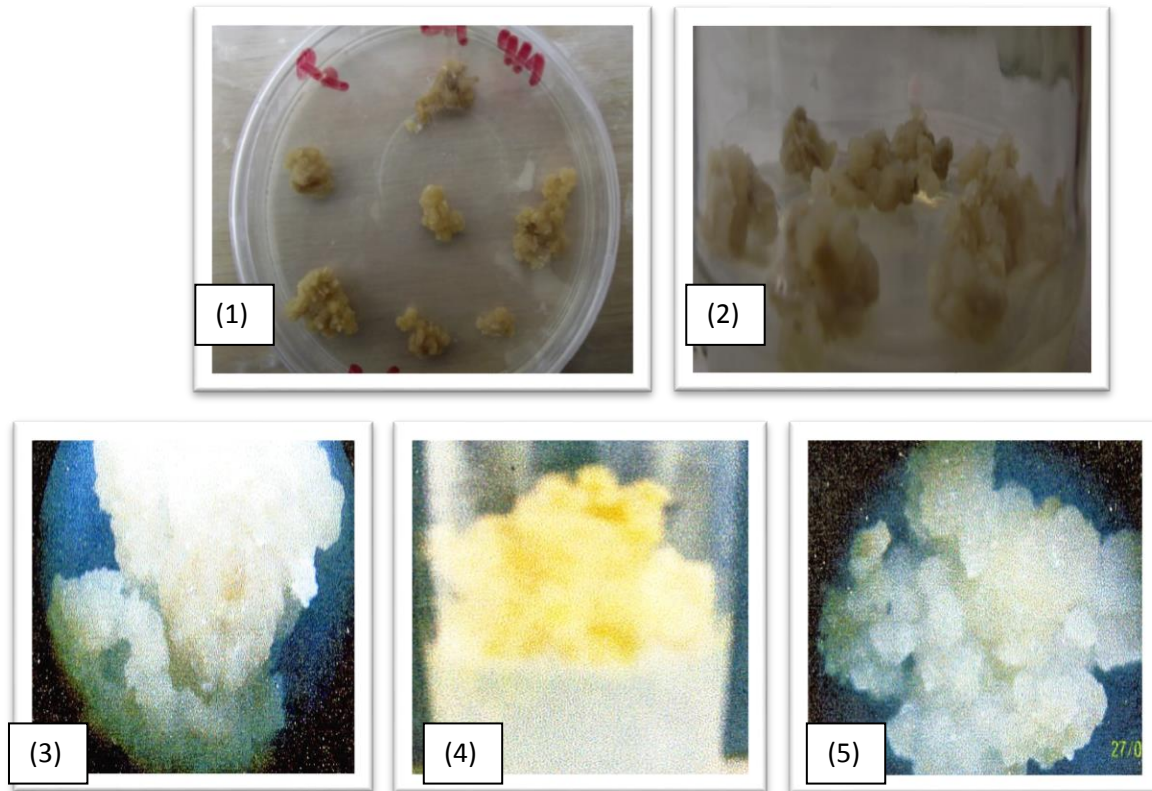


Figure 9 : (1) Des cals de waha après irradiation, (2) waha après un mois d'irradiation, (3) Gta/dur après trois mois de callogenèse par observation microscopique (3) , (4) Djenah khotifa après trois mois de callogenèse, (5) Gta/dur par observation microscopique après deux mois et demi de callogenèse .

I.6.5. Mesures étudiées

1) Pourcentage des cals

Le pourcentage de la callogenèse a été fait en comptant les cals induites parmi tous les embryons mis en culture.

- Poids frais des cals après irradiation.
- Les cals sont mesurées pour chaque traitement.

Les méthodes appliquées au matériel végétal muté avaient pour but de sélectionner les variétés les plus tolérantes en utilisant des indicateurs de tolérance au stress hydrique et de relever les différents effets de la mutagenèse physique sur le blé dur.

Quant a la partie qui suit, elle aura pour but de relevé l'effet de la mutagenèse chimique par l'EMS, et de récolter la M2 pour des essais ultérieurs.

II. Experimentation2 : Mutagénèse chimique

Cette deuxième expérimentation a été réalisée en 2012/2013, elle consiste en l'induction de mutation avec le mutagène chimique EMS, des traits morphologiques, le rendement et ses composantes ont été caractérisés suite à une culture sous serre, en vue de déterminer l'effet du mutagène sur les différentes variétés traitées et contrôlées sur la M1.

II.1. Matériel végétal

Le matériel végétal est formé de trois variétés de blé dur (*Triticum durum*. Desf.) (Locales et introduites), Waha, Djenah khotifa et Gta/dur (tableau.1), fournies par l'institut technique des grandes cultures ITGC El khroub Constantine

II.2. Mutagénèse

100 graines de 3 variétés (Gta/dur, Waha, Djenah khotifa) ont été placées dans des erlenmeyer avec 40ml de la solution Tween20 10%. les tubes ont été placés dans un agitateur pendant 15min à 112.5rpm après la solution a été éliminé, 250 ml d'eau de robinet ont été rajoutés pour laver les graines de l'excès de Tween 20. Les tubes ont été placés sur l'agitateur à 112.5rpm pendant 5min. l'eau a été éliminé et l'étape de rinçage a été refaite 3fois, un volume final de 250ml d'eau de robinet a été utilisé pour le traitement EMS (éthylméthansulfonate); 3 concentrations ont été appliquées (0.24% ;0.5% et 0.7%), avec le contrôle (0%) les tubes ont été mis sur l'agitateur à 112.5 rpm pendant 20h dans la chambre de culture, après ce traitement, les grains ont été rincés avec de l'eau de robinet pendant 3h et placés à (4°C) pendant 5 jours avant la prégermination.

II.3. Préparation des pots et semis

Les grains traités avec l'EMS ont été mis en germination à l'obscurité, les plantules sont transplantées ensuite dans des pots de 5 Kg. Les pots ont été remplis par un mélange de sol agricole de la pépinière de l'Université Mentouri de Constantine et du sable dans les proportions 2 :1. Les pots ainsi préparés sont répartis à raison de 20 pots /génotypes. Pour chaque génotype 4 traitements et 5 pots/traitements sont définis. Dans chaque pot 5 plantes ont été repiquées ainsi nous avons eu 20 Plants / traitements /génotypes

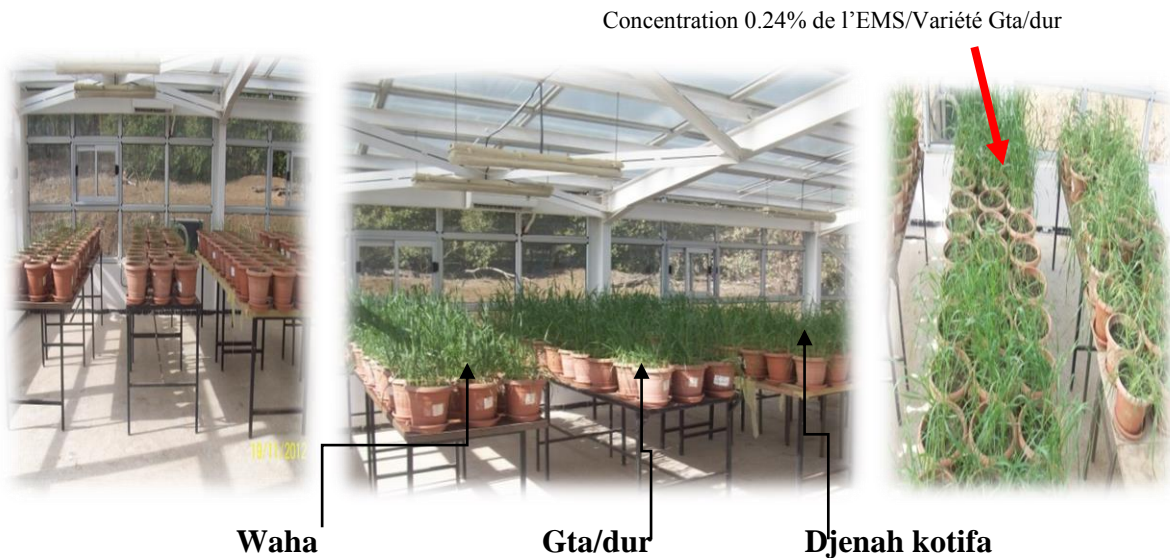


Figure 10 : Semis des graines mutés avec l'EMS sous serre

II.4. Paramètres étudiés

Les différents paramètres morphologiques mesurés sont :

- **La capacité de germination (CG)** parmi les 100 graines mises en germination les graines germées pour les différents traitements sont enregistrées après cinq jours.
- **La longueur de l'épi (LE)** On mesure un échantillon de 3 épis sans barbes / génotype, au stade maturité à partir de la base de l'épi (1er article du rachis) jusqu'au sommet de l'épillet terminal. Elle est exprimée en centimètres.
- **Les composantes du rendement**
 - **Le nombre d'épillets par épi (NE/E)** A maturité le nombre d'épillets par épi est compté pour indiquer le taux de fertilité de la plante.
 - **Le nombre de grains par épi (NG/E)** Il est obtenu par comptage direct d'un échantillon de 5 épis / génotype.
 - **Le poids de 1000 grains (PMG)** Ce paramètre est mesuré après avoir déterminé le poids moyen d'un grain par plante de chaque génotype, multiplié par 100 pour trouver le poids de mille grains.
 - **Le rendement en grains (RDT) :** le calcul du rendement en grains est effectué selon Vilain, (1987) comme suit :

$$\text{Qtx/ha} = (\text{nb moyen d'épis/ha}) \times (\text{nb de grains/épi}) \times (\text{P moyen d'un grain})$$

Qtx : quintaux, **nb** : nombre, **P** ; poids

Cette partie de thèse avait pour but de récolter la M2 des mutants EMS qui a fait l'objet d'une analyse des protéines après l'induction du stress hydrique, et élucider les effets des différentes concentrations de l'EMS sur la M1.

Les graines mutées par les rayons Gamma et les graines traitées avec l'EMS (la première et deuxième génération) ont été analysées par douze amorces microsatellites pour étudier le polymorphisme induit par les mutations.

III. EXPERIMENTATION 3 : Détermination du profil protéique par SDS-PAGE

A fin d'avoir plus d'informations sur les effets de la mutagenèse physique et chimique sur des plantes stressés au PEG 6000, on a eu recours à l'analyse des protéines foliaires par 1D SDS-PAGE des six variétés traitées au rayonnement Gamma et trois variétés traitées au mutagène physique EMS des deux générations (M1, M2).

III.1. Induction du stress hydrique au PEG6000

Les six variétés mutées aux rayons Gamma, ainsi que les trois variétés traitées à l'EMS ont été mises en culture en hydroponie. Après 3 semaines, un stress hydrique au PEG6000 à 15% a été induit aux 48 échantillons (contrôle des six variétés et mutants de Gamma, et contrôles des trois variétés et mutants EMS).

SDS-PAGE a été réalisée sur des extraits protéiques de plantules irradiées et non irradiées afin de déterminer le profil de poids moléculaire des protéines. La technique électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de SDS est réalisée selon la méthode de *Laemmli, (1970)* citée par *De Leonardis et al., (2007)*

III.2. Extraction des protéines totales

L'extraction des protéines totales des feuilles de blé dur se fait par la méthode (*De Leonardis et al., 2007*) comme suit:

-Broyage dans de l'azote liquide de 100mg de feuilles des 48 échantillons témoins et stressés à l'aide d'un mortier et d'un pilon, pesées le jour même. Ce matériel végétal ainsi préparé peut être stocké à - 20°C (*Zukas et Breksa, 2005*).

-Ajout de 1ml de la solution de précipitation au broyat (solution A (Annexe.1)) et homogénéiser dans un tube Eppendorf de 1.5ml. Laisser reposer pendant 1h à - 20°C.

-Centrifuger pendant 15mn à 4°C et à 13 000 rpm.

-Eliminer le surnageant délicatement en renversant le tube (le culot ne doit pas décoller).

-Laver les culots avec 1ml de la solution de rinçage (solution B (Annexe.1)).

-Laisser reposer 1h à - 20°C puis le surnageant est éliminé délicatement.

-Sécher les culots dans un dessiccateur pendant 15 à 30mn à 60°C, les réduire en poudre.

(Il ne faut pas qu'ils soient trop secs)

-Reprendre la poudre dans un volume de 100µl du tampon de solubilisation *Laemmli* buffer (Annexe.1).

-Passer au vortex, et afin de favoriser la dénaturation des protéines mettre les tubes 5 min à 100°C.

-Centrifuger les tubes Eppendorf à 10 000 rpm pendant 10mn à 20°C. Stocker à -20°C.

-Juste avant les dépôts, décongeler les échantillons, mélanger doucement et centrifuger à 1000 rpm pendant 10mn à 20°C.

III.3. Dépôt des échantillons et migration

-Déposer 40 µl d'échantillons par puits à l'aide d'une micro seringue. Un puits est réservé pour des standards de poids moléculaires connus (Annexe. 03) (dans chaque dépôt faire rincer la micro seringue avec le tampon de migration).

-Les cuves sont remplies de tampon de migration (Annexe. 03)

-Les électrodes de la cuve sont reliées au générateur. Une tension électrique de 80 mA a été appliquée entre les électrodes (**Dicko, 2006**). Une fois la migration terminée, il faut attendre jusqu'à ce que le front de BBP atteigne le bord inférieur des plaques (Approximativement 2-3 h).

- **Révélation des gels**

La révélation a été faite par coloration et fixation pendant toute une nuit dans une solution de coloration (Annexe 03). La décoloration a été réalisée par plusieurs rinçages à l'eau distillée.

IV. EXPERIMENTATION 4 : Analyse moléculaire par les SSRs

L'instabilité des microsatellites caractérisés par les mutations induites et les défauts de réparation des mésappariements dans une séquence répétée, fait de ce marqueur un excellent système de suivi efficace de mutation spontanée ou induite chez les plantes (Kashi, 2006).

Dans cette partie moléculaire de thèse, douze marqueurs SSR ont été utilisés à fin d'évaluer le polymorphisme que les rayons Gamma et l'EMS ont induit.

IV.1. Semis des graines en chambre de culture

L'étude moléculaire a porté sur 48 échantillons appartenant aux :

- Trois variétés de blé dur (Gta/dur, DK, BM) traitées aux rayons Gamma avec les différentes doses (0, 10, 25, 50Gy) ;
- Trois variétés de blé dur (Waha, GGR, M) traitées aux doses de rayons Gamma (100, 180, 220Gy)
- Et les trois variétés de blé dur des deux générations (Waha M1, Waha M2, Gta/dur M1, Gta dur M2, Dk M1, DK M2) traitées avec des concentrations différentes d'EMS (0, 0.24, 0.5, 0.7%).

Le semis des graines a été fait en chambre de culture, dans des pots de 1.5Kg remplies de téréot et terre (1/1) ; après une semaine de culture, les premières feuilles sont sujettes à une extraction d'ADN. Le travail a été réalisé au laboratoire de biotechnologie, biochimie et génomique végétale, université Mentouri Constantine.

IV.2. Extraction d'ADN au CTAB

Des cellules végétales peuvent être lysées en utilisant le détergent ionique cetyltriméthylammonium bromure (CTAB), qui forme un complexe insoluble avec les acides nucléiques dans un environnement à faible teneur en sels. Dans ces conditions, les polysaccharides, les composés phénoliques et les autres contaminants restent dans le liquide surnageant et peuvent être lavés. Le complexe d'ADN est solubilisé en élevant la concentration en sels et précipité avec de l'éthanol ou de l'isopropanol. Le principe de l'extraction de l'ADN selon **Doyle and doyle 1990** consiste en la lyse de la membrane cellulaire, l'extraction de l'ADN génomique et sa précipitation. (Protocole détaillé en annexe n° 4)

IV.3. Purification de l'ADN

IV.3.1. Dosage d'ADN sur gel d'agarose

Estimer rapidement la concentration d'une solution d'ADN par comparaison avec l'ADN de concentration connue (marqueur de taille)

Cette technique permet d'évaluer la qualité de l'ADN ainsi que sa pureté (présence de polysaccharides), elle permet aussi de comparer des ADN génomiques les uns par rapport aux autres.

- **Préparation du gel**

- Nettoyer les plaques et les peignes à l'éthanol 70% avec un kimwipe puis rincer avec l'eau distillée ultra pure (Eau up).
- Préparer un gel d'agarose à 0.8% (Ph) soit 0.8g d'agarose pour 100ml de volume final dans un tampon TBE 1X
- Faire fondre l'agarose au four à microonde (2 à 4 min) à puissance maximale, il est nécessaire de bien vérifier le gel d'agarose, qu'il soit complètement dissout (liquide claire, absence de particules en suspension)
- Refroidir le gel d'agarose fondu à une température de 50 à 60 C°. ajouter 1à2 gouttes de BET(intercalant qui permettra de visualiser l'ADN) et mélanger en agitant l'erenmnyer).
- Couler l'agarose dans la cuve préparée avec le peigne en évitant la formation de bulles d'air
- Lorsque le gel est refroidi et solidifié 20 à 30min, retirer les peignes de la plaque
- Placer la plaque dans la cuve d'électrophorèse
- Remplir la cuve de tampon de migration TBE 1X(400ml)

- **Préparation des échantillons d'ADN**

- **Préparation de l'ADN :** Ajouter 1/6eme de tampon de charge à chaque échantillon d'ADN et bien mélanger, prendre un nouveau cône à chaque fois (le tampon de charge permet d'alourdir les échantillons et de marquer le front de migration)
- **Dépôt des échantillons :** Déposer 5ul de chaque échantillon d'ADN dans les puits de gel en faisant attention de ne pas déchirer le fond du gel avec la pointe de la pipette

- Après chaque dépôt, effectuer un rinçage des pointes avec des pipetages successifs dans le tampon de migration, puis essayer sur papier absorbant
- Déposer 3ul de marqueur de taille
- **Migration sur gel** : fermer la cuve, brancher les fils et mettre sous tension, laisser migrer jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel (environ 20 à 25min à 100V)
- Couper l'alimentation et récupérer le gel dans son support.
- Visualiser les fragments d'ADN amplifiés sous UV
- Prendre une photo.

IV.3.2. Dosage d'ADN par NANODROP

L'utilisation des systèmes microvolume NanoDrop comme des alternatives concrètes et efficaces pour la méthode traditionnelle de quantification d'acide nucléique.

Le spectrophotomètre Thermo Scientific NanoDrop 2000 est un spectrophotomètre UV-Visible à spectre complet, utilisé pour quantifier et évaluer la pureté d'ADN, c'est le seul spectrophotomètre pour micro volumes disposant d'une technologie de rétention des échantillons contenus dans des volumes aussi petits que 0.5 µl. Pour commencer, nettoyer les surfaces supérieures et inférieures optique du système de rétention spectrophotomètre microvolume échantillon par pipetage 2 à 3 uL d'eau déminéralisée propre sur la surface inférieure optique.

1. Fermer le bras de levier, assurant que le piédestal supérieur vient en contact avec l'eau déminéralisée. Soulever le bras de levier et essuyez les surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux.
2. Ouvrir le logiciel NanoDrop et sélectionner l'application des acides nucléiques. Utiliser un petit volume avec une pipette calibrée pour effectuer un essai à blanc en mettant 1 ul de tampon sur la surface inférieure optique. Abaisser le bras de levier et sélectionner "vierge" dans l'application des acides nucléiques.
3. Une fois l'essai à blanc est terminé, nettoyer les deux surfaces optiques avec un chiffon propre, sec, non pelucheux.
4. Choisir la constante appropriée de l'échantillon qui doit être mesuré. (10 ng)
5. Les tableaux en Annexe présente les résultats donnés par le NanoDrop ainsi que les dilutions d'ADN

IV.4. Amplification PCR/SSR

IV.4.1. Choix des amorces

Les réactions d'amplification PCR de l'ADN ont été faites par 12 amorces microsatellites : **Wmc134 ; barc8 ; wmc264 ; wmc322 ; wmc24 ; wms6 ; wms124 ; wms 497 ; wmc177 ; wms131 ; X1 ; X2** disponibles sur le site Internet (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSR/WMC/>). En annexe 5 les rapports de chaque marqueur.

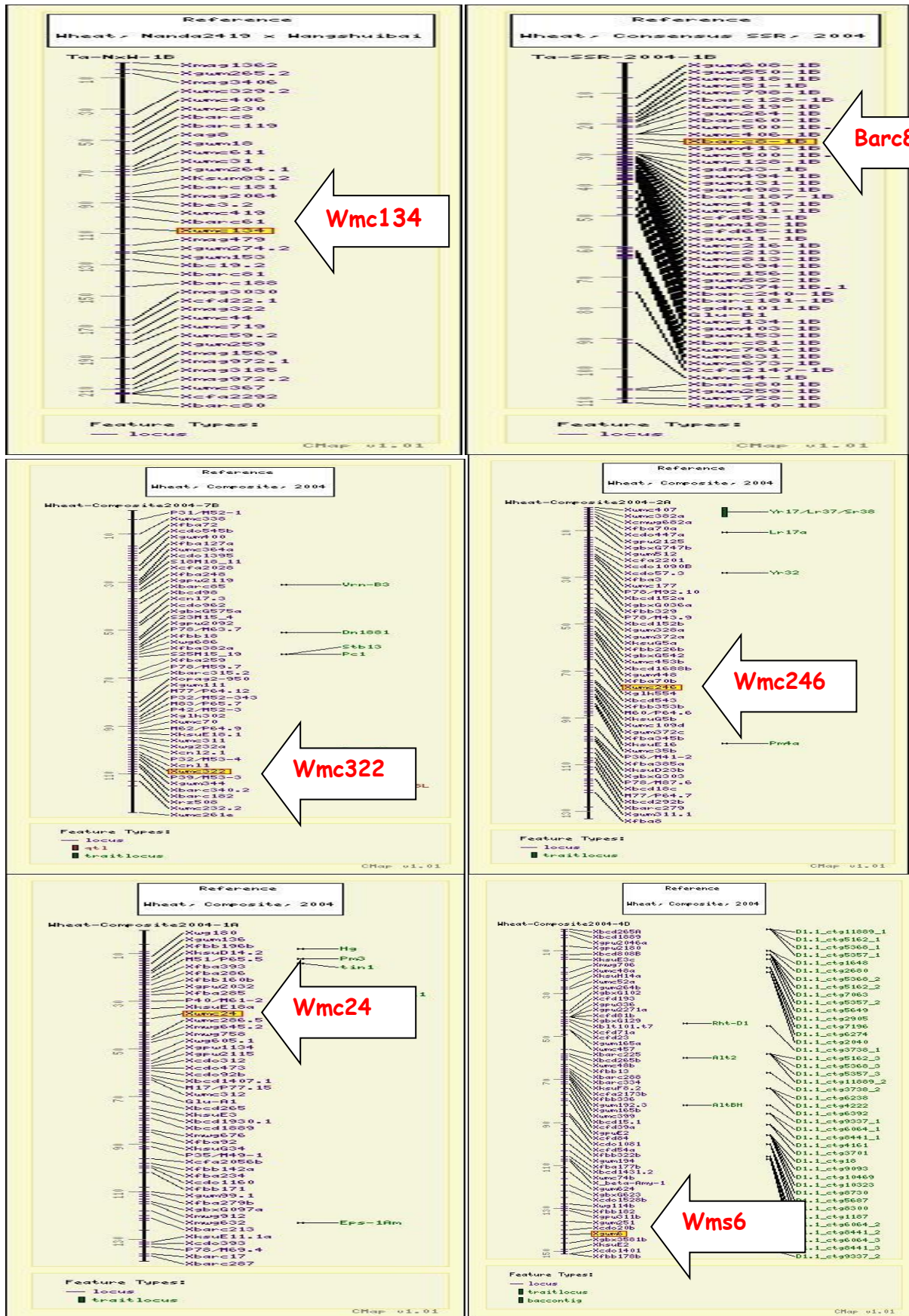


Figure 11 : La carte génétique des différents marqueurs microsatellites (wmc 134, barc8, wmc322, wmc246, wmc24, wms6) et les loci voisins (<http://wheat.pw.usda.gov/>).

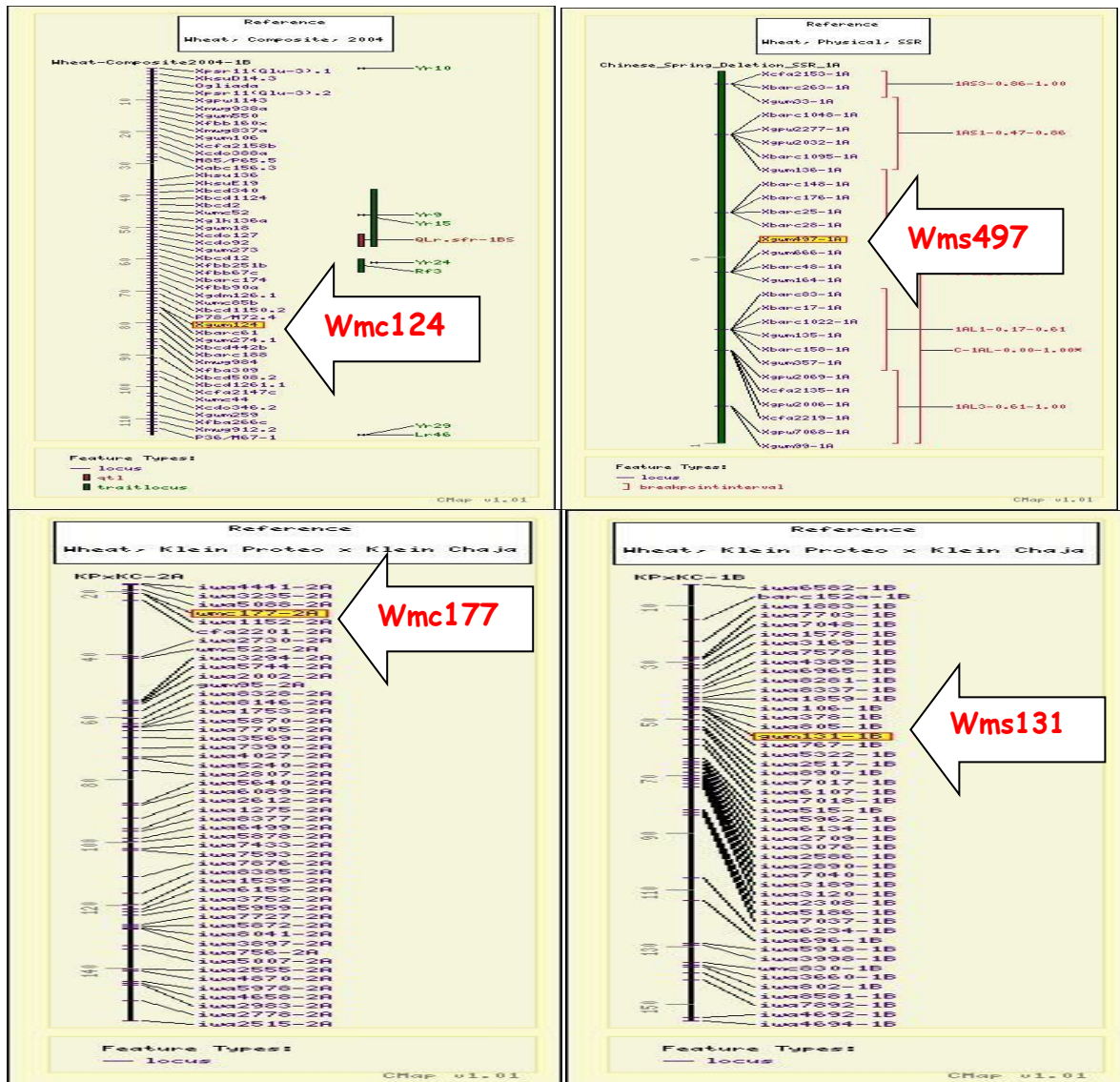


Figure 12 : La carte génétique des différents marqueurs microsatellites (wmc124, wms497, wmc177, wmc 131) et les loci voisins (<http://wheat.pw.usda.gov/>).

La réaction d’amplification a été réalisée dans un volume final de 20µl contenant 4µl d’ADN génomique de 10-20 ng , 10µl de master mix amplitaq ; 0.8µl GC enhancer , 1.2µl d’H₂O up , et 4µl d’amorce à 3µM.

Les réactions d’amplifications (PCR) ont été réalisées sur un appareil avec un programme comprenant 3 minutes de dénaturation initiale à 94°C suivies de 45 cycles pour wms et 35 cycles pour les autres de 1 minute de dénaturation à 94°C, une minute d’hybridation à T_a (Tableau 7), 2 minutes d’élargissement à 72°C et finalisée par une extension de 10 minutes à 72°C.

L’électrophorèse a été faite aussi bien sur gel d’agarose (3%) que sur gel de polyacrylamide (0.6%). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le 100 pb (Promega).

La révélation des bandes d'ADN amplifiées (coloration) a été faite par le bromure d'éthidium pour le gel d'agarose et le nitrate d'argent pour l'acrylamide.

Dans le tableau 6 nous avons reporté les séquences des amorces ainsi que la température d'hybridation pour la PCR.

Tableau 5: Programme PCR-SSR

Étape de la réaction pcr	temps	température	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	3min	94	-
Dénaturation	1min	94	Dépend des amorces*
Hybridation	1min	Tableau 6	
Extension	2min	72	
Extension final	10min	72	-

*Amorce wmc et barc 35cycles, amorce wms 45cycles.

Tableau 6 : Les séquences des marqueurs, leurs températures ainsi que leurs chromosomes

Amorce	Séquence	Tn C°	Chromosome
Wmc134	F : ccAAgcTgTcTgAcTgccATAg R: AgTATAgAccTcTggcTcAcgg	61	1B
Barc8	F : GCGGGAATCATGCATAGGAAAACAGAA R: GCGGGGGCGAAACATACACATAAAAACA	50	1B
Wmc264	F : cTccATcTATTgAgcgAAggTT R: cAAgATgAAgcTcATgcAAgTg	61	3A
Wmc322	F : cgccccAcTATgcTTTg R: cccAgTccAgcTAGccTcc	61	3B
Wmc24	F : gTgAgcAATTTTgATTATAcTg R: TAcccTgATgcTgTAATATgTg	51	1A
Wms6	F : CGTATCACCTCCTAGCTAAACTAG R: AGCCTTATCATGACCCTACCTT	55	1-4B
Wms124	F : GCCATGGCTATCACCCAG R: ACTGTTCGGTGC AATTTGAG	60	1B
Wms497	F : GTAGTGAAGACAAGGGCATT R: CCGAAAGTTGGGTGATATAC	55	1A
Wmc177	F : AgggcTcTcTTTAATTcTTgcT R: ggTcTATcgTAATccAccTgTA	51	2A
Wms131	F : AATCCCCACCGATTCTTCTC R : AGTTCGTGGGTCTCTGATGG	65	1B
X1	/	/	5B C
X2	/	/	5B C

IV.4.2. L'électrophorèse de l'amplification de polymérisation en chaîne de l'ADN (PCR)

- **Electrophorèse sur gel d'agarose 3%**

- ✓ **Préparation des gels**

Le gel préparé est de 3%, les gels ont été préparés dans une grande cuve, et une cuve Mupid.

- Pour la grande cuve on aura besoin de 8.1g d'agar pour 270ml TBE1x
- Pour la cuve Mupid on aura besoin de 3g d'agar pour 100ml de TBE1x

- ✓ **La préparation du TBE1x**

Avant de couler les gels on rajoute le BET, qui permet de visualiser les bandes avec les infrarouges et les photographier

- Pour la grande cuve prendre 13ul de BET
- Pour la cuve Mupid prendre 5ul de BET

- ✓ **Préparation des échantillons**

Le tampon de charge est ajouté aux ADN, qui permettent pour visualiser le trait de migration

- Pour la grande cuve on en prend 12ul d'ADN
- Pour la cuve Mupid on en prend 6ul d'ADN
- On a 6 parts, 1 part pour le tampon de charge 1/6, ce qui fait 4 ul de tampon

- **Electrophorèse sur gel d'acrylamide 6%**

L'objectif est de séparer des fragments d'ADN dénaturés selon leurs tailles sur gel d'acrylamide, ces gels sont utilisés pour séparer les fragments contenant un motif microsatellite.

Les gels acrylamides offrent une bonne alternative à la détection du polymorphisme des microsatellites, en effet la différence qui existe entre les individus est souvent limitée à un ou deux motifs soit quelques paires de bases. La résolution des gels d'agarose mêmes concentrés 3% n'est pas suffisante pour révéler un tel polymorphisme.

- ✓ **Préparation du gel**

Un gel est coulé entre deux plaques, une petite plaque de verre avec cuve, et une grande plaque de verre uniquement.

Il ne doit en aucun cas y avoir de contamination croisée de produits de traitement entre ces deux plaques sous peine d'avoir un gel de mauvaise qualité

- ✓ **Décontamination des plaques**

- Immerger les plaques pendant une nuit ou mieux un week end dans une solution de NAOH 0.2M (annexe)
- Sortir les plaques en les tenant par tranche et les mettre dans de l'H₂O Osmosés
- Rincer pendant 30min
- Recommencer le rinçage 3 fois en changeant l'eau
- Sortir les plaques de l'eau en les tenants par la tranche
- Les laisser s'égoutter en les posant verticalement (laisser sécher naturellement)
-

✓ **Préparation du gel d'acrylamide**

Préparation des solutions d'acrylamide (**annexe 4**)

V. Analyse des données

Les résultats de la première et deuxième expérimentation obtenus sont traités par des analyses statistiques multi variées.

- **Etude phréologique et morpho-physiologique**

- Analyse de la Variance (ANOVA)

Elle est réalisée à l'aide du logiciel (XLSTAT version 2013-6-04), le test statistique *fisher* LSD (différence significative minimale) ce test de comparaisons multiples a été utilisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes dans cette analyse de la variance

- **Exploitation des résultats de la troisième et quatrième expérimentation**

Le logiciel Ecap qui donne le poids moléculaire en fonction du marqueur du poids (FPM) est utilisé pour l'interprétation des gels, la présence des bandes est codée par « 1 » et leur absence par « 0 ».

Résultats et discussion

Mutagenèse physique

I. Effet de l'irradiation Gamma sur des graines de blé dur en culture hydroponique

I.1. Effet des rayons Gamma sur les paramètres morphologiques de la plante

Les résultats montrent que la dose 50 Gy n'a pas d'effet sur la capacité de germination des deux variétés Gta/dur et DK (Figure 14), tandis que celles irradiées avec les doses 25Gy et 10Gy augmentent la CG des grains irradiés comparés aux témoins, Ces mêmes doses n'ont pas d'effet sur la capacité de germination de la variété Bm.

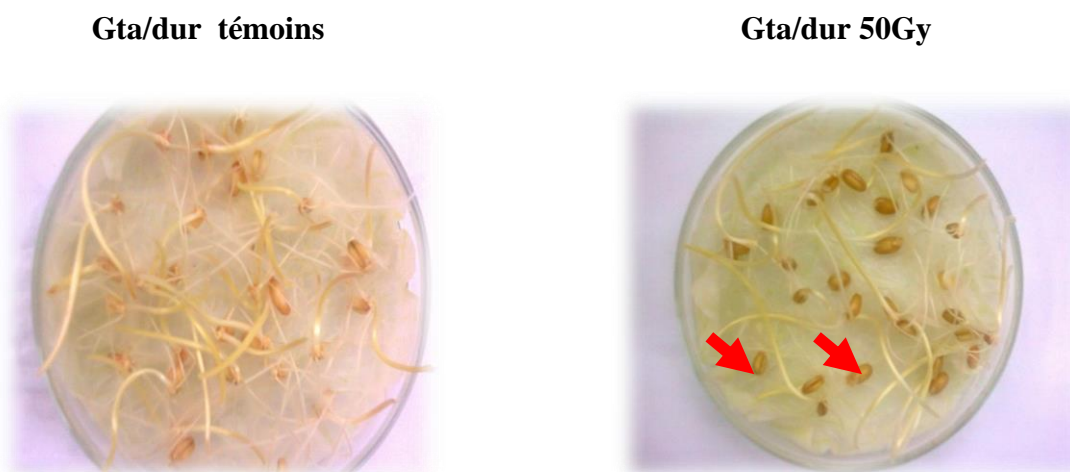


Figure 13 : Germination des graines de Gta/dur après 5 jours dans l'étuve

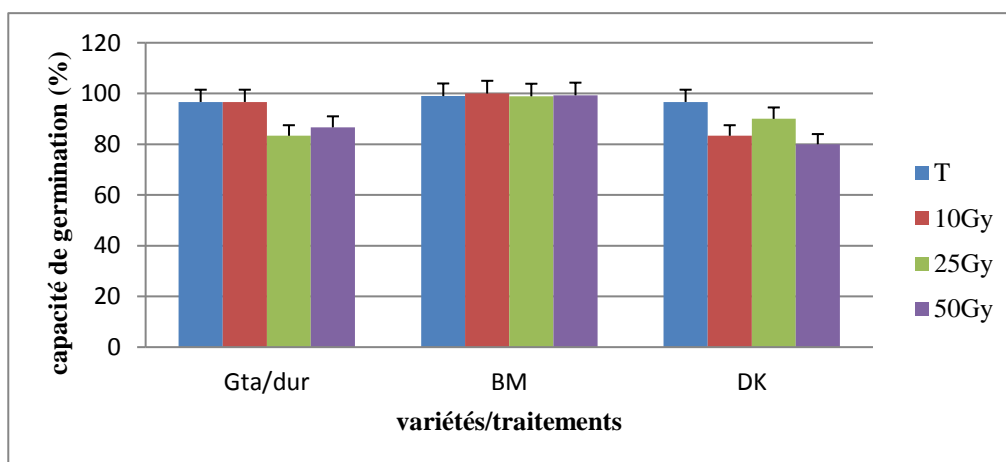


Figure 14 : Capacité de germination enregistrée chez les génotypes Gta/dur, BM, DK, traités avec les rayonnements Gamma.

Cette étude montre aussi que la dose 10Gy provoque une baisse dans la vitesse de germination chez les variétés Gta/dur et DK contrairement à la variété BM où cette dose augmente la vitesse de germination. (Figure 15)

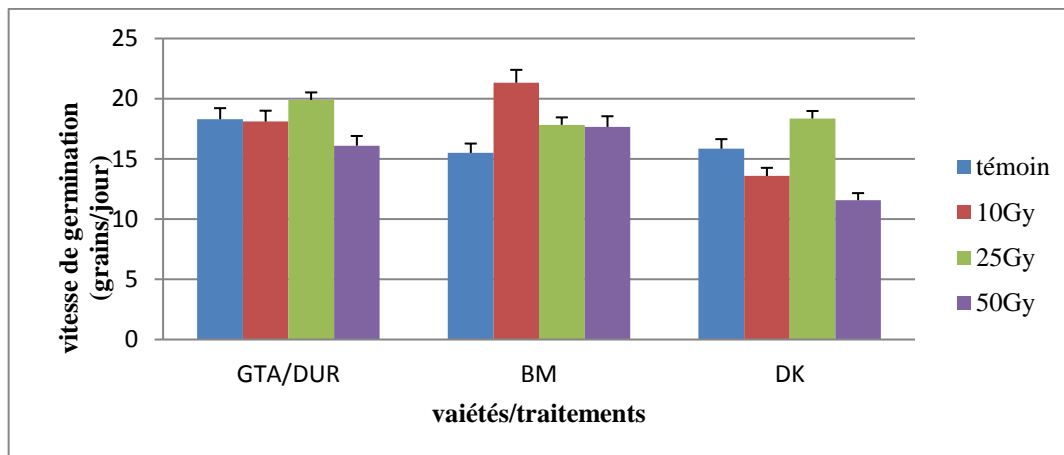


Figure15: Vitesse de germination enregistrée chez les génotypes Gta/dur, BM, DK, traités avec les rayonnements Gamma.

Les résultats des variétés traitées avec les fortes doses que la CG été différente chez les trois. Concernant la variété Waha, la germination des graines avec les doses 180Gy et 220Gy a été plus importante que celle du contrôle. Tandis que chez la variété GGR, les trois doses n’ont pas vraiment augmenté la CG. Chez la variété M, la dose 100Gy a augmenté la CG contrairement à la dose 220Gy qui a généré un taux faible de grains germés. (Figure 16)

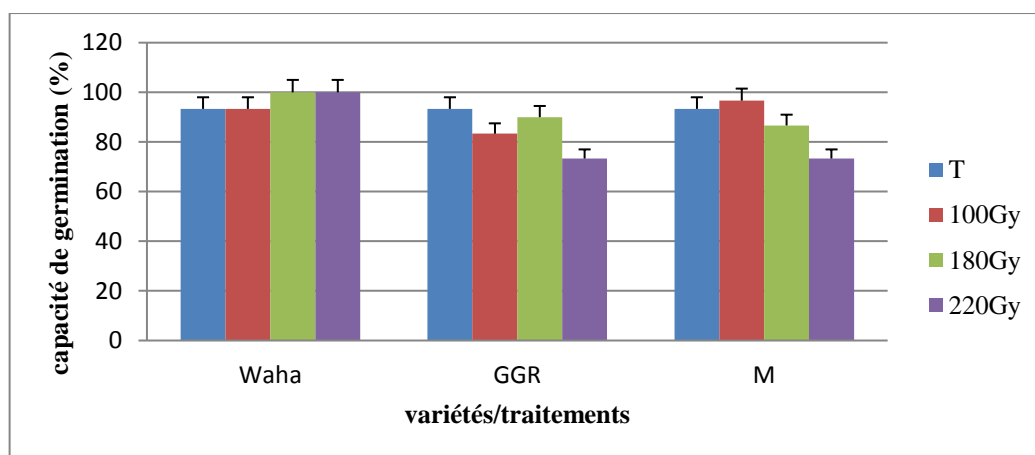


Figure 16: Capacité de germination enregistrée chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.

Les résultats de la vitesse de germination étaient en corrélation avec la CG, où la dose 180Gy était meilleure pour Waha et GGR ; tandis que pour la variété M la vitesse a augmenté chez les grains traités avec 100Gy. (Figure 17)

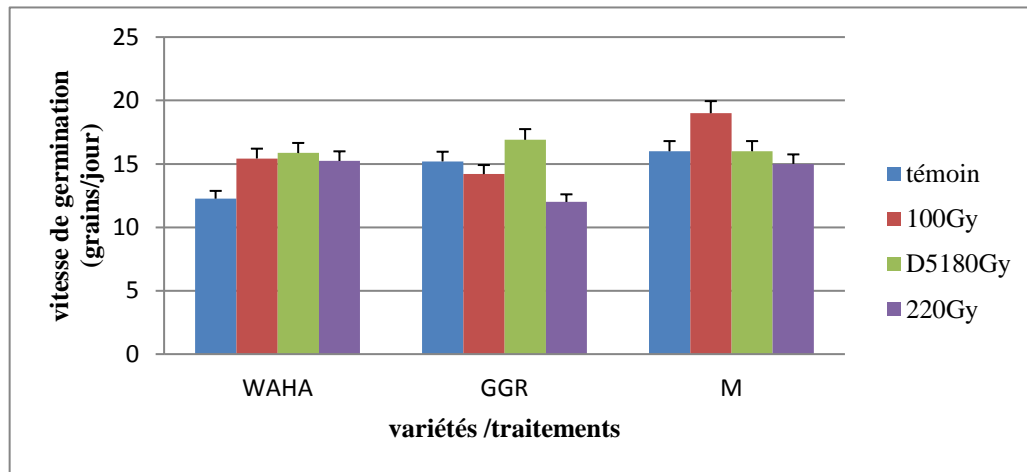


Figure 17: Vitesse de germination enregistrée chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.

Les résultats du milieu Knops indiquent que les grains traités avec 25Gy des variétés Gta/dur et DK génèrent une importante élongation des racines (Figure18) et une meilleure absorption d'eau, qui se traduit par un bon volume racinaire. Tandis que la dose 50Gy a provoqué une élongation racinaire chez la variété BM, ce qui était en corrélation avec le volume racinaire.

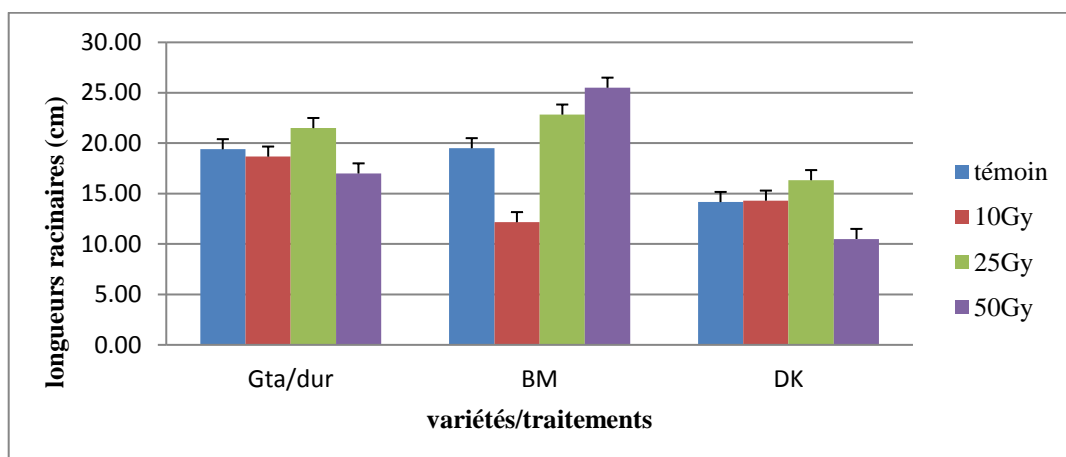


Figure 18: Longueurs des racines enregistrées chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.

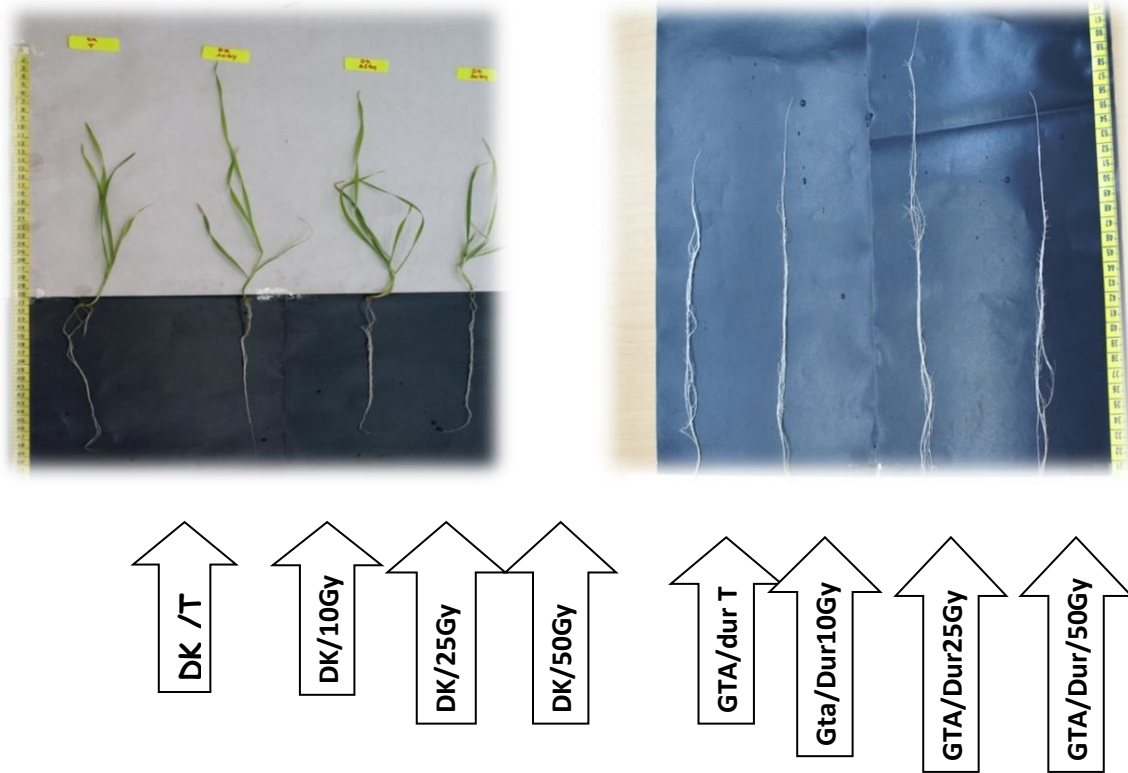


Figure 19 : Longueurs des racines de la variété Djenahkhotifa, et Gta/dur

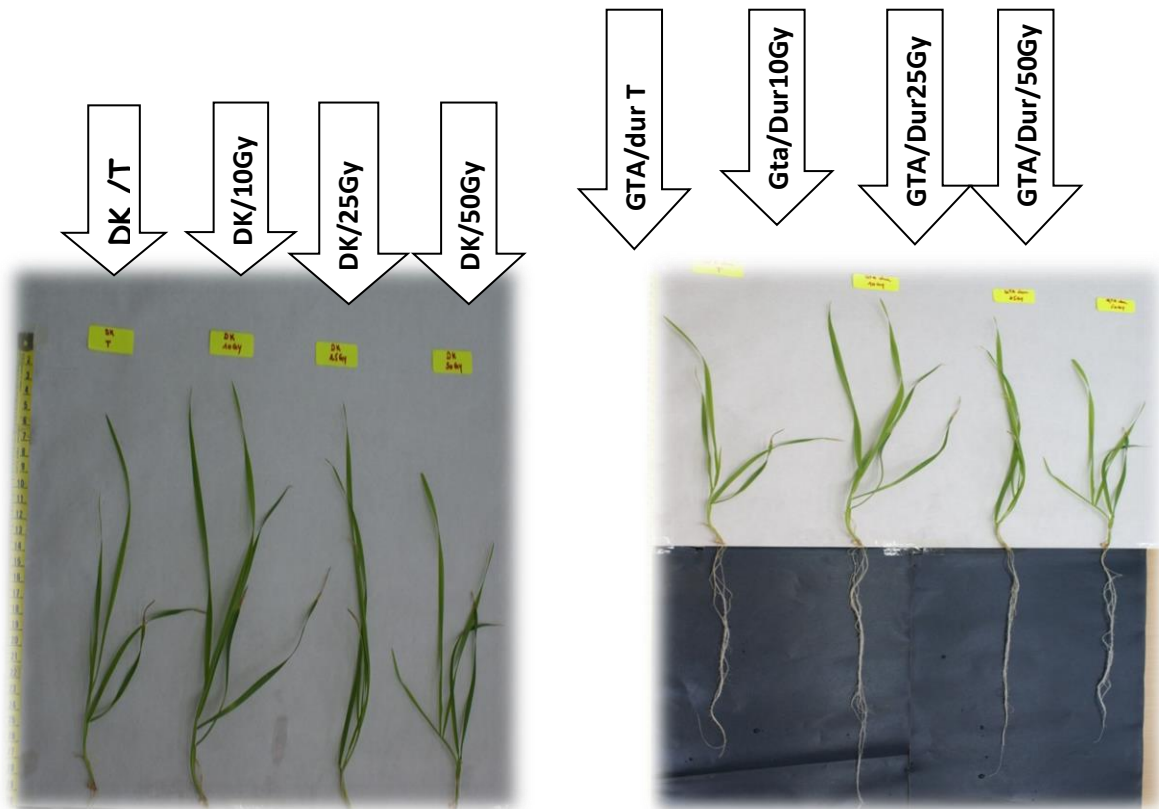


Figure 20: Longueurs des feuilles de la variété Djenah khotifa et Gta/dur

Quant à la variété Waha et M l'élongation racinaire a été interrompue avec les traitements Gamma de la dose 180Gy, contrairement à la variété GGR où cette dose a provoqué une élongation importante des racines (Figure 21). Ce qui a été confirmé par le volume racinaire où les grains traités avec cette dose absorbent plus d'eau.

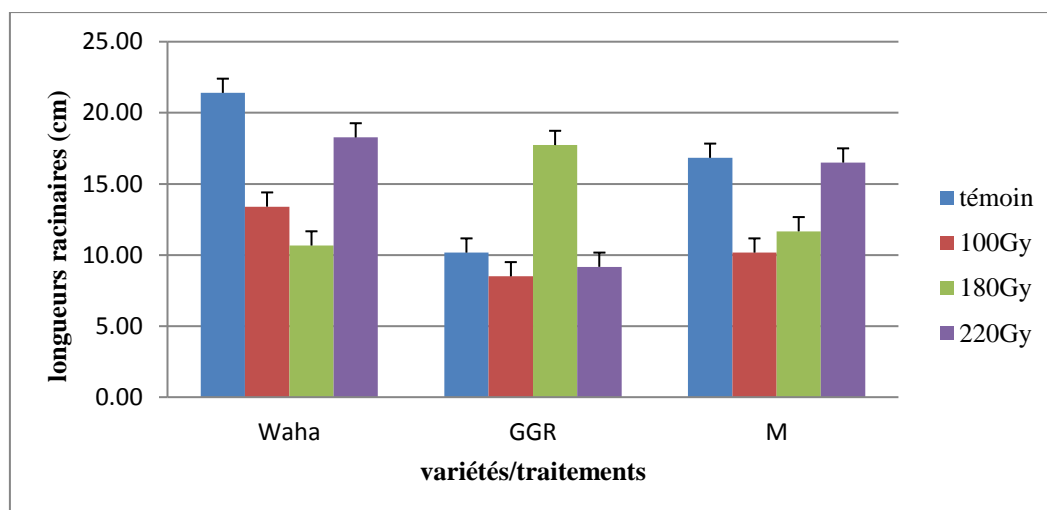


Figure 21: Longueurs des racines enregistrées chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.

L'effet de l'irradiation Gamma sur le poids des feuilles et des racines montrent une grande différence entre les variétés Gta/dur, BM, DK. Concernant les fortes doses (100, 180, 220Gy), elles ont inhibé la croissance de la plante. Aussi, on observe une différence entre les variétés traitées par les rayonnements Gamma et le contrôle. Le poids des feuilles et des racines était important avec la dose 180Gy par rapport aux autres doses, mais ils ont de petites racines par rapport au contrôle. (Figures de 22 à 29)

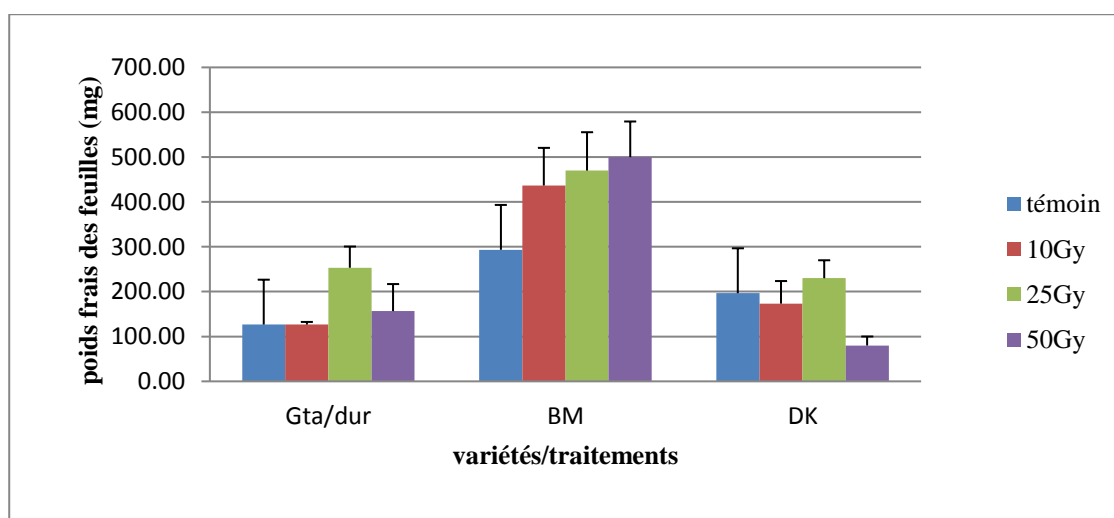


Figure 22: Poids frais des feuilles enregistré chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.

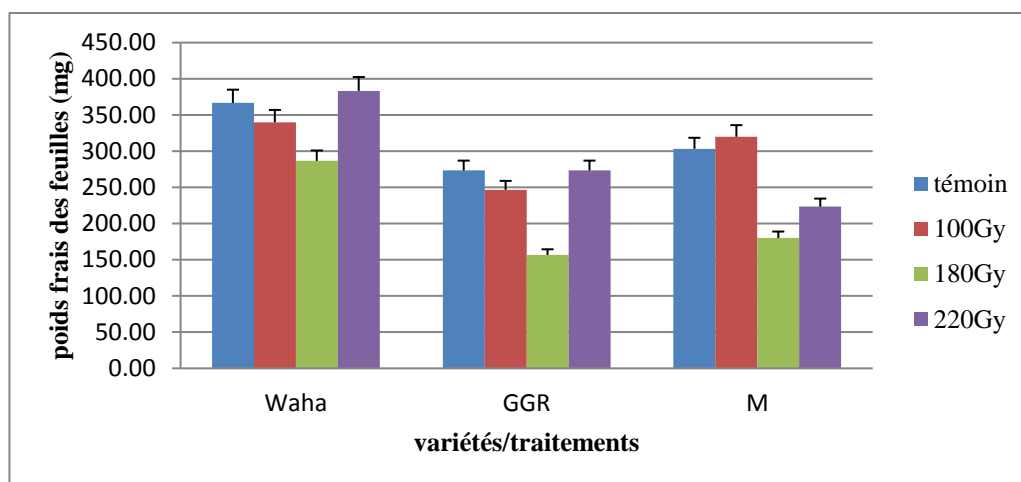


Figure 23: Poids frais des feuilles enregistré chez les génotypes Waha, GGR, M, traités avec les rayonnements Gamma.

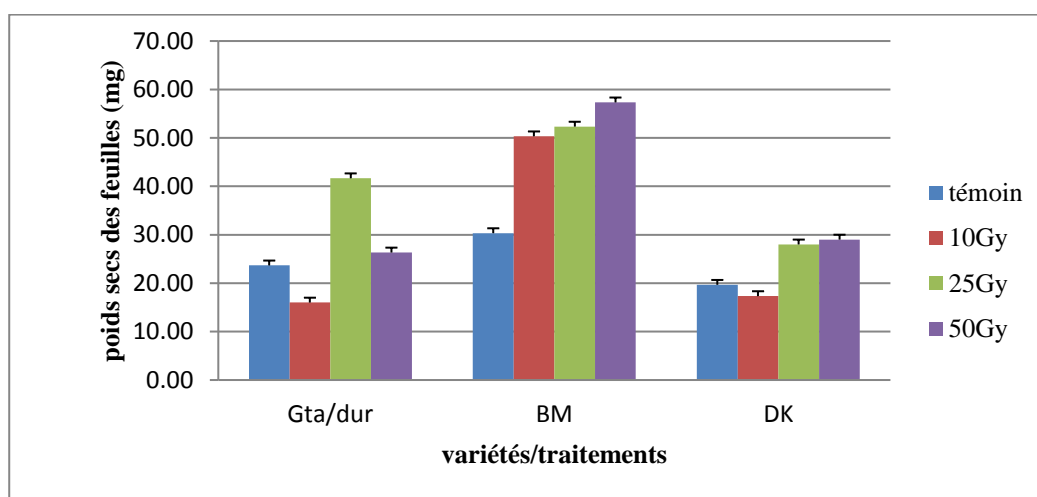


Figure 24: Poids secs des feuilles enregistré chez les génotypes Gta/dur ; BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.

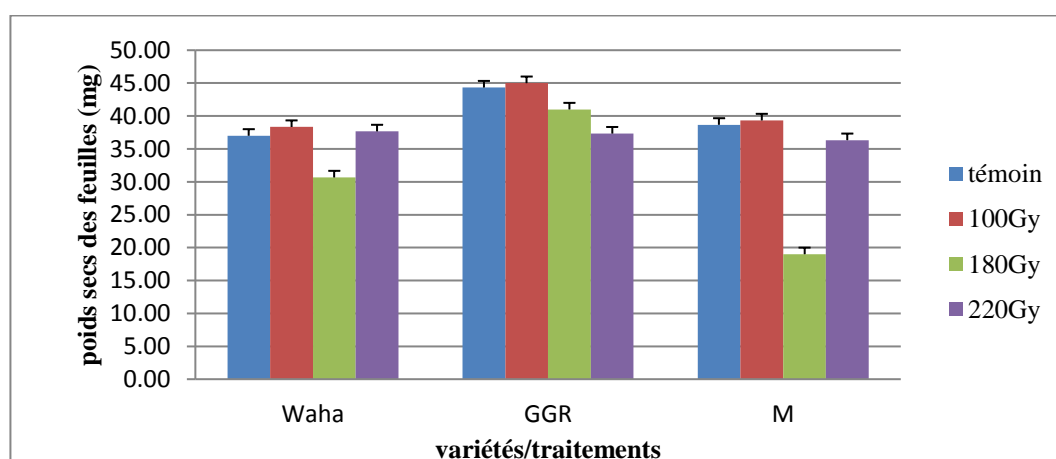


Figure 25: Poids secs des feuilles enregistré chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.

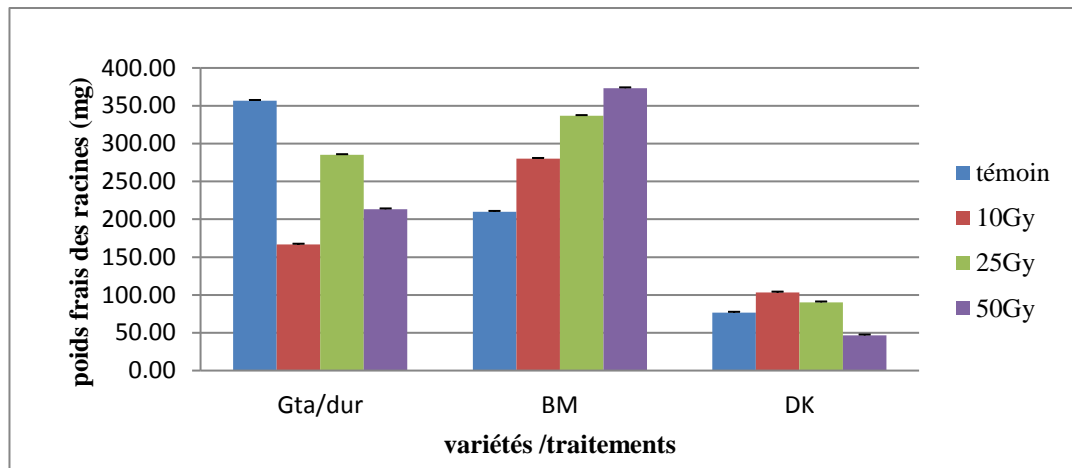


Figure 26: Poids frais des racines enregistré chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.

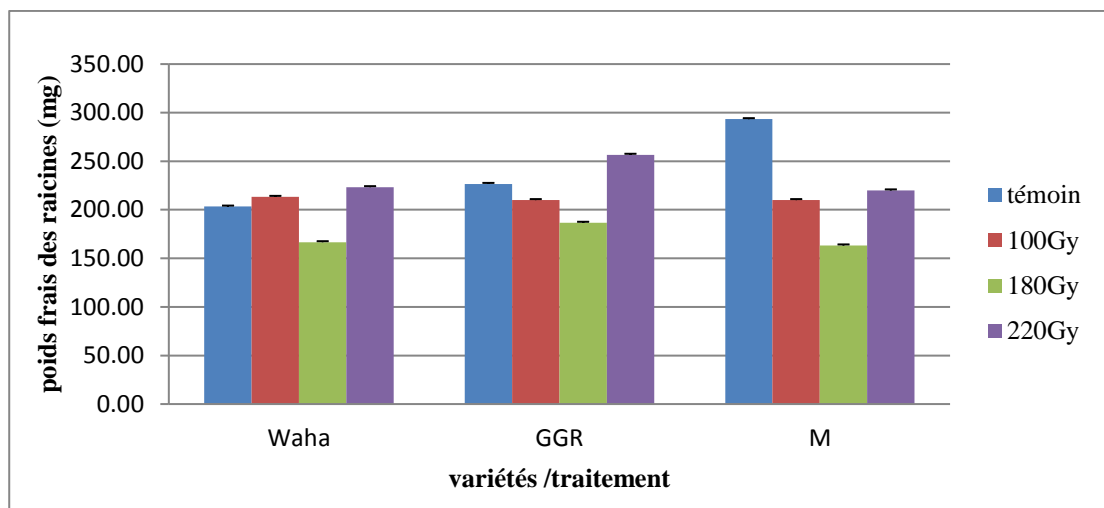


Figure 27: Poids frais des racines enregistré chez les Waha, GGR ; M traités avec les rayonnements Gamma.

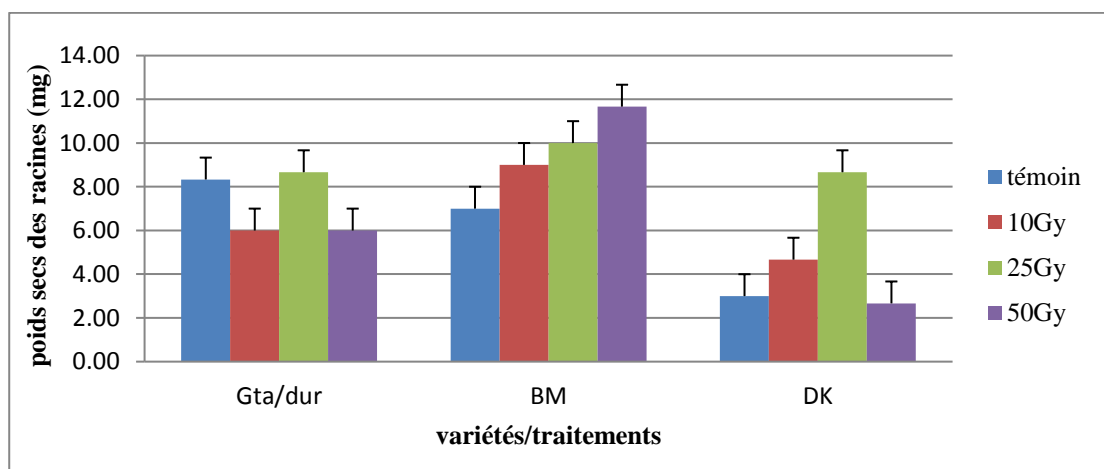


Figure 28: Poids secs des racines enregistré chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.

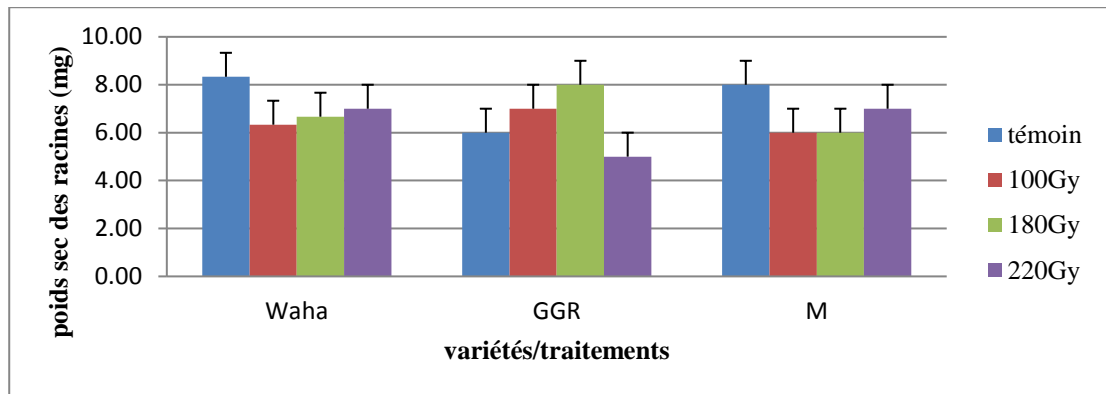


Figure 29: Poids secs des racines enregistré chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.

Le volume du système racinaire reflète une extension et/ou une ramification qui favorise une plus grande colonisation du sol, rendant l'eau plus accessible à la plante. Les variétés BM traité avec 50Gy et GTA mutées avec la dose 25Gy se distinguent par une augmentation du volume racinaire. La variété DK pour la même dose n'a pas montré d'augmentation. (Figure 30)

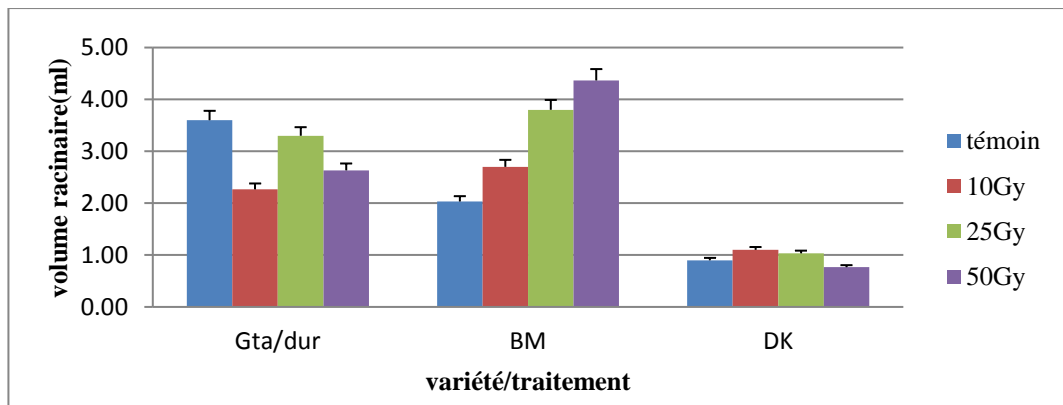


Figure 30: Volume racinaire enregistré chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.

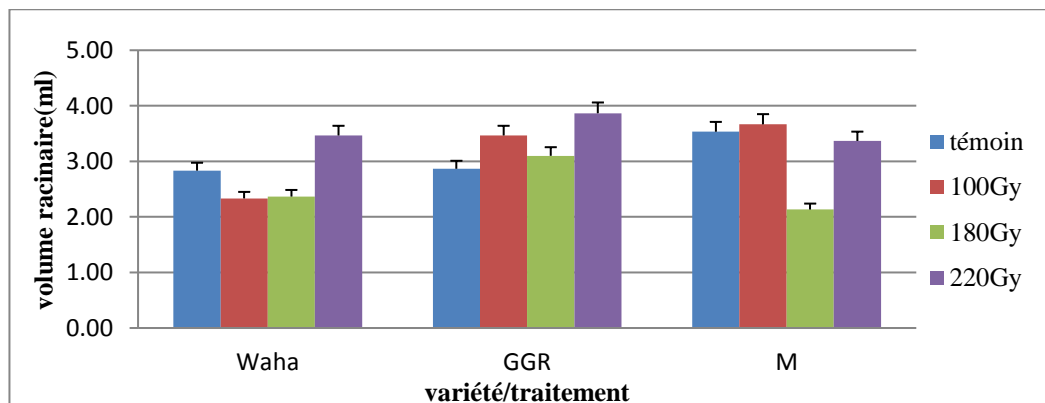


Figure 31: Volume racinaire enregistré chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.

Les résultats de cette étude permettent de mieux connaître le rôle de l'exposition du blé aux rayonnements pour la stimulation de l'élongation racinaire. La dose 25Gy augmente la croissance ainsi que la longueur et le volume racinaire du blé, améliorant ainsi l'absorption d'eau et des sels minéraux qui sont nécessaires pour la survie de la plante sous stress hydrique. La radio-stimulation trouvée dans cette étude pour les doses faibles n'est pas spécifique au blé: à la présence d'une faible dose de toxique, certains mécanismes d'autoréparation dans la cellule se déclenchent, qui une fois activés sont suffisants pour neutraliser l'effet initial de l'irradiation et également réparer d'autres défauts que les rayonnements n'ont pas provoqués. **Zaka et al. (2004)** a reporté que la différenciation cellulaire est accélérée par cette stimulation. Alors que l'effet de cette même stimulation sur l'activation des régulateurs de croissance auxine a été mis en évidence par **Guncken et Sparaw (1961)**. Ce qui est en adéquation avec nos résultats obtenus pour la dose 10 Gy, où la plante s'est autorégulée. Des résultats similaires ont été trouvés chez différentes espèces en les exposant à de faibles doses d'irradiation: *pinus sp.* (**Thapa, 2004**), *Anacardium accidentalis* (**Klarizze, 2005**), *Vitis vinifera* (**Charbajy et Nabulsi, 1999**), *Eruca vesicaria* (**Moussa, 2006**) et le blé dur (**Mongui et Salami 2008**).

La dose 25Gy augmente aussi la CG et la VG qui sont dues à la dénaturation avec les rayonnements Gamma des enzymes impliquées dans l'inhibition de la germination.

On remarque que pour les doses supérieures à 100Gy, les grains irradiés n'ont pas eu des différences significatives par rapport au contrôle, elles ont affecté la croissance des racines et des feuilles. Les résultats de **Kiong et al., (2008)** ont montré que les plantes qui ont survécu jusqu'à la maturité dépendent de la nature et de l'ampleur des dommages chromosomiques. L'augmentation de ces lésions est favorisée par l'élévation des doses de l'irradiation qui se traduit par une réduction de la croissance et de la survie de la plante. **Chaudhuri (2008)** a reporté qu'à de fortes doses d'irradiation, le pourcentage de germination ainsi que l'élongation des feuilles et des racines sont réduites, ce qui a été confirmé par notre étude. Le travail de **Chaomi et Yanlin (1993)** sur le blé tendre (*triticum aestivum*) a indiqué que le traitement des grains avec de fortes doses, réduit le pouvoir germinatif. Donc, l'irradiation augmente la sensibilité des plantes aux rayonnements Gamma, ce qui peut être causé par la réduction des régulateurs de croissance spécialement les cytokinines (**Kiong, 2008**). D'après l'étude statistique avec le test Fisher, on observe plusieurs groupes pour chaque paramètre (tableau 7 et 8).

I.2. Effet des rayons Gamma sur les paramètres cytogénétiques de la plante

Les résultats de l'indice mitotique du contrôle et des mutants (10, 25, 50Gy) et (100, 180, 220Gy) sont montrés dans le tableau 7 et 8. La plus grande fréquence d'IM est trouvée chez les contrôles ainsi que les mutants de 25Gy, contrairement aux doses plus fortes où a été enregistrée la plus basse fréquence (220Gy) (figure 32, 33). L'indice mitotique diminue à chaque fois que la dose des rayons Gamma augmente. L'étude statistique de ces résultats a démontré la présence de 8 groupes, où les mutants sont significativement différents par rapport au contrôle ($p \leq 0.05$).

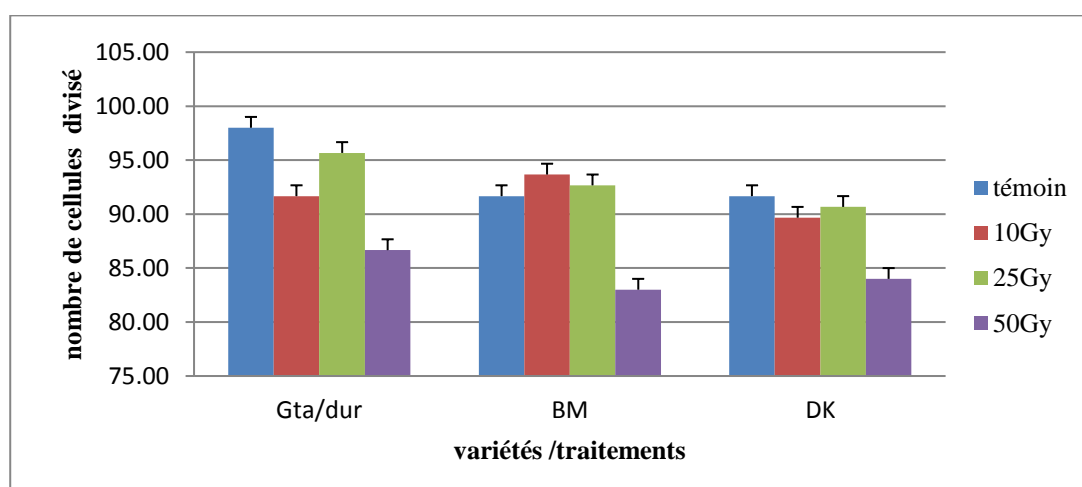


Figure 32: Indice mitotique enregistré chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma.

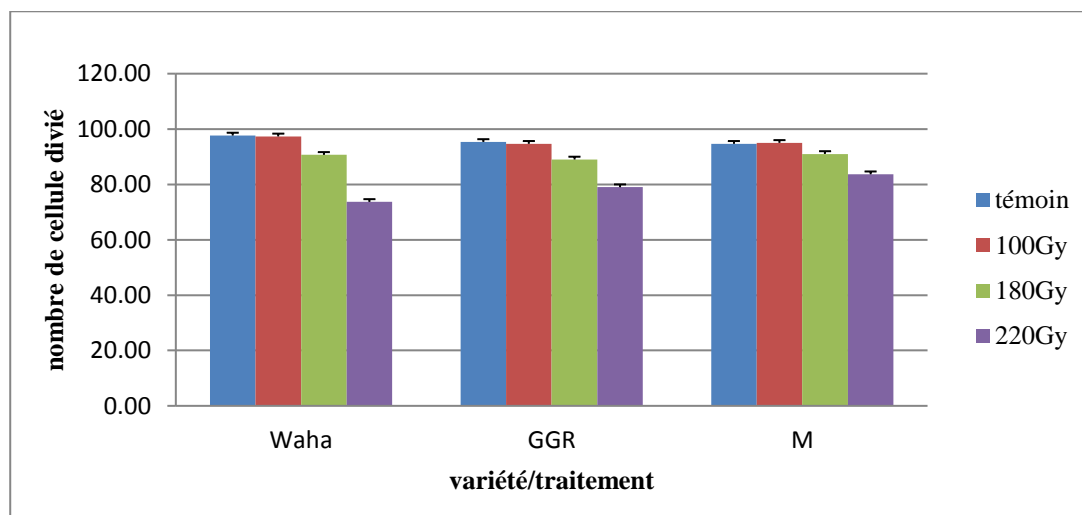


Figure 33: Indice mitotique enregistré chez les génotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma.

L'information génétique doit être la même chez toutes les cellules d'un organisme mais les mutations peuvent induire des variations causant ainsi des différences au niveau de ces cellules. Le test cytogénétique de l'indice mitotique est utilisé pour examiner les effets de la génotoxicité et de la mutagénèse dans différents environnements, ce test est utilisé pour caractériser les cellules proliférées et identifier le matériel qui inhibe ou induit la progression de la mitose. Dans cette étude, l'activité mitotique a été inhibée suite à l'irradiation par différentes doses des rayons Gamma sur les racines du blé dur. Les différences au travers des mutées et des non-mutées sont significatifs ($p \leq 0.05$) : l'augmentation de la concentration des rayons diminue significativement l'indice mitotique, cette augmentation du dosage a été montrée aussi chez *Hordeum vulgare*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Secale cereale*, ce qui a été présenté dans notre étude sauf pour la dose 25Gy où l'indice mitotique a stagné ou encore augmenté. Cette variation a été confirmée par l'élongation racinaire et le poids des racines.

L'inhibition des rayons Gamma de l'indice mitotique indique que les rayons Gamma ont un effet mutagène sur les racines du blé dur, ce qui a été montré chez *Hordeum vulgare* (Yasemin Eroglu, 2007). Ces résultats indiquent que les rayons sont capables de créer de nouveaux mutants à caractères désirés.

I.3. Effet des rayons Gamma sur la teneur en chlorophylle

Les résultats de la teneur en chlorophylle présentés dans les figures 33, 34, 35, 36, indiquent qu'il y a une différence significative entre les plantes des grains irradiés et le contrôle : la teneur en chlorophylle (a) et (b), était significativement augmentée chez les variétés BM et DK pour la dose 25Gy. Pour la variété Gta/dur il n'y a eu aucune différence. En ce qui concerne les doses fortes, la teneur en chlorophylle diminue pour certaines doses et augmente pour d'autres, comme chez la variété GGR avec la dose 100 Gy où la chlorophylle totale et les chlorophylles (a) et (b) augmentent. L'irradiation des graines tend à modifier le métabolisme et la capacité photosynthétique.

La teneur en chlorophylle (a) été supérieure que celle de la chlorophylle (b) chez les génotypes et groupes irradiés et non irradiés. les plantules exposées aux doses 25Gy chez BM et 100Gy chez GGR montrent des changements significatives des chlorophylles (a), (b) et la chlorophylle totale.

Avec l'augmentation de la dose des rayons Gamma, les pigments de la chlorophylle diminuent, mais chez certaines variétés ils augmentent. Wada *et al.* (1998), déclarent que

les fortes doses causent l'inhibition de la croissance, la dégradation de la chlorophylle et l'aberration morphologique, elles modifient le métabolisme et la capacité photosynthétique.

Craft Brandner (1987), Barcaccia (2001) démontrent qu'après les irradiations avec de fortes doses, la plante dans son stage tardif de développement de la maturation des grains, souffre de la sénescence des feuilles et perd les composantes cellulaires.

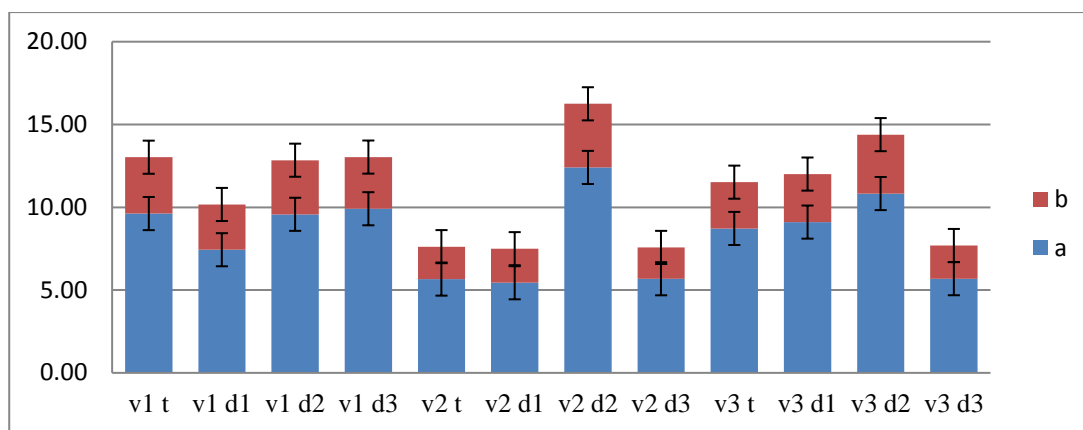


Figure 34: Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de chlorophylle (a) et (b) des variétés de blé dur Gta/dur, BM, DK

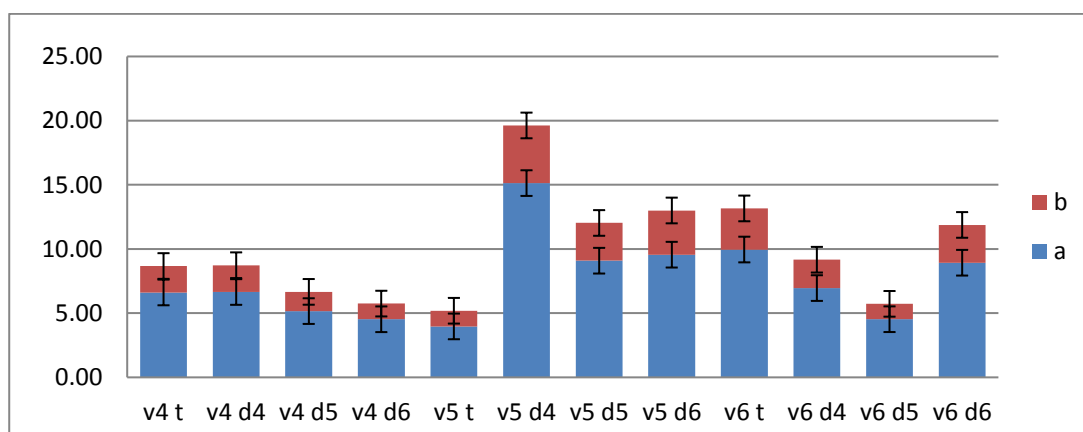


Figure 35 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de chlorophylle totale des variétés de blé dur Waha , GGR,M

Dans cette étude, la teneur en chlorophylle diminue progressivement en augmentant la dose de Gamma. On peut observer que la concentration de la chlorophylle (a) est supérieure que celle de la chlorophylle (b) chez les irradiés et non irradiés, ce qui a été relativement expliqué dans des études précédentes. Il a été reporté que les rayons Gamma conduisent à une plus grande réduction de la quantité de la chlorophylle (b), mais d'autres déclarations contredisent nos résultats, où la chlorophylle (b) est supérieure à la chlorophylle (a) comme celle de l'étude de **Strid (1990)**.

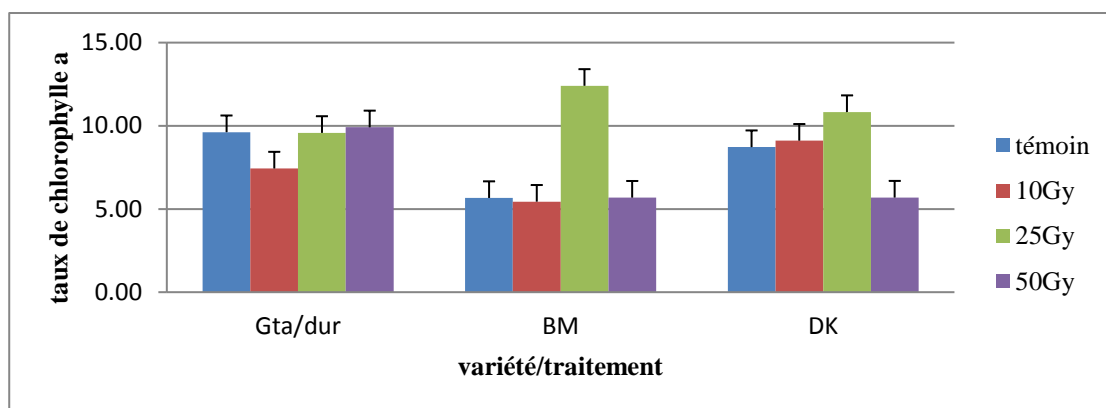


Figure 36 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de chlorophylle (a) des variétés Gta/dur, BM, DK de blé dur

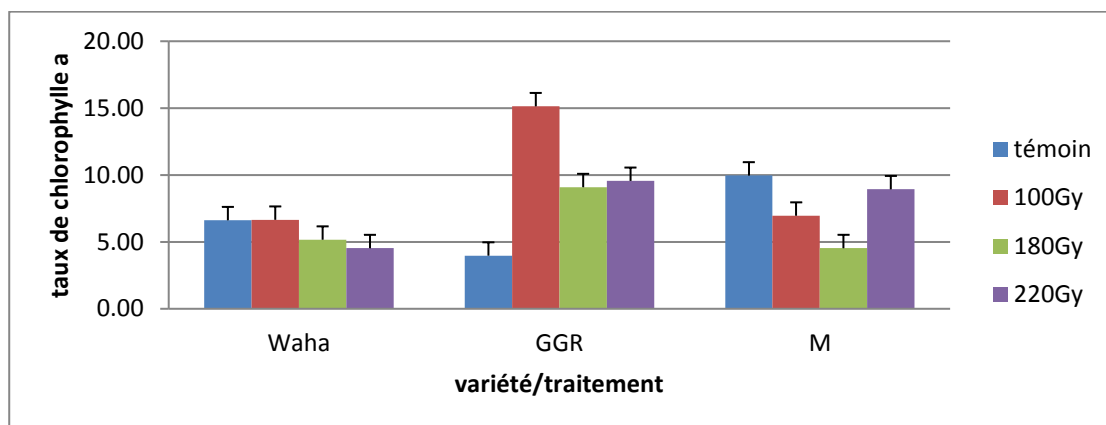


Figure 37 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de la chlorophylle (a) des variétés de blé dur Waha , GGR,M

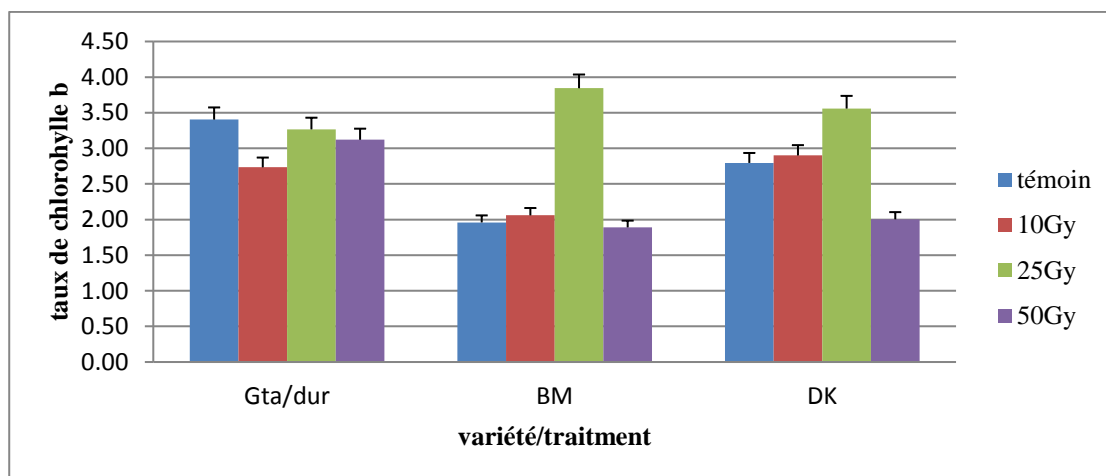


Figure 38 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de la chlorophylle (b) des variétés de blé dur Gta/dur, BM, DK

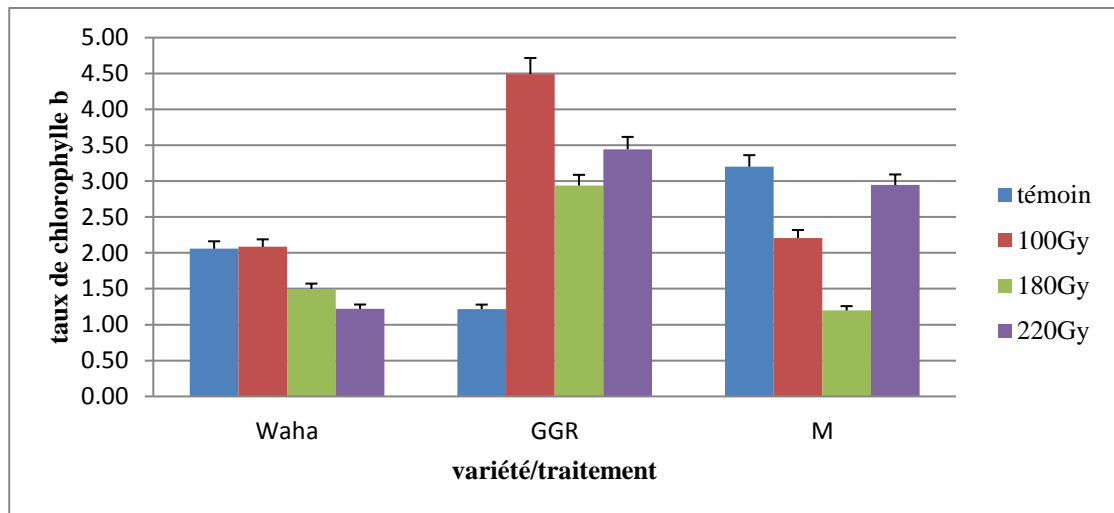


Figure 39 : Effet de l'irradiation Gamma sur la teneur de la chlorophylle (b) des variétés de blé dur Waha , GGR,M

La réduction de la chlorophylle (b) est due à la biosynthèse, la dégradation des précurseurs ou plusieurs destructions sélectives de la chlorophylle (b) (Marwood and Greenberg, 1996).

L'irradiation Gamma induit des altérations physiologiques et biochimiques chez la plante, l'exposition a de fortes doses perturbent la balance hormonale, l'échange des gaz dans les feuilles, l'échange de l'eau et l'activité enzymatique (Kiong *et al.*, 2008)

Tableau 7 : Effets des rayons Gamma (10, 25, 50Gy), sur le taux de germination, la longueur des racines, le poids frais et secs des racines et des feuilles, le volume racinaire, et l'indice mitotique des trois variétés Gta/dur ; benimestina et djnah khotifa

paramètres	GTA/DUR				BM				DK				LSD
	t	10Gy	25Gy	50Gy	t	10Gy	25Gy	50Gy	t	10Gy	25Gy	50Gy	
TG	18.3	18.1	19.9	16.1	15.5	21.33	17.83	17.66	15.85	13.58	18.36	11.58	
VG	96.66	96.66	83.33	86.66	99	100	98.9	99.3	96.66	83.33	90	80	
CG%	19.40 ^{abcd}	19.5 ^{abcd}	14.17 ^{cde}	18.67 ^{abcd}	12.17 ^{de}	14.3 ^{cde}	21.5 ^{abc}	22.83 ^{ab}	16.33 ^{bcde}	17 ^{bcde}	25.5 ^a	10.50 ^e	1.481
LR													
PFf	126.6 ^{ef}	293.3 ^b	196.6 ^{cde}	126.6 ^{ef}	436.6 ^a	173.3 ^{cde}	253.3 ^{bc}	470.0 ^a	230.0 ^{bcd}	156.6 ^{def}	500.0 ^a	80.0 ^f	7.187
PSF	23.6 ^{cde}	30.33 ^c	19.6 ^{de}	16.0 ^e	50.3 ^{ab}	17.33 ^e	41.67 ^b	52.3 ^a	28.0 ^{cd}	26.3 ^{cd}	57.3 ^a	29.0 ^c	8.866
PFR	356.6 ^{ab}	210.0 ^{cd}	76.6 ^f	166.6 ^{cde}	280.0 ^{bc}	103.3 ^{ef}	285.0 ^{bc}	336.6 ^{ab}	90.33 ^{ef}	213.3 ^{cd}	373.3 ^a	46.6 ^f	4.822
PSR	8.33 ^{ab}	7.0 ^{bc}	3.0 ^{cd}	6.0 ^{bcd}	7.0 ^{bc}	6.6 ^{bcd}	8.66 ^{ab}	10.0 ^{ab}	8.66 ^{ab}	6.0 ^{bcd}	11.6 ^a	2.6 ^d	1.134
VR	3.6 ^{Abc}	2.03 ^{de}	0.9 ^f	2.2 ^d	2.7 ^{cd}	1.1 ^{ef}	3.30 ^{bc}	3.80 ^{ab}	1.03 ^f	2.6 ^{Cd}	4.367 ^a	0.7 ^f	4.022
IM	98 ^a	91.66 ^{abc}	95.66 ^{ab}	86.66 ^{cde}	91.66 ^{abc}	93.66 ^{ab}	92.66 ^{abc}	83.00 ^e	91.66 ^{abc}	89.66 ^{bcd}	90.66 ^{bc}	84.00 ^{de}	10.399

Values are mean at 95%

Tableau 8 : Effets des rayons gamma (100, 180, 220Gy), sur le taux de germination, la longueur des racines, le poids frais et secs des racines et des feuilles, le volume racinaire, et l'indice mitotique des trois variétés Waha, GoumghoumRkham et Mridj

paramètres	V4 W				V5 GRR				V6M				LSD
	t	100Gy	180Gy	220Gy	t	100Gy	180Gy	220Gy	t	100Gy	180Gy	220Gy	
TG													
VG	12.26	15.43	15.86	15.23	15.2	14.2	16.9	12	16	19	16	15	
CG%	93.33	93.33	100	100	93.33	83.33	90	73.33	93.33	96.66	86.66	73.33	
LR	21.40a	10.2e	16.8abc	13.4bcde	8.5e	10.2e	10.6de	17.73ab	11.6cde	18.26ab	9.2e	16.5abcd	1.822
PFf	366.6ab	273.3bcde	303.3abcd	340.0abc	246.6Cdef	320.0abcd	286.6abcd	156.6f	180ef	383.3a	273.3bcde	223.3def	3.579
PSF	37.0ab	44.3a	38.6ab	38.3ab	45.0a	39.3ab	30.6bc	41.0ab	19.0c	37.6ab	37.3ab	36.3ab	1.635
PFR	203..3bc	226.6abc	293.3a	213.0abc	210.0abc	210.0abc	166.6c	186.6bc	163.3c	223.3abc	256.6ab	220.0abc	1.424
PSR	8.3a	6.0a	8.0a	6.3a	7.0a	6.3a	6.6a	7.6a	6.0a	7.0a	5.0a	7.0a	0.190
VR	2.8bcd	2.8bcd	3.5ab	2.3cd	3.4ab	3.6ab	2.3cd	3.1abc	2.1d	3.4ab	3.8a	3.3ab	1.858
IM	97.66a	97.33ab	90.00c	73.66f	95.33abc	94.66abc	89.00cd	79.00ef	94.66abc	95.00abc	91.00bc	83.66de	39.946

Values are mean at 95%

II. Effet du stress hydrique sur des graines de blé dur irradiées par des rayons Gamma en culture sous serre

II.1. Effet des rayons Gamma et du stress hydrique sur la germination et les paramètres physiologique de la plante

- **La teneur relative en eau (TRE « % »)**

La mesure de la teneur relative en eau nous indique le statut hydrique de la plante en réponse au stress hydrique.

La figure 40 ci-dessous, montre que la variété Benimestina enregistre des valeurs de TRE plus élevées par rapport aux autres témoins non irradiés, non stressés des autres variétés. Quand aux témoins stressés, la plus grande valeur est enregistrée chez Djenah Khotifa, 89.21% et 72.70%, respectivement.

La variété GTA/dur traitée avec la dose 50Gy sous un stress hydrique de 100% C.C est, par conséquent, la variété mutée la plus apte à la rétention de l'eau et donc probablement la plus tolérante au stress hydrique, alors que la dose 10Gy à affectée la TRE pour la même variété qui enregistre 38.37%.

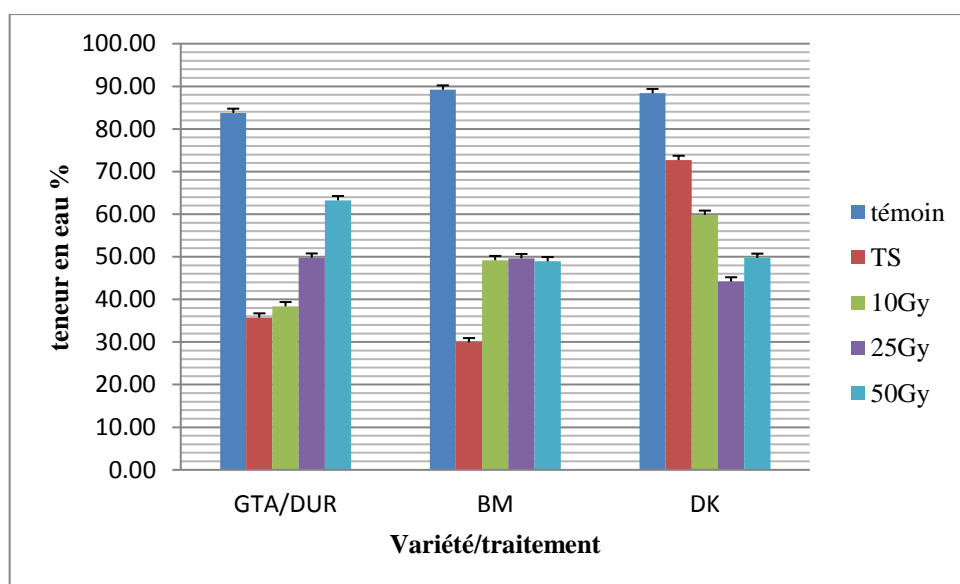


Figure 40 : La teneur relative en eau enregistrées chez les géotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma

Le témoin non irradié non stressé et le témoin stressé de la variété Ghoumghoum rkham enregistrent la plus grande valeur de TRE Sous l'effet d'un stress hydrique de 100%C.C, ces teneurs sont 95.59% et 64.58% respectivement. (Figure 41).

Les variétés Ghomghoum Rkham traitée avec 220Gy et Waha avec 180Gy quand à eux, enregistrent une meilleure TRE par rapport aux autres traitements avec respectivement 83.81% et 80.36%. Ces deux variétés mutées retiennent plus d'eau, ce qui les rende plus tolérante au stress hydrique.

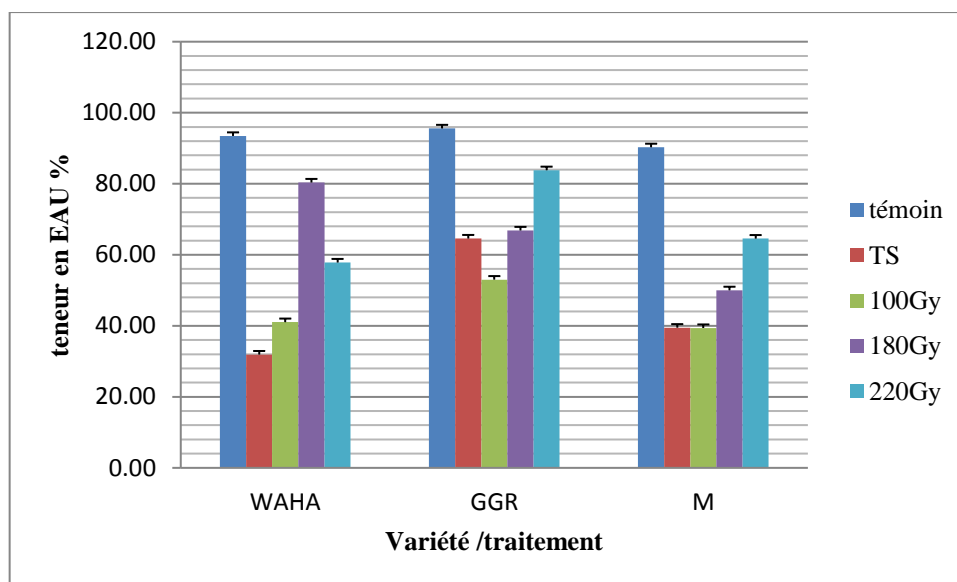


Figure 41 : La teneur relative en eau enregistrées chez les géotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma

L'analyse de la variance avec le test FISHER(LSD) indique que la TRE pour les traitements est significative (<0.0001).

Les différentes variétés (Gta/dur, Benimestina, Djenah khotifa) traitées avec les différentes doses des rayons Gamma et exposées à un stress hydrique sévère ont montré des différences statistiques significatives, qui ont séparé 8 groups : A, AB, ABC, BCD, CDEF, DEF, EF, F (tableau 9).

Tableau 9 : L'effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur la teneur relative en eau des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			moyenne
	GTA dur	BM	dk	
0/NS	83,75ab	89,21a	88,38a	87,119a
TS	35,72ef	29,92f	72,703abc	46,118b
10/S	38,37ef	49,200cdef	59,83cdef	49,138b
25/S	49,78cdef	49,66cdef	44,200def	47,881b
50/S	63,26bcd	48,93cdef	49,74cdef	53,979b
moyenne	54,18a	53,38a	62,97a	/

L'analyse de la variance des variétés traitées avec les doses 100, 180, et 220Gy , révèle 9 groupes significativement différents : A, AB, ABC, ABCD, ABCDE,BCDE,CDE, DE, E (tableau 10).

Tableau 10: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur la teneur relative en eau des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			moyenne
	W	GGR	M	
0	93,46ab	95,59a	90,28abc	93.11a
TS	31,91e	64,58abcde	39,47de	45.32bc
100	41,03de	53,00bcde	39,38de	44.48c
180	80,36abcd	66,85abcde	50,00cde	65.74bc
220	57,83abcde	83,81abc	64,56abcde	68.74b
moyenne	60.92a	72.77a	56.74a	

La TRE est un paramètre qui décrit la capacité de la plante à se maintenir hydratée en condition de stress hydrique. Selon **Pirzad A et al. (2011)** et **Shao et al., (2006)**, le maintien d'une valeur élevée de la TRE en condition de stress peut résulter de deux mécanismes d'adaptation : soit par le maintien d'une élasticité élevée des tissus, soit par une diminution de la pression osmotique.

Le maintien d'une TRE élevée sous stress hydrique est une forme de résistance remarquable, c'est le cas pour les variétés : Gta/dur traitée avec la dose 50Gy, Waha avec la dose 180Gy et Ghoumghoum Rkham 220Gy, où ses doses ont permis à la plante de maintenir son état hydrique, donc ces nouveaux génotypes sont tolérants au stress du moment où ils arrivent à maintenir une TRE élevée.

- **Mesure du taux de la chlorophylle totale (TCT unité de SPAD)**

Le taux de chlorophylle diminue chez tous les génotypes stressés. Les résultats montrent que le taux de la chlorophylle est affecté chez toutes les variétés irradiées stressées, sauf pour la Gta dur avec la dose 50 Gy où le taux est de 48.33U.Spad, la variété Waha irradiée avec la dose 180Gy le taux est 49.33U.spad et Ghoumghoum Rkham avec la dose 220 Gy le taux est de 46.56U.spad. Ce qui a été montré avec la teneur relative en eau où ces doses ont donné un meilleur génotype tolérant.

Les variétés GTA/dur mutées avec 50Gy, Waha avec la dose 180Gy et Ghoumghoum Rkham avec la dose 220 Gy qui ont pu garder une teneur en chlorophylle comme le témoin, sont probablement les mieux adaptées à un stress, car la réduction des taux de chlorophylle perturbe le mécanisme photosynthétique des parties supérieures de la plante altérant ainsi le rendement (Tambussi, 2007)

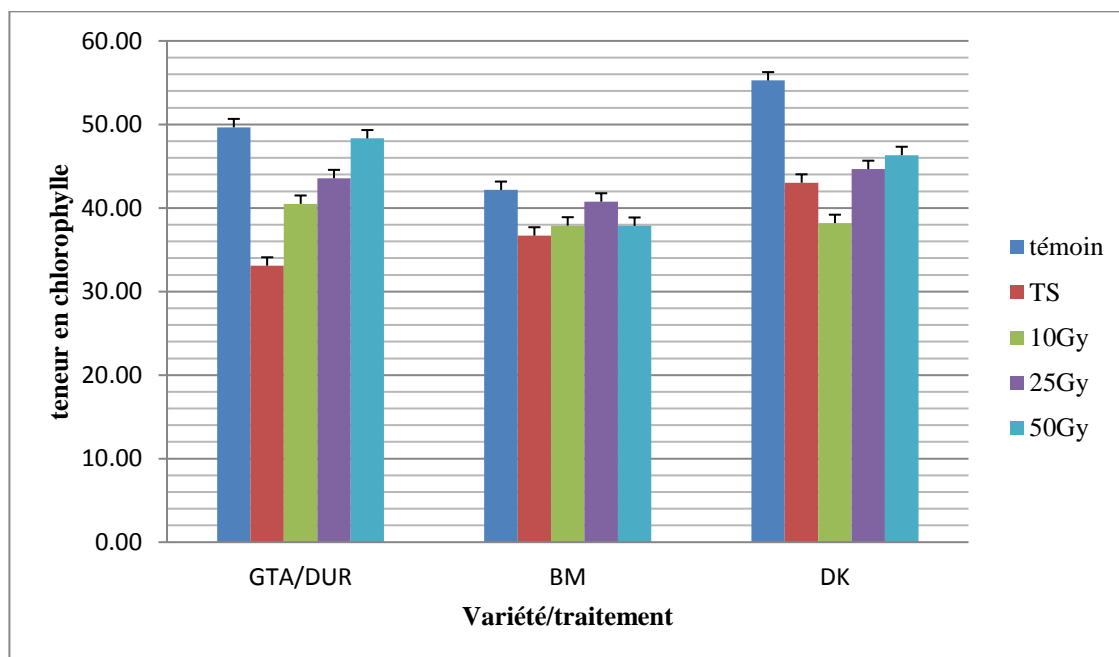


Figure 42 : La teneur en chlorophylle enregistrées chez les géotypes Gta/dur, BM, et DK traités avec les rayonnements Gamma

Les variétés Waha et Ghoumghoum Rkham représentent les teneurs en chlorophylle totales les plus élevées, ce qui a été montré avec **Mouellef (2010)**. Quand à la variété Djenah khotifa, elle a présentée elle aussi un taux de chlorophylle élevé contrairement à ce que **Mouellef (2010)** a rapportée dans ses recherches où cette variété a des taux de chlorophylle totale plus faibles avec 55.26U.Spad pour Djenah khotifa et 50.60U.Spad et 47.23U.Spad respectivement pour Waha et Ghoumghoum Rkham. (tableau11, 12)

Tableau 11: L'effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur la teneur en chlorophylle des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			moyenne
	GTA dur	BM	dk	
0	49,66ab	42,16defg	55,26a	37.82c
TS	33,10h	36,70gh	43,03cdef	41.53b
10	40,50fgh	37,900fgh	38,20fgh	46.74a
25	43,56cdef	40,76defg	44,66bcde	45.03ab
50	48,33bc	37,86fgh	46,33bcd	43.64ab
moyenne	44.28a	39.08b	45.50a	

Tableau 12: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur la teneur en chlorophylle des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			moyenne
	W	GGR	M	
0	50,60a	47,23abc	46,36abc	42.81a
TS	36,87g	44,56bcde	40,30efg	44.30a
100	42,13cdef	40,90defg	39,63efg	44.77a
180	49,28ab	39,33fg	43,00cdef	42.43a
220	45,86abcd	46,56abc	43,66cdef	43.79a
moyenne	46.32a	43.72ab	40.82b	

On remarque que le comportement de Benimestina, Mridj, et Ghoumghoum Rkham pour tous les traitements (irradiations Gamma et stress hydrique), semble le même avec des fluctuations infimes sauf pour la variété GGR irradiée avec la dose 220Gy où le taux est supérieur. (Figure 43).

En conditions de stress hydrique, les valeurs de TCT varient entre 38.20U.Spad et 46.33U.Spad pour Djenah khotifa, de 36.70U.Spad à 40.76U.Spad pour Benimestina, et de 33.10U.Spad à 48.33U.Spad pour Gta/dur (tableau 11), où on remarque qu'entre le témoin non stressé de la variété Gta dur avec une valeur de 49.66 U.Spad et Gta dur irradiée avec 50Gy il y'a une infime différence. Le même résultat a été remarqué pour la variété waha mutée avec 180Gy, son taux de chlorophylle est de 49.28 U.Spad Et pour le témoin 50.360U.Spad

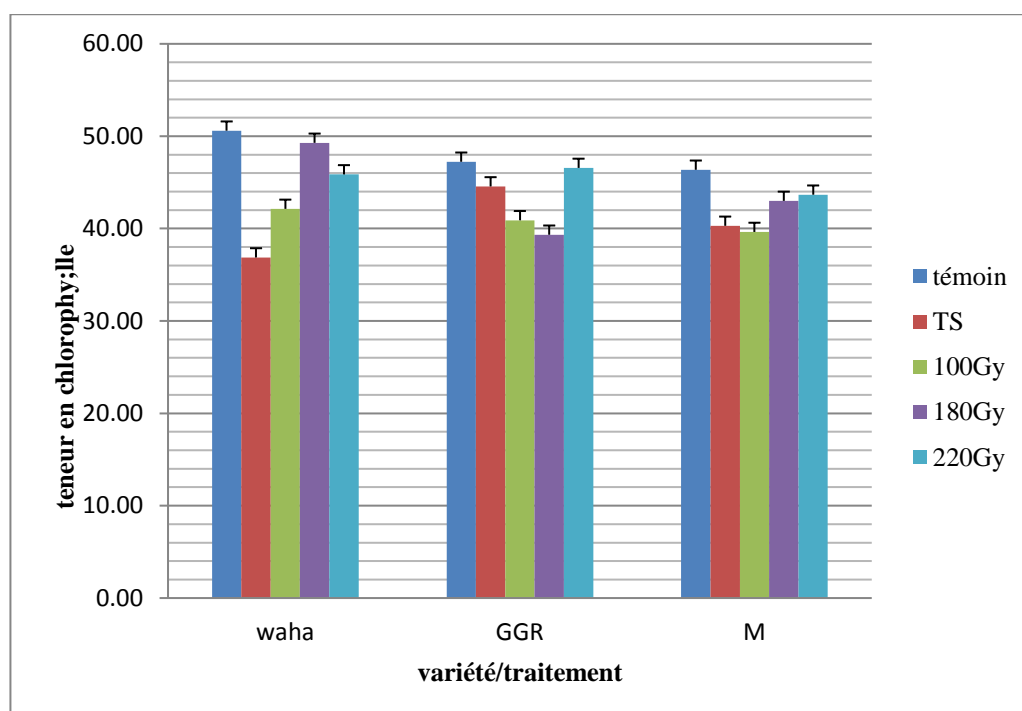


Figure 43: La teneur en chlorophylle enregistrées chez les génotypes Waha, GGR et M traités avec les rayonnements Gamma

La variété Ghomghoum Rkham enregistre un taux de chlorophylle de 47.23U.Spad pour les plantes irradiées avec 220Gy sous conditions stressées. Quand à la variété Mridj les valeurs fluctuent entre 39.63 à 46.36U.Spad.

On remarque que les plantes irradiées stressées et témoins stressés répondent différemment, par exemple pour la variété GTA/dur le taux de la chlorophylle du témoin irradié stressé est moins que les autres irradiées, tandis que pour la variété Mridj le comportement est le même, donc les rayons Gamma ont un rôle aléatoire.

D'après ces résultats et les résultats de la teneur relative en eau on remarque qu'il ya une corrélation positive entre ses deux paramètres.

Les variations de la teneur en chlorophylle sous différents stress hydrique apportent une information complémentaire du comportement des variétés vis-à-vis le stress hydrique.

La chute des teneur en chlorophylle est la conséquence de la réduction de l'ouverture des stomates visant à limiter les pertes en eau par évapotranspiration et par augmentation de la résistance à l'entrée de CO₂ atmosphérique nécessaire à la photosynthèse (Bousba *et al.*, 2010, Shao *et al.*, 2005, Qiao *et al.*, 2010)

La croissance sera perturbée à cause de la male distribution des aliments par la tige au autres parties de la plante (Ehdaie *et al.*, 2008, Alvaro *et al.*, 2008) et ceci suite à la diminution du taux de la chlorophylle.

II.2. Effet du stress hydrique sur les plantes mutées par les rayons gamma sur les paramètres biochimiques

• Potentiel osmotique

Les variations du potentiel osmotique causées par le déficit hydrique sont présentées par les histogrammes figure 44 et 45.

Ces résultats mettent en évidence une diminution du potentiel chez toutes les variétés mutées mises sous stress hydrique. Les témoins stressés des deux variétés Gta/dur et Dk ont les plus faibles potentiels (figure 29), contrairement à leurs mutées stressées qui sont plus élevées. Du coup l'eau a tendance de rentrer dans ces plantes.

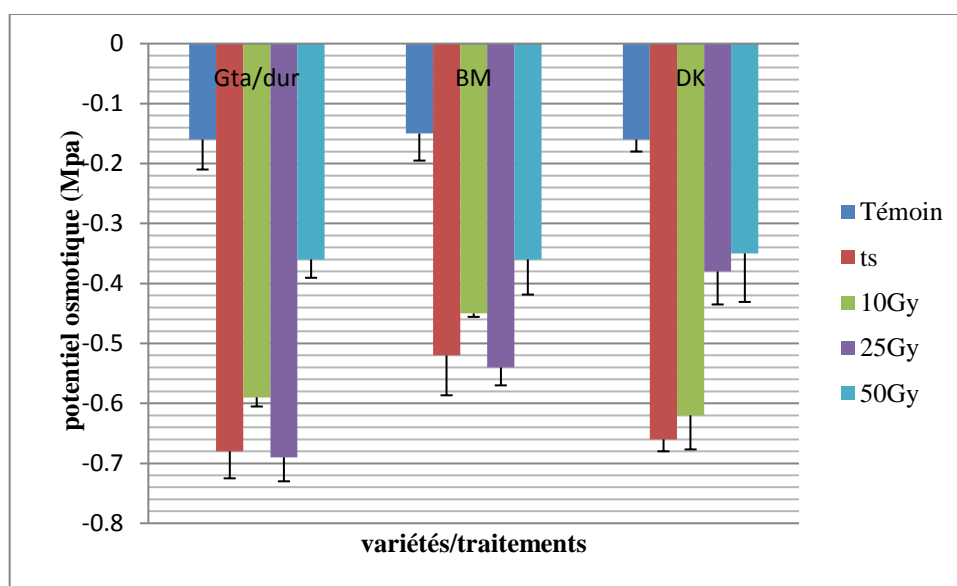


Figure 44 : le potentiel osmotique enregistrés chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma

Les valeurs du potentiel osmotique varient entre -0.15MPa et -0.16MPa chez les témoins, mais après induction du stress hydrique, les valeurs varient entre -0.35MPa et -0.68MPa chez la variété DK traitée avec la dose 50Gy et Gta/dur non mutée stressé respectivement (tableau 13).

Tableau 13 : L'effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur le potentiel osmotique des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			moyenne
	GTA dur	BM	dk	
0	-0.16f	-0.15f	-0.16f	-0.15d
TS	-0.68a	-0.52bc	-0.65a	-0.61a
10	-0.59ab	-0.45cd	-0.62ab	-0.55b
25	-0.69a	-0.54ab	-0.38de	-0.53b
50	-0.36de	-0.36de	-0.35e	-0.35c
moyenne	-0.49a	-0.40b	-0.52b	

Les résultats de l'analyse statistique révèlent une différence hautement significative entre les traitements au seuil $\alpha = 0.05$, avec une probabilité associée à $P < 0.0001$. Par contre aucune différence significative n'est observée entre les variétés < 0.001 .

La variété Gta/dur mutée avec la dose 50Gy à un potentiel osmotique élevé, ce qui donne à cette variété la propriété d'être plus résistante au stress hydrique. L'eau a tendance de rentrer dans les cellules et esquiver la période de stress. Ce qui est d'ailleurs en corrélation avec les deux paramètres TRE et taux de chlorophylle. (Figure 44).

La figure 45 montre que la variété Mridj traitée avec la dose 180Gy sous stress hydrique à le plus faible potentiel hydrique avec -0.65Mpa . Les témoins de toutes les variétés ont un P_o plus élevé. Le potentiel varie de -0.27Mpa à -0.65Mpa chez les stressées avec la variété GGR témoin stressée et la variété M mutée avec 180Gy respectivement.

Quant aux témoins les valeurs varient entre -0.16MPa et -0.17MPa . La variété waha mutée avec la dose 180Gy à un potentiel plus élevé après le témoin, ce qui est en corrélation avec la TRE et le taux de chlorophylle, donc cette variété a plus tendance à absorber l'eau du sol.

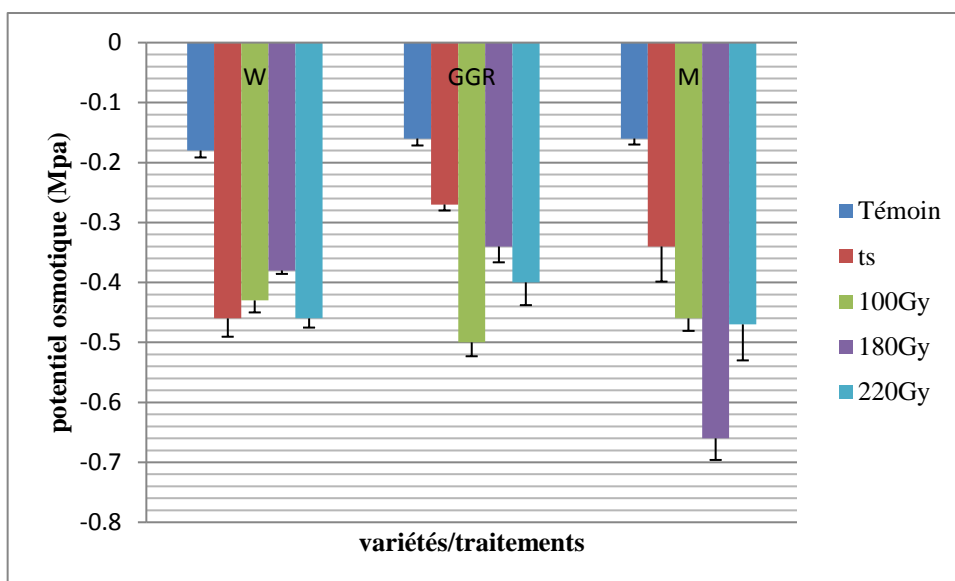


Figure 45 : Le potentiel osmotique enregistré chez les géotypes Waha, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma

L'analyse de la variance montre qu'il y a une différence hautement significative entre les variétés et les traitements avec une probabilité associée à $P < 0.0001$. Le test *Fisher* fait plusieurs groupes qui sont montrés dans le tableau 14.

Zhu Z *et al.*, 2011; Ashraf, M *et al.*, 2007 ont eu les mêmes résultats, qui montrent que la diminution du Po est l'une des réponses prononcées au stress hydrique dans beaucoup de plantes.

L'abaissement du PO est dû à l'effet de la déshydratation, car les TRE les plus faibles coïncident avec les PO les plus faibles (Ogawa A *et al.*, 2006).

Tableau 14: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur le potentiel osmotique des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			Moyenne
	W	GGR	M	
0	-0.18g	-0.16g	-0.16g	-0.16c
TS	-0.46b	-0.27f	-0.33e	-0.35 b
100	-0.43bcd	-0.49b	-0.46b	-0.46a
180	-0.38de	-0.34e	-0.66a	-0.46a
220	-0.46bc	-0.39cde	-0.47b	-0.44a
moyenne	-0.38b	-0.33c	-0.41a	

- **Température foliaire (thermomètre infrarouge)**

La mesure de la température foliaire a bénéficiée d'un certain intérêt comme technique de criblage pour la résistance au stress, particulièrement avec l'avènement du thermomètre infrarouge portable. La température du couvert végétal figure au rang des paramètres biophysiques les plus utilisés pour la connaissance du statut hydrique de la plante.

Selon **dakheel et al., (1993)** la capacité des plantes à maintenir une température foliaire basse est une indication de leur grande capacité à extraire de l'eau du sol et à se rafraichir par transpiration. Des températures basses du couvert végétal sont indicatives d'un potentiel hydrique foliaire élevé (**blum et al. 1981**)

Les données de thermomètre infrarouge révèlent une distinction nette entre les plants induits en stress hydrique mutés et les plants témoins (Figure 46)

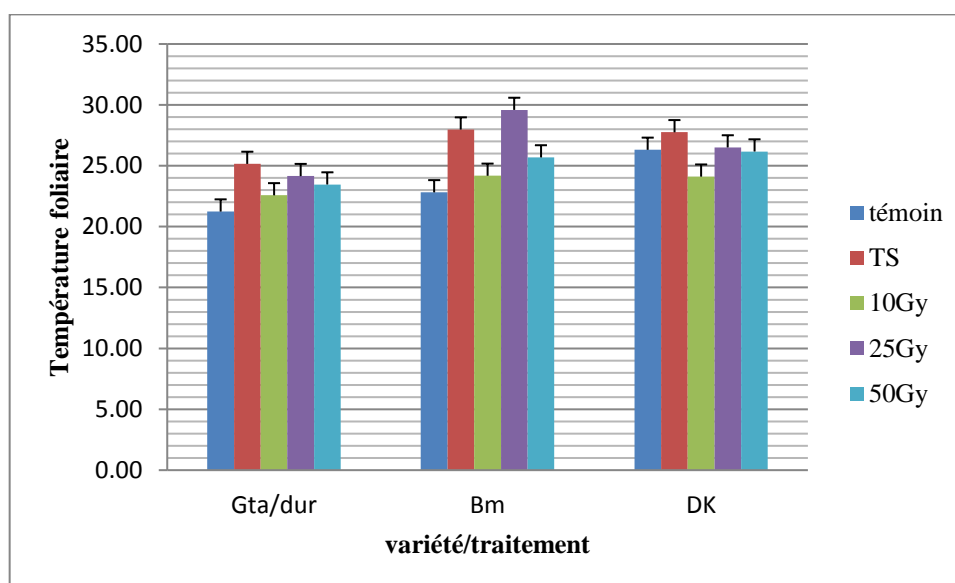


Figure 46: La température foliaire enregistrées chez les génotypes Gta/dur, BM, DK traités avec les rayonnements Gamma

À tous les stades phénologiques d'induction du stress hydrique, la température foliaire des plants sous stress est supérieure à celle des plants témoins (Figure 46 ; 47). La température foliaire de Djenah khotifa avec la dose 10Gy été plus basse que celle du témoin non irradié et stressé. Cette dose a donné à la plante une meilleure résistance au stress hydrique. L'eau étant suffisamment disponible pour permettre la transpiration de la plante et assurer un rafraîchissement des feuilles par la vapeur d'eau. Ce qui été le cas pour la variété Mridj avec la dose 220Gy.

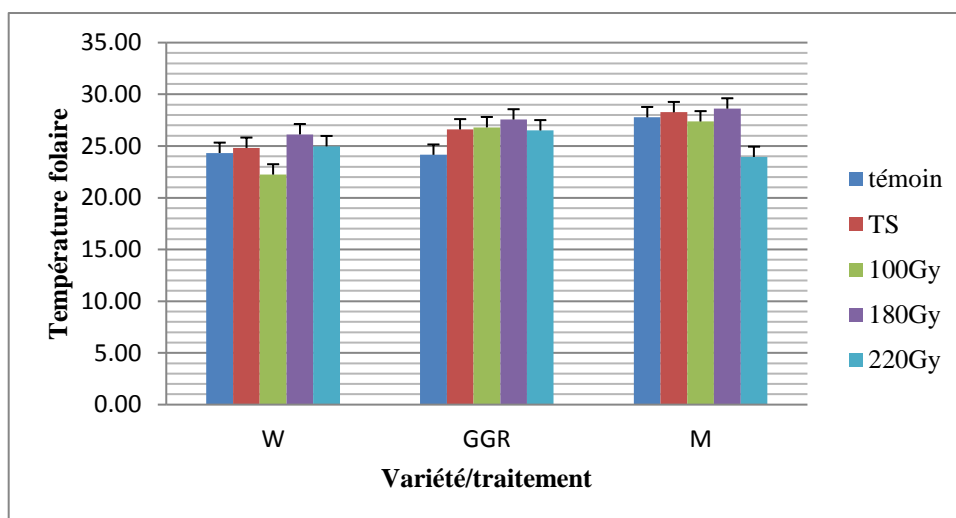


Figure 47: Les températures foliaires enregistrées chez les génotypes W, GGR, M traités avec les rayonnements Gamma

La variété Waha traitée avec la dose 180Gy à une température foliaire supérieure que le témoin, chose qui n’était pas attendu, vu que les deux paramètres teneur relative en eau et teneur en chlorophylle ont permis de conclure que cette variété été plus résistance à ce stress. Même chose pour Gta/dur avec la dose 50Gy, mais la différence avec le témoin était infime.

La variété Ghoumghoum rkham mutée avec la dose 220Gy quant à elle à une température plus basse que les autres graines traitées ce qui est en corrélation avec la teneur relative en eau et la teneur en chlorophylle.

Une ANOVA est effectuée sur les valeurs de T° aux différentes variétés mutées soumises à un stress hydrique afin de vérifier si les différences de température observées entre les variétés et les traitements sont significatives (Tableau 15, 16). Après l’arrêt de l’apport en eau des plants soumis au stress hydrique, l’ANOVA ne révèle pas une différence significative de température entre les variétés et traitements.

Le test *Fisher* révèle plusieurs groupes qui sont montrés dans les tableaux ci-dessous :

Tableau 15 : L’effet de la dose des rayons Gamma 10, 25, 50Gy sur la température foliaire des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			moyenne
	GTA dur	BM	Dk	
0	21,24e	22,82de	26,31bc	23.46c
TS	25,15bcd	27,97ab	27,75ab	26.96a
10	25,57de	24,17cde	24,47cde	23.62c
25	24,15cde	29,58a	26,50abc	26.75ab
50	23,46cde	25,68bcd	26,17bc	25.11bc
moyenne	23.31b	26.04a	26.17a	

Tableau 16: L'effet de la dose des rayons Gamma 100, 180, 220Gy sur la température foliaire des variétés de blé dur

Dose(Gy)	Cultivars			moyenne
	W	GGR	M	
0	24,33defg	24,15efg	27,77abc	25.42b
TS	24,82cdefg	26,60abcdef	28,26ab	26.56a
100	22,24g	26,81abcdef	27,37abcde	25.48b
180	26,13abcdef	27,56abcd	28,62a	27.43a
220	24,97bcdefg	26,51abcdef	23,94fg	25.14b
moyenne	24.50b	26.33a	27.20a	

III. Effet de l'irradiation Gamma sur des cals embryogénique *in vitro*

La combinaison de mutagenèse avec des techniques *in vitro* propose une méthode efficace pour améliorer la multiplication végétative des plantes. Ces techniques permettent l'induction de la variation, la sélection et la multiplication des génotypes souhaités dans une durée beaucoup plus courte et un plus petit espace que les méthodes conventionnelles.

Le but de ce travail était de sélectionner des plantes régénérées à partir de cals de différentes origines (variations somaclone ou des mutations induites) de différentes variétés de blé dur.

III.1. Pourcentage de callogénèse

Le taux de callogénèse est de 88 % pour la variété Benimestina, plus de 90% des explants sont calogènes aussi pour la variété Djenah khotifa. Tandis que le taux de callogénèse diminue est presque nul chez GTA/dur qu'est de 2%. On peut dire que cette variété n'est pas callogène.

- La variété Dk parmi 645 embryons, seuls 90 ont générés des cals
- La variété Waha parmi 630 embryons, 76 ont induits des cals
- La variété Gta/dur parmi 574 embryons on eu 13 cals seulement

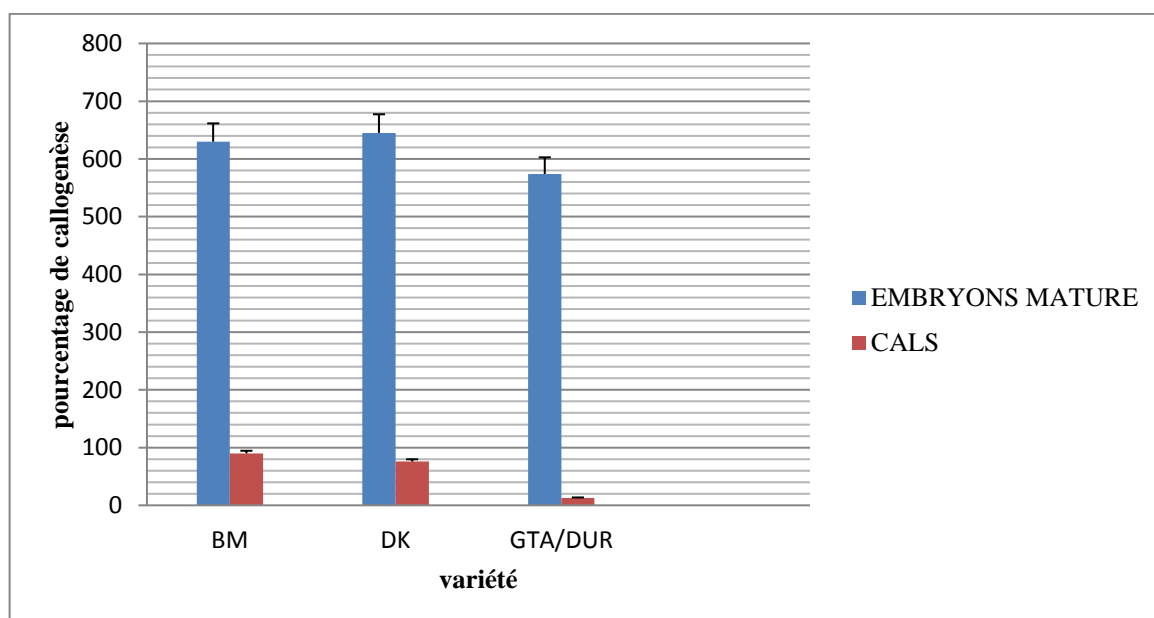


Figure 48: Pourcentage de callogénèse des trois variétés BM, DK, Gta/dur

III.2. Effet de différentes expositions de l'irradiation gamma sur la prolifération des cals

Repiquage des cals irradiés : les cals irradiés ont été repiqués dans un nouveau milieu, afin d'éviter des contaminations dans le milieu suite aux irradiations.

Après un mois

Après un mois de callogénèse après l'irradiation, le poids frais des cals est mesuré (figure 49). Le poids varie d'une dose à une autre, où le poids frais diminue progressivement avec l'augmentation de la dose chez les mutants traités avec les doses (25Gy, et 50Gy) tandis qu'avec la dose 10Gy le poids augmente mais pas significativement par rapport aux témoins. Les traitements aux rayons gamma affectent la croissance des cals. Ce qui a été montré dans l'étude de **(Bettaieb, 2008)** avec glaïeul.

Les cals présentent des brunissements partiels et massifs tandis que les témoins quelques uns ont été brunis après quelques semaines de l'irradiation. Les brunissements sont dus à une mise en contact des systèmes oxydatifs et leurs substrats. Ce brunissement peut s'expliquer par une augmentation des activités peroxydases (néfaste) et une diminution de l'activité catalase, ce qui nous laisse dire que l'irradiation était en partie la cause de ce désordre enzymatique surtout pour la dose 50Gy, où on a remarqué un taux de brunissement important, comparée à 25 Gy et à 10 Gy où quelques cals ont été brunis. Les cellules semblent avoir une activité mitotique limitée et se nécrosent progressivement.

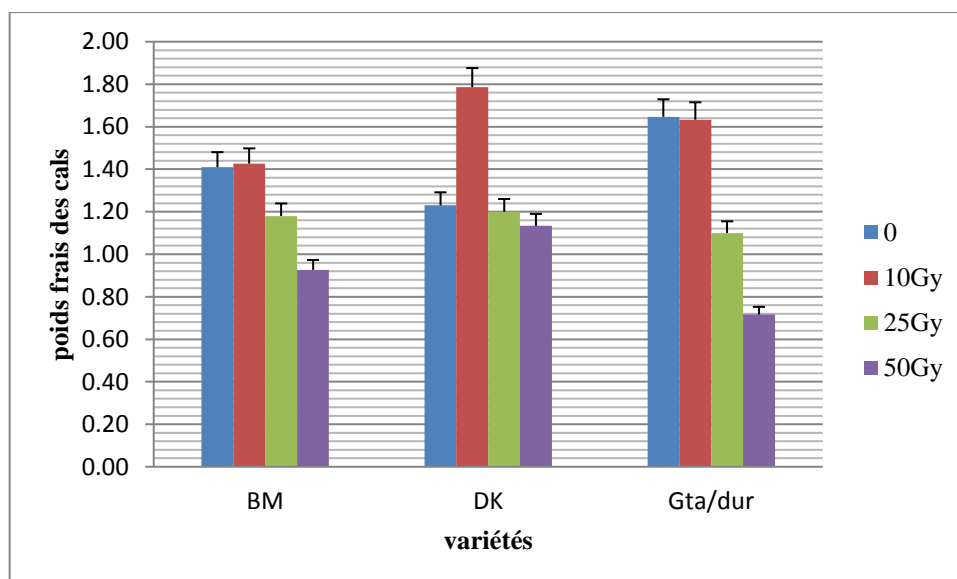


Figure 49: poids frais des cals après irradiation au rayonnement Gamma

Transfert de tous les cals viables dans un milieu de régénération (Annexe): après deux mois de période de régénération, les cals ne présentaient pas un bon pourcentage de régénération. Nous avons changé le milieu en changeant les hormones et les concentrations. Les explants n'ont pas le pouvoir de régénération ni la capacité de former des plantules. Même pour les témoins, sauf quelques témoins qui présentaient des parties vertes, mais après quelque jours une apoptose s'est produite. Même si le blé dur est une plante récalcitrante, l'irradiation peut aussi être la cause de la perte du pouvoir de régénération surtout pour les doses 10Gy et 25 Gy, pour les explants de 50Gy il n'y a eu aucun changements.

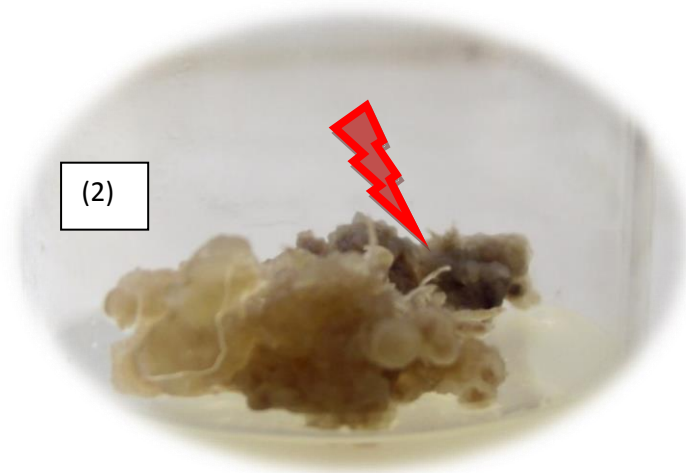
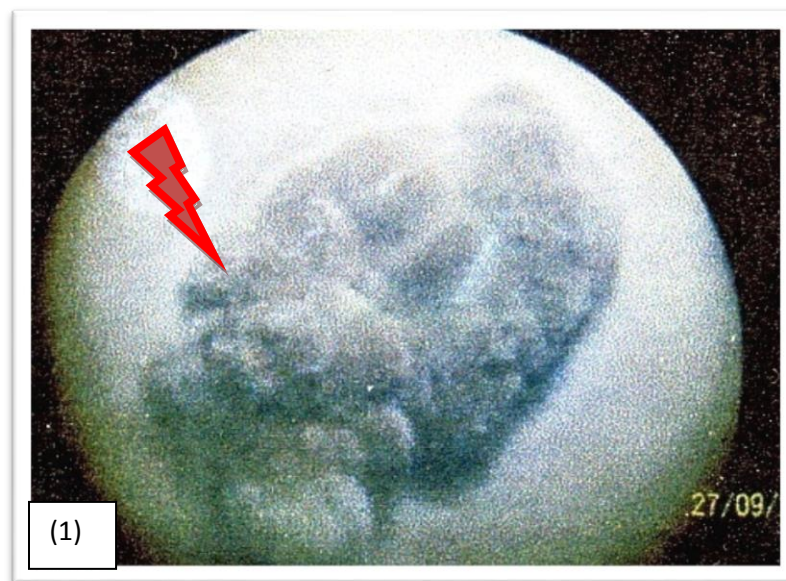


Figure 50: (1) cals après irradiation par les rayons Gamma au microscope, (2) brunissements des cals après irradiations

Mutagenèse chimique

I. Effets de l'EMS sur la germination, le rendement et ses composantes

Capacité de germination

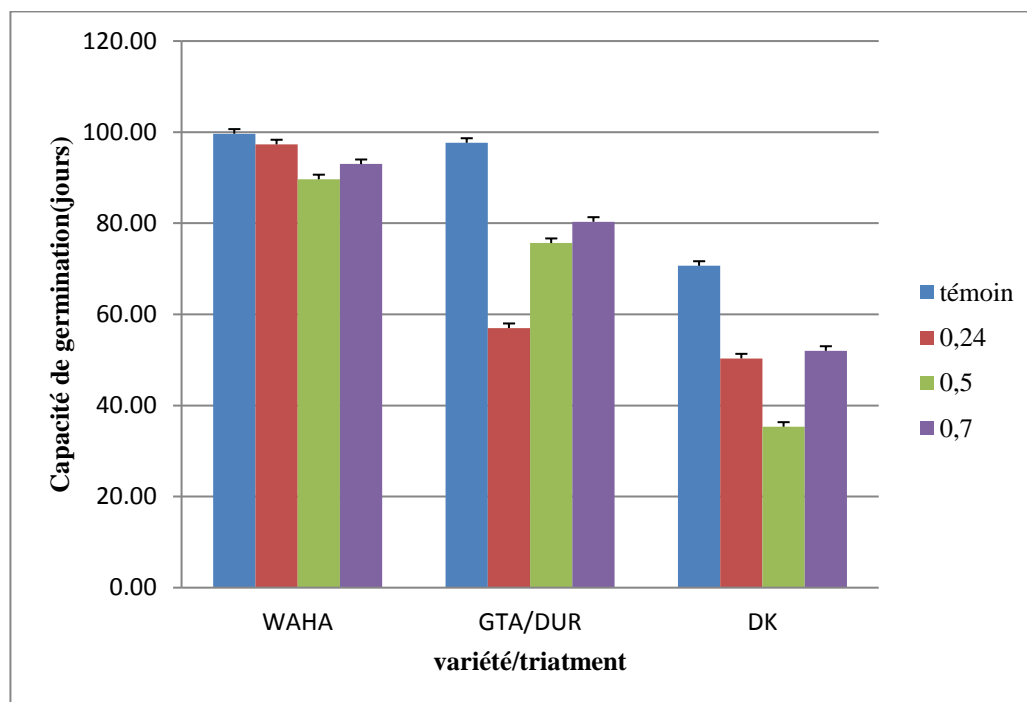


Figure 51: Capacité de germination enregistrées chez les génotypes Waha, Gta/dur, et Djenah khotifa traité avec l'EMS

La capacité de germination des graines des 3 variétés de blé dur est montrée dans le tableau 17. Il est évident qu'à partir du tableau avec l'augmentation de la concentration de l'EMS, le pourcentage de germination diminue. Le plus grand pourcentage est observé chez les contrôles. Ces résultats sont similaires à ceux d'**Ali Benjavad Talebi (2012)**, et ceux de **Wattoo J.I (2012)**.

L'effet de chaque concentration diffère d'une variété à une autre, Waha avec la concentration 0.5% à un pourcentage de 89.67 comparée au contrôle avec 99.67%, en ce qui concerne la variété dk le plus bas pourcentage est de 35% avec la concentration 0.5%.

Les mutagènes sont connus pour induire une létalité en stage plantule dans la germination (M1). Ces résultats peuvent être attribués aux effets des mutagènes sur les tissus méristématiques des graines, ce qui est dû à des dommages chromosomiques. La réduction de

la germination et la survie de la plante résulte de l'aberration chromosomique qui induit une activité enzymatique comme la catalase et lipase et une activité hormonale.

La formation d'enzyme requis pour le processus de la germination peut être un des effets physique causé par l'EMS pour réduire la germination, **Rupinder and Kole** annoncent qu'une réduction sévère de la germination est un indicateur d'une efficace mutagenèse.

Longueurs de la tige

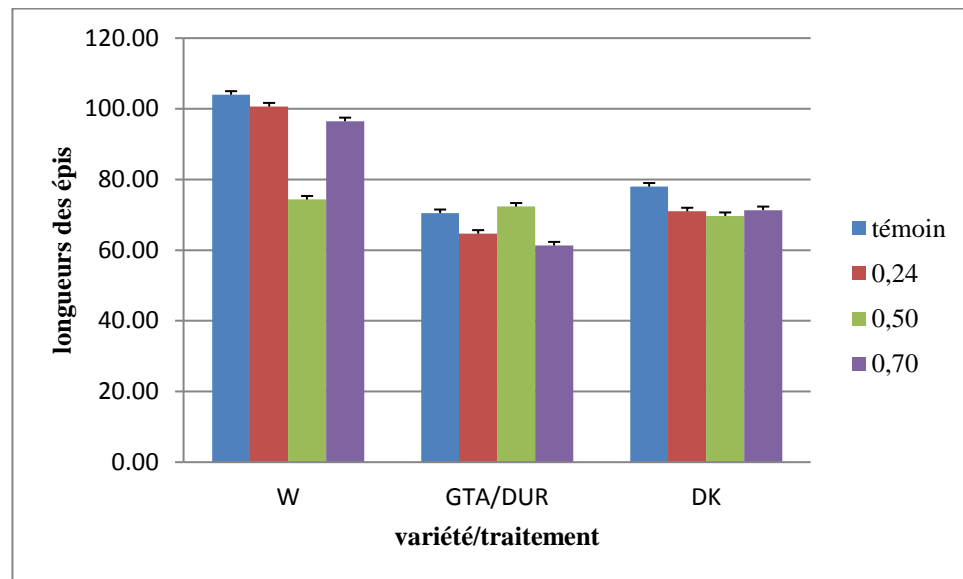


Figure 52: longueurs des tiges enregistrées chez les génotypes Waha , Gta/dur, Djenah khotifa traité avec l'EMS

Longueurs de tige

Il n'y a pas une grande différence entre les moyennes de la longueur de la plante (cm) qui a été observée entre les variétés et les doses.

La hauteur de la plante est généralement utilisée comme indice dans la détermination des effets biologique de différents mutagènes chimique et physique (**konzak et al., 1972**),

L'analyse de la variance de la hauteur de la tige varie en fonction de la variété mais pas du traitement, elle fluctue entre 104.00 cm chez le contrôle de Waha à 69.66cm chez djenah kotifa avec la concentration 0.5%.

Les valeurs maximales ont été observées chez Waha avec les valeurs 100.66 cm avec la concentration 0.24%, les valeurs minimales sont observées chez Djenah kotifa avec la concentration 0.5% avec 69.66cm. L'analyse de la variance faisant référence à la hauteur de la plante ne révèle pas de différence significative entre les doses de Djenah kotifa. Contrairement à waha ou une différence significative a été remarquée, là on distingue deux groupes : Variété moyenne : Djenah kotifa., GTA/dur Variété longue : waha

Nombre d'épi par pots

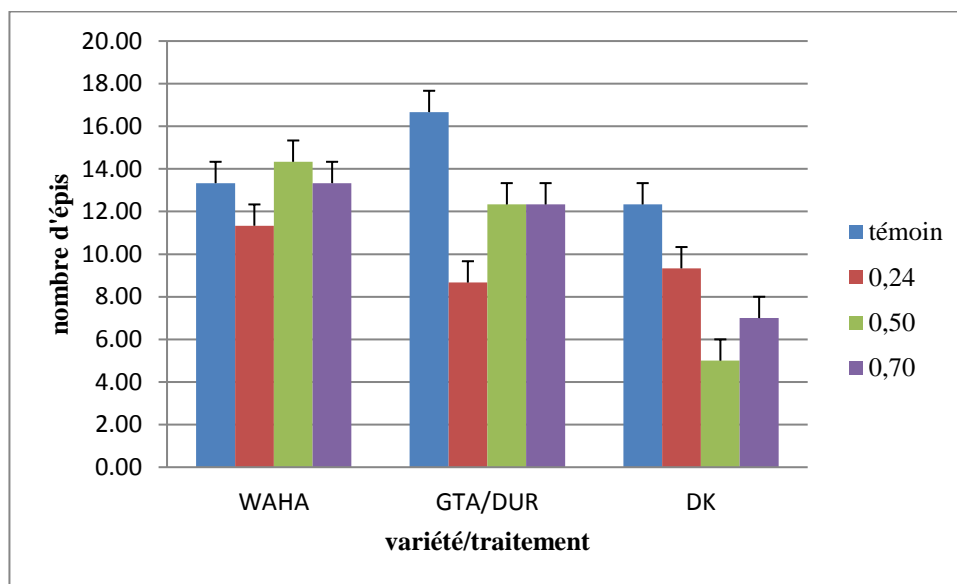


Figure 53: Nombre d'épis enregistrés chez les génotypes Waha , Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS

Nombre de grains par épi

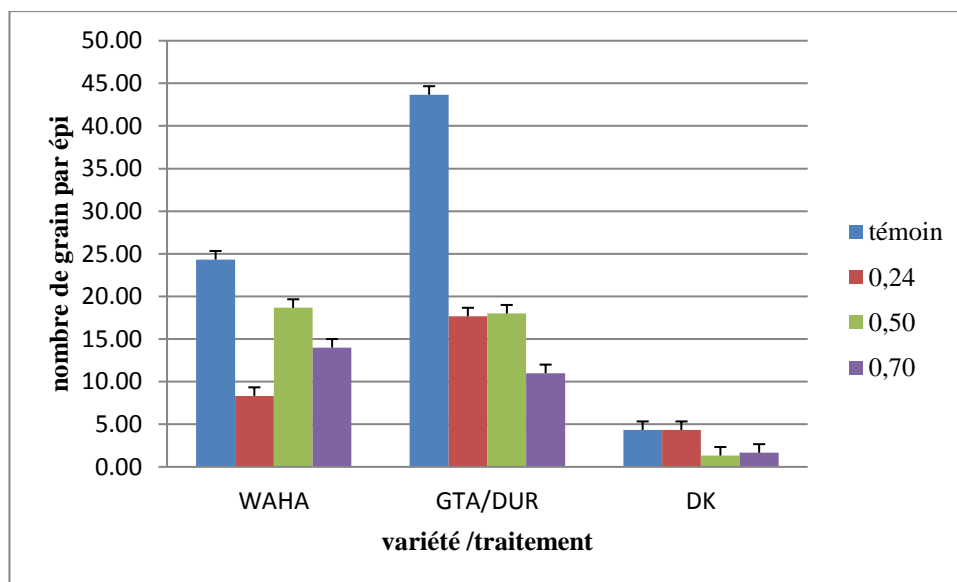


Figure 54: nombre de grain/épis enregistrés chez les génotypes Waha , Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS

Poids de 100 graines

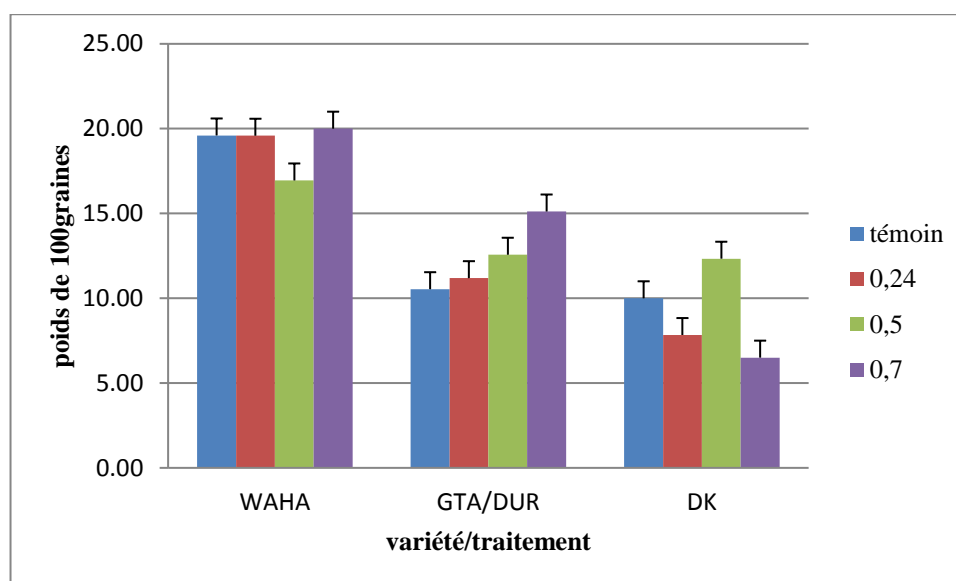


Figure 55: Poids de 100 graines enregistrés chez les génotypes Waha, Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS

Rendement en grains

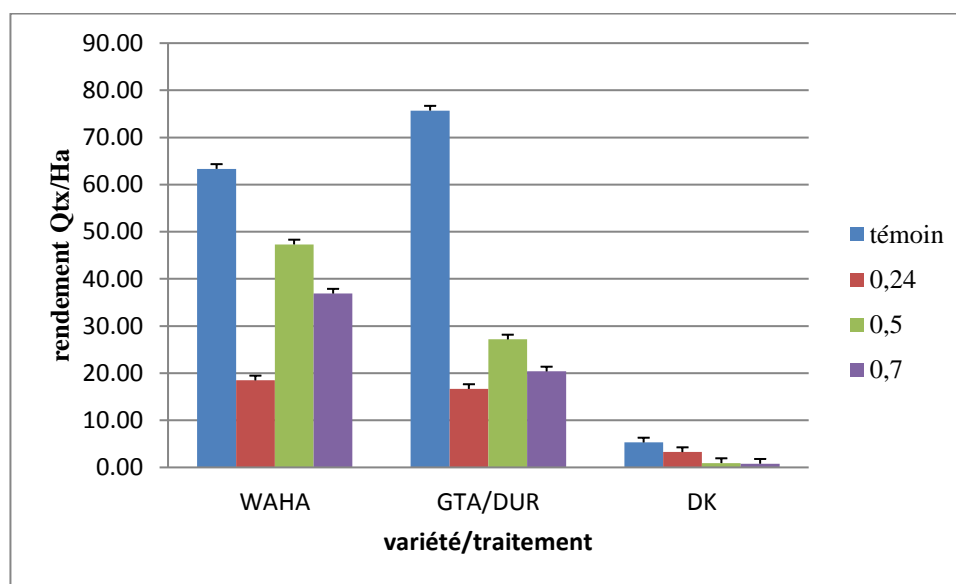


Figure 56: Rendement en grains enregistrés chez les génotypes Waha, Gta/dur, Djenah khotifa traités avec l'EMS

L'application du mutagène chimique EMS pour l'induction de mutation altère significativement les valeurs de rendement et ses composantes.

Rendement en grains

Des différences variétales très nettes ont été observées du point de vue rendement en grains. Gta/dur a réalisé un meilleur rendement en grains pour cette même variété le

contrôle et la mutée avec la concentration 0.5% a donnée un meilleur rendement, ce qui a été même montré avec **Dhole V J (2003)** où la concentration 0.4% d'EMS a donnée un rendement élevé avec une fréquence de 17%.

La variété Djenah Khotifa a quand à elle un faible rendement en grains, que se soit pour le contrôle ou les mutées. Ceci est sûrement dû au fait que cette variété avait besoin de plus de temps pour le remplissage de l'épi. Le nombre d'épis par pot est un paramètre important qui conditionne le rendement, d'ailleurs le nombre d'épi par pot été inférieur chez les variétés Waha et Gta/dur. Donc le rendement est lié à la fertilité de l'épi plutôt que sa taille (**Blum et pnel, 1990, Debaeke et al., 1996**). Ces résultats l'ont montré par le poids du grain qui a eu un effet positif mais non significatif sur le rendement en grains pour cette variété.

Le poids de 100 graines n'a montré aucune augmentation significative par rapport au contrôle ce que **Mohd rafik (2006)** a enregistré aussi, tandis que **Scossiroli (1964)** et **khan (1985)** ont montré le contraire. **Potdukh et al., (1994)** ont reporté qu'il n'y a pas une augmentation significative dans le poids des graines de blé dur après traitement Gamma. Ce qui a été montré dans l'étude avec le traitement EMS.

Le poids de 100 graines augmente chez les variétés Waha et Gta/dur traitées avec la concentration 0.7% d'EMS, Mais chez Djenah khotifa le poids a diminué avec cette même dose, où la concentration 0.5% a augmenté son poids.

Concernant le nombre de grains par épi, qui mesure la fertilité de l'épi, c'est l'une des caractéristiques variétale très influencées par l'environnement. On remarque chez la variété Djenah khotifa un nombre très faible en grains que se soit mutés ou contrôle, surtout pour la concentration 0.5%, même pour les autres variétés les concentrations d'EMS ont influencées sur le nombre de graines comparant au contrôle. Tandis que la concentration 0.5% a donné un meilleur nombre en grains pour Gta/dur et Waha.

Quant à la variété Waha il n'y a pas une différence significative, tous les mutées ont un groupe en commun avec le contrôle. Ce qui est pour les variétés GTA/dur et Djenah kotifa, la différence est significative où les trois concentrations se distinguent du contrôle, pas de groupe en commun.

II. Analyse statistique des données

Tableau 17: l'effet de la concentration EMS sur la germination des variétés de blé dur

Dose(%)	Cultivars			moyenne
	waha	Gta/ dur	dk	
0	99.67 ^a	97.67 ^{ab}	70.67 ^d	89.33 ^a
0.24	97.33 ^{ab}	57.00 ^e	50.33 ^e	68.22 ^c
0.5	89.67 ^b	75.67 ^{cd}	35.33 ^f	66.89 ^c
0.7	93.00 ^{ab}	80.33 ^c	52.00 ^e	75.11 ^b
moyenne	94.91 ^a	77.67 ^b	52.08 ^c	

Tableau 18: l'effet de la concentration EMS sur la longueurs de la tige des variétés de blé dur

Dose (%)	Cultivars			moyenne
	waha	Gta/dur	dk	
0	104,00 ^a	70,5 ^{bc}	78,00 ^b	84.16 ^a
0,24	100,66 ^a	64,66 ^c	71,00 ^{bc}	78.78 ^{ab}
0,5	74,33 ^{bc}	72,33 ^{bc}	69,66 ^{bc}	72.11 ^b
0,7	96,5 ^a	61,33 ^c	71,33 ^{bc}	76.39 ^b
moyenne	93.57 ^a	67.20 ^b	72.50 ^b	

Tableau 19: l'effet de la concentration EMS sur le nombre d'épi par pots des variétés de blé dur

Dose (%)	Cultivars			moyenne
	waha	Gta/dur	dk	
0	13,33 ^{bc}	16,66 ^a	12,33 ^{bc}	14.11 ^a
0,24	11,33 ^{cd}	8,66 ^e	9,33 ^{de}	9.77 ^b
0,5	14,33 ^{ab}	12,33 ^{bc}	5,00 ^f	10.55 ^b
0,7	13,33 ^{bc}	12,33 ^{bc}	7,00 ^{ef}	10.88 ^b
moyenne	13.09 ^a	12.50 ^a	8.41 ^b	

Tableau 20: l'effet de la concentration EMS sur le nombre de grains par épis des variétés de blé dur

Dose (%)	Cultivars			moyenne
	Waha	Gta/dur	Dk	
0	24,33b	43,67a	4,33ef	24.11a
0,24	8,33def	17,67bcd	4,33ef	10.11b
0,5	18,66bc	18 ,00bc	1,33f	12.66b
0,7	14,00cd	11,00cde	1,66ef	8.89b
moyenne	16.33b	22.58a	2.91c	

Tableau 21: l'effet de la concentration EMS sur le poids de 100 grains des variétés de blé dur

Dose(%)	Cultivars			moyenne
	Waha	Gta/dur	Dk	
0	19,60a	10,00de	10,00e	13.37a
0,24	19,58a	11,18cde	7,83f	12.68a
0,5	16,94b	12,56c	12,33cd	13.94a
0,7	20,00a	15,17b	6,50f	13.87a
moyenne	19.03a	12.35b	9.16c	

Tableau 22: l'effet de la concentration EMS sur le rendement en grains des variétés de blé dur

Dose(%)	Cultivars			moyenne
	waha	Gta/dur	dk	
0	63,33ab	75,69a	5,29f	48.10a
0,24	18,46def	16,64ef	3,26f	12.79c
0,5	47,30bc	27,15de	0.93,f	25.13b
0,7	36,87cd	20,36def	0.78f	19.34bc
moyenne	41.49a	34.96a	25.70b	

Analyse des protéines foliaire par SDS-PAGE

I. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE des mutant Gamma

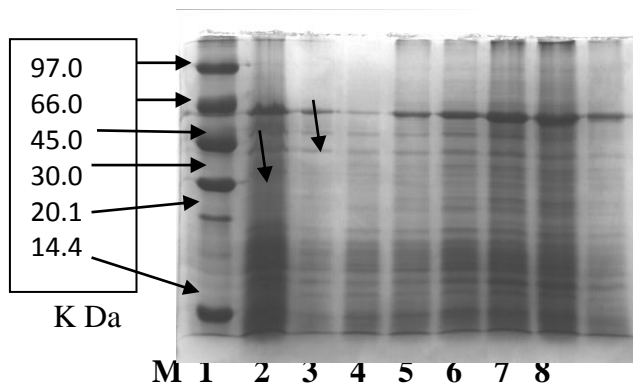


Figure 57 : Profil électrophoérétique des protéines foliaires relevés par 1D SDS PAGE variété GTA/dur (1-T ;2-M100Gy, 3-M180Gy, 4-M220Gy) et BM (1-T, 2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy)

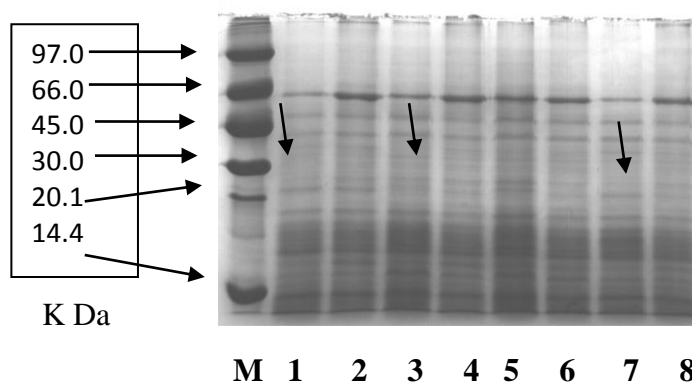


Figure 58 : profil électrophoérétique des protéines foliaires relevés par sds page variété DK (1-T, 2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy) et Waha (1-T, 2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy)

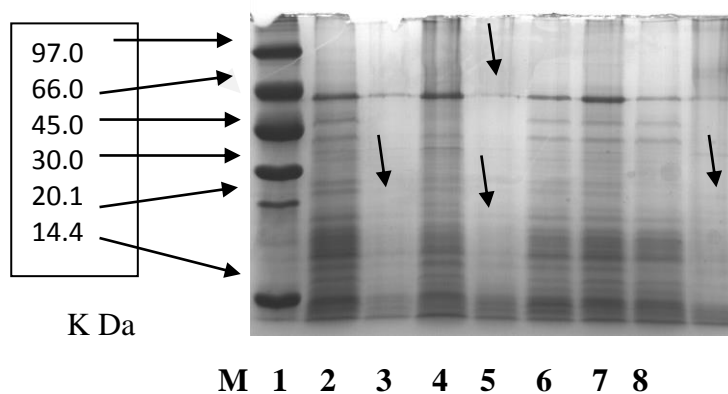


Figure 59 : profil électrophoérétique des protéines foliaires relevés par sds page variété GGR(1-T ;2-M100Gy, 3-M180Gy, 4-M220Gy) et M (1-T ;2-M100Gy, 3-M180Gy, 4-M220Gy)

Au cours de cette étude, nous avons conduit une expérimentation basée sur l'analyse des protéines totales extraites à partir des feuilles des 6 variétés ainsi que leurs mutants Gamma et 3 variétés ainsi que leurs mutants EMS.

A ce sujet les protéines totales extraites ont été soumises à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les profils obtenus sont dans les figures 57, 58, et 59

D'après ces profils nous avons pu déceler un polymorphisme en utilisant les données fournies par l'observation de l'absence ou la présence de bandes communes. En effet, chez les mutants Gamma 168 bandes ont été détectées chez les trois variétés GTA/dur, DK et BM, leurs poids moléculaire varient entre 13.250 et 103.667 Kda, et 140 bandes chez les trois autres variétés irradiées par 100, 180, 220 Gy.

On remarque que certaines bandes ont été présente chez les témoins, et absente chez les mutants, tandis que d'autres bandes ont été exprimé que chez les mutants, par exemple la bande 13.603 kda été présente chez le témoin de GTA/dur ainsi que les GTA/dur irradié par 10 et 25Gy,(figure 60) on remarque aussi des différences dans l'intensité des bandes. L'intensité de la bande est liée directement à la concentration de la protéine (**Jasso et al. 2002**).

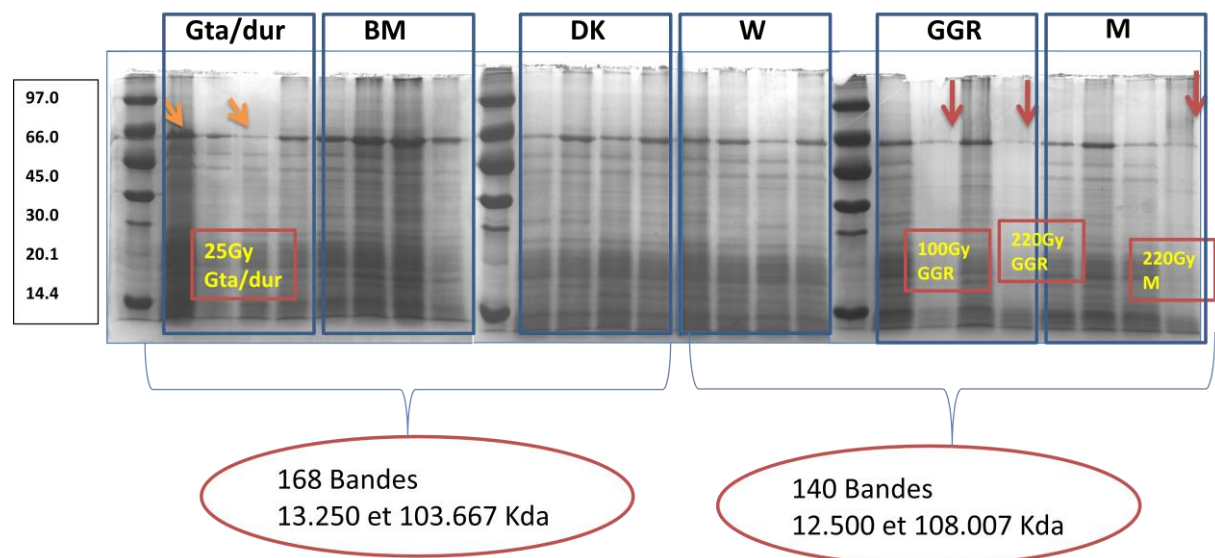


Figure 60 : profil électrophorétique montrant les différences entre les contrôles et les mutées aux rayonnements Gamma

La mutation a induit des changements dans les profils protéique, certaines protéines ont été inhibées, d'autres se sont surexprimées, d'autres qui sont apparues comparant au contrôle.

L'intensité des bandes été différente comparée entre les variétés, le contrôle et les irradiés, spécialement chez les doses fortes où l'intensité est petite avec la dose 220Gy.

Il a été apparu qu'il y a des bandes relativement plus intense comparé à ceux irradiés avec les doses 100 et 220 Gy.

On peut en déduire de l'analyse SDS-PAGE des profils protéique, les plantes irradiés et non irradiés varient légèrement. La majorité des bandes observés chez les irradiés et non irradiés, et l'intensité différent accordé au dosage Gamma.

L'augmentation des doses Gamma cause la dégradation des protéines, dans notre étude, SDS PAGE montre une différence légère dans les bandes des profils protéiques, entre les irradiés et non irradiés. Il y a certaines bandes absentes, d'autres nouvelles, changement dans l'intensité, mais qui ne sont pas significative, ses résultats sont similaire à celles de **Kiong (2008)**.

II. Détermination du profil protéique par SDS-PAGE des mutant EMS

Les mutants des trois variétés de blé dur des deux générations M1 et M2 ont été analysés par SDS-PAGE.

Les résultats révèlent quelques différences dans les profils protéiques, on observe que pour la M1 les bandes varient de 89.324 jusqu'à 2.16Kda, où plusieurs sont absentes chez les traités avec l'EMS.

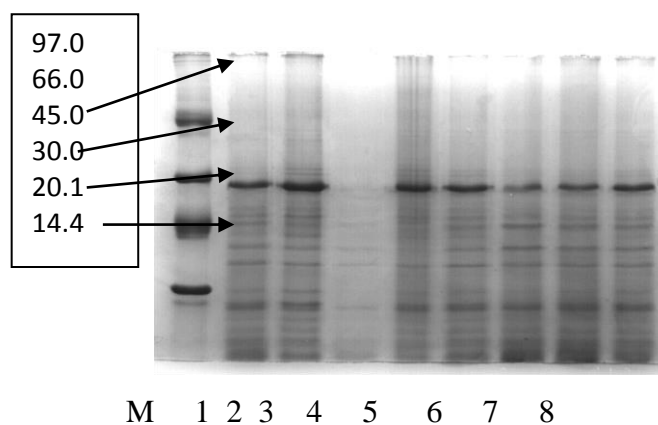


Figure 61: profil électrophoérétique des protéines foliaire relevés par sds page variété wahaM1(1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et GTA M1 (5-T ;6-M0.24 %, 7-M0.5%, 8-M0.7%)

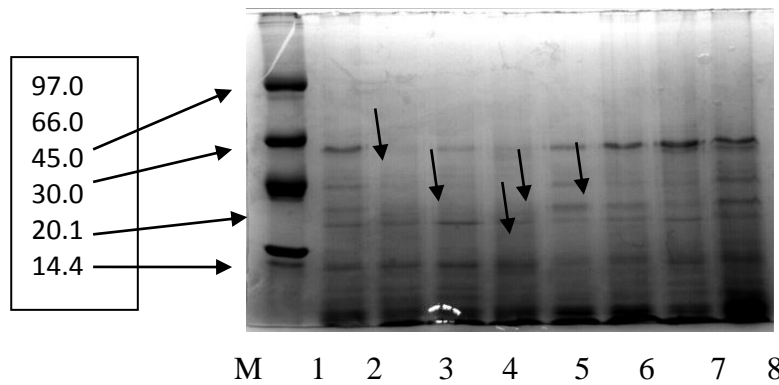


Figure 62 : profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par sds page variété DK M1(1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et WAHA M2 (5-T ;6-M0.24 %, 7-M0.5%, 8-M0.7%)

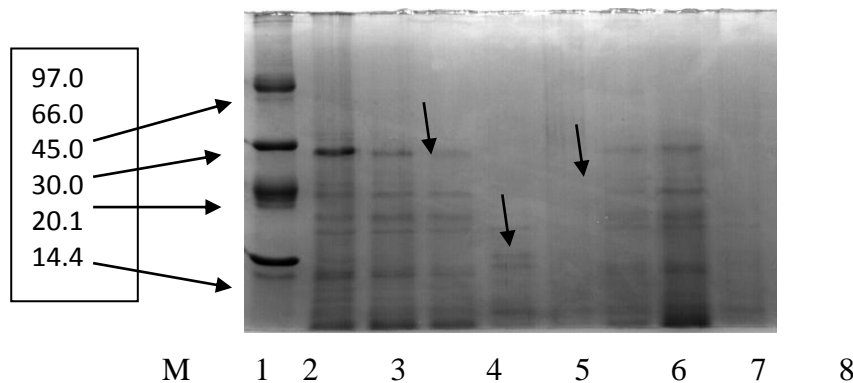


Figure 63: profil électrophorétique des protéines foliaire relevés par sds page variété GTA M2(1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et DK M2 (1-T ;2-M0.24 %, 3-M0.5%, 4-M0.7%)

Les mutants des trois variétés de blé dur des deux générations M1 et M2 ont été analysés par SDS-PAGE.

Les résultats révèlent quelques différences dans les profils protéiques, on observe que pour la M1 les bandes varient de 89.324 jusqu'à 2.16Kda, où plusieurs sont absentes chez les traités avec l'EMS.

Des bandes sont absentes dans la M1 de la variété Waha traitée avec la concentration 0.5% mais ces mêmes bandes ont réapparues lors de la M2, ceci peut être expliqué par le changement de base qui à été induit par la concentration 0.5%, ce qui a engendré le changement de polypeptide, et en fin le changement de la protéine, mais après la deuxième génération on remarque la présence de cette protéine, qui s'explique par le réarrangement de gènes.

D'autres bande sont présente lors de la première génération comme chez la variété GTA/dur traitée avec la concentration 0.7%, mais qui sont absente à la deuxième génération,

qui s'explique par une mutation silencieuse qui a touché le gène, mais qui s'est exprimé que lors de la seconde génération.(Figure 64)

La bande 52.555Pa est présente chez la variété waha traitée avec la concentration 0.24% mais absente chez le contrôle, ainsi que les deux autres mutants.

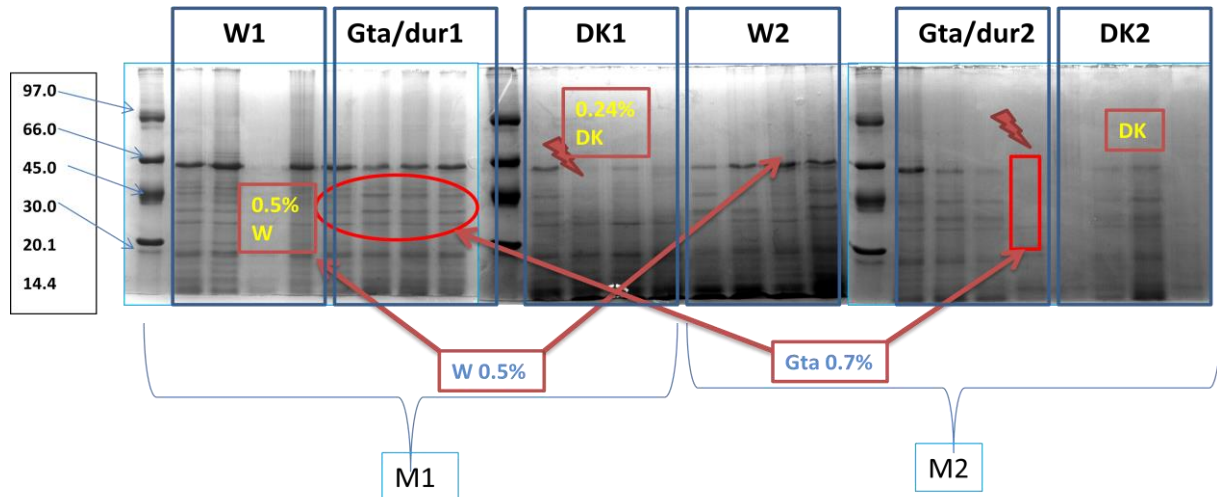


Figure 64 : profil électrophorétique montrant les différences entre les contrôles et les mutés à l'EMS

Chez les plantes l'EMS cause des mutations ponctuelles, en produisant des transitions G :C à A :T dû à l'alkylation de la base G (Comai, 2006), et cette base alkylée G s'apparie avec la base T au lieu de son appariement classique avec la base C (Henikoff, 2004), mais la perte ou la délétion d'un segment de chromosome peut se produire. L'EMS a le potentiel d'altérer des loci d'intérêts particuliers en induisant un grand nombre de mutations étroitement liées. Provoquant ainsi des changements dans les protéines, ce qui génère des variations génétiques.

L'EMS est largement utilisé, par ce que il conduit à des mésappariements des nucléotides avec leurs bases complémentaires ce qui provoque des changements de base après la réplication, plusieurs mutagènes ont un effet clastrogène (endommagement des chromosomes) sur les plantes par des radicaux réactifs dérivés de l'oxygène (Yuan, 1993).

Etude du polymorphisme par les microsatellites

L'évaluation de la variabilité génétique au niveau de l'ADN dans les lignées mutantes et leurs progénitures (contrôles) à également été menées

Qualité de l'ADN

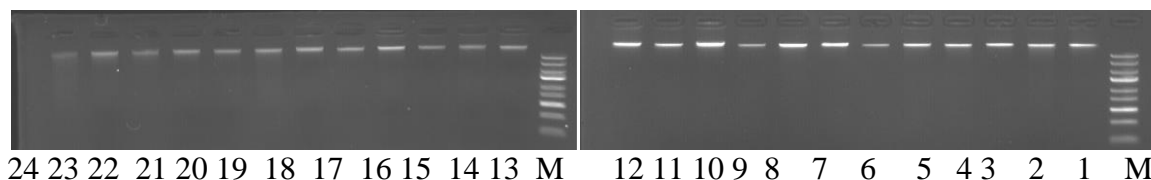


Figure 65 : Qualité de l'adn des mutant Gamma GTA/DUR (1-T ;2-M10Gy, 3-M25Gy, 4-M50Gy) , BM (5-T ;6-M10Gy, 7-M25Gy, 8-M50Gy), DK(9-T ;10-M10Gy, 11-M25Gy, 12-M50Gy) , WAHA(13-T ;14-M100Gy15-M180Gy, 16-M220Gy) GGR(17-T ;18-M100Gy, 19-M180Gy, 20-M220Gy), M(21-T ;22-M100Gy, 23-M180Gy, 24-M220Gy)

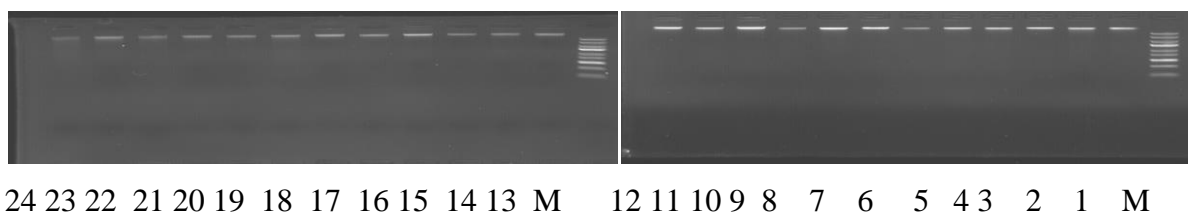


Figure 66 : Qualité de l'adn des mutant EMS Waha M1 (1-T ;2-M0.24%, 3-M0.5%, 4-M0.7%) et GTA/DUR M1(5-T ;6-M0.24%, 7-M0.5%, 8-M0.7%) DK M1(9-T ;10-M0.24%, 11-M0.5%, 12-M0.7%) et WAHA M2(13-T ;14-M0.24%,15-M0.5%, 16-M0.7%) GTA/DUR M2(17-T ;18-M0.24%, 19-M0.5%, 20-M0.7%) et DKM2 (21-T ;22-M0.24%, 23-M0.5%, 24-M0.7%)

I. Résultats d'extraction d'ADN

Les extraits d'échantillons d'ADN obtenus après l'extraction CTAB à partir d'un gramme de feuilles de plantes donnent un extrait clair, après migration sur gel d'agarose 1.5%, on observe une bande d'intensité moyenne sans trainée, cette bande nous indique qu'il ya une quantité d'ADN satisfaisante, et les extraits pur et de bonne qualité.

La mesure d'ADN et sa quantification à été faite par le Nanodrop, les résultats de quantification sont sur le tableau. (Annexe 6)

Les marqueurs microsatellites ont été utilisés pour étudier la nature et le degré de la variation génétique induite par les rayons Gamma et l'EMS et pour détecter le polymorphisme chez six variétés de blé dur. Parmi les 12 amorces utilisés deux d'entre elles (BARC8

et WMC322) n'ont pas généré de profils polymorphe, contrairement aux autres amorces (X1; X2, wms131, wmc177, wms497, wms124, wms6 ; wmc24, wmc264 ;wmc134) ont produit des profils électrophorétique polymorphe, et montrent une variation entre les variétés mutantes

Les marqueurs moléculaires nous procurent une méthode efficace pour caractériser artificiellement la variabilité génétique induite chez les plantes

II. Résultats d'amplification par PCR-SSR

Les tests d'amplifications pour les 12 amorces ont été effectués sur l'ADN des mutants ainsi que leurs parents.

Le produit d'amplification est testé sur un gel d'agarose 3% en présence du marqueur de taille **100bp**

Ces 48 échantillons d'ADN, ont été amplifiés par la majorité des amorces sauf pour **BARC8** et **WMC322** il n'y a pas eu d'amplification, les microsatellites amplifiés ont produit des profils différents, certains avec une seule bande d'autres plusieurs après migration d'ADN sur gel d'agarose 3%. Quelques différences ont été observés entre les mutants Gamma et EMS et leur parents, pour les mutants Gamma parmi les 12 marqueurs 7 sont polymorphe (84%), et pour le cas d'EMS parmi les 12 amorces 6 sont polymorphe (50%). Les résultats sont indiqués dans le tableau 23

Les microsatellites amplifiés sont : **wmc134, wmc264, wmc24, wms6, wmc124, wms497, wmc177, wms131, X1, et X2.**

Les **barc8** et **wmc322** n'ont pas été amplifiés, mais pour le microsatellite **barc8** on observe 3 bandes de faible intensité dans les puits de la variété Benimestina traité avec la dose 50Gy ; la variété GGR traitée avec la dose 220Gy aussi, et la variété M traitée avec la dose 180Gy.

Pour les microsatellites amplifiés l'intensité des bandes obtenue varie d'un microsatellite à un autre, et d'un traitement à un autre. On peut déterminer le degré d'amplification des microsatellites par l'intensité des bandes obtenues.

les figures de 57 à 63 représentent les résultats du test d'amplification des 24 ADN des variétés de blé dur (BM, GTA ,DK) et (WAHA, GRR,M) après migration électrophorétique de l'ADN amplifié sur gel d'agarose 3% en présence d'un marqueur 100bp

- **Amorce wmc134**

- ✓ **mutants Gamma** le profil montre la présence de 2 bandes, une présente chez toutes les variétés avec tous les traitements d'un poids moléculaire de 182.359pb, l'autre qui a un poids moléculaire inférieur à 100pb, une autre bande est présente que chez la

variété Mridj traitée avec la dose 220Gy, et chez la variété GGR traitée avec la dose 220Gy, la variété DK traitée avec la dose 50Gy, la variété waha traitée avec 100Gy, d'un poids moléculaire de 111.340pb, la présence ou l'absence des bandes est sûrement dû à une mutation.

- ✓ **Mutants EMS** le profil montre une bande d'un poids moléculaire 179.454bp présente chez tous les traitements sauf pour la variété benimestina avec la concentration 0.5%, 0.7% qui à réapparue en M2 avec la concentration 0.5%, ce qui nous envoie à dire que la mutation à été la cause de la perte de la bande dans la première génération, par contre avec la concentration 0.7% cette bande est toujours absente. on remarque aussi d'autres bandes entre 100 et 750 pb qui sont en majorité dans la M1 chose qui explique que la mutation à touché la première génération mais après réarrangement les gènes ont refait face.

- **Amorce wmc 264**

- ✓ **Mutants Gamma** l'ADN à été amplifié, le produit d'amplification a donné pour chaque individu une bande qui a migrée de la même distance d'un poids moléculaire de 140.374pb sauf pour la variété Mridj traitée avec la dose 220Gy cette bande a migré d'un poids de 123.182pb, et l'intensité des bandes est différente. Cette amorce n'est pas polymorphe pour toutes les variétés.
- ✓ **Mutants EMS** une seule bande est apparente d'un poids moléculaire de 151.508pb, mais pas chez tous les individus, surtout pour la M1 ou cette bande est présente que chez waha avec la concentration 0.24% et 0.5%. Et pour la variété Djeneh khotifa avec la concentration 0.24%. Tandis pour la M2 cette bande est présente chez plusieurs individus. Avec des intensités faibles

- **Amorce wmc 24**

- ✓ **Mutants Gamma** l'ADN de toutes les variétés ainsi que leurs mutants à été amplifié, d'une intensité un peu forte, et une seule bande est apparue d'un poids moléculaire de 142.400, sauf pour la variété Waha traitée avec 180Gy, l'intensité est faible.
- ✓ **Mutants EMS** une seule bande est présente chez toutes les variétés 132.111 avec une intensité plus au moins forte.

- **Amorce wms6,**

- ✓ **Mutants Gamma** l'ADN des variétés à été amplifié mais pas de la même distance, une bande à 217.739 pb une autre 262.625pb, car certains ADN ont été polymorphe, d'autres monomorphe, et chez la variété waha traitement 100 Gy et 180Gy, l'ADN n'a

pas été amplifié ce qui est peut être du à une mutation. L'intensité des bandes été différentes.

- ✓ **Mutants EMS** cette amorce est polymorphe, plusieurs bandes sont présente entre 100 et 300pb, d'autres inferieur à 100 pb pour toutes les variétés,

- **Amorce wms124,**

- ✓ **Mutants Gamma** le produit d'amplification à donné une bande de la même distance inferieur à 100pb, et d'autres bandes aussi ont été observé chez certains traitement entre 100 et 500 pb, et absente chez d'autres, ceci est surement du à la mutation ou à des artefact.
- ✓ **Mutant EMS** l'adn de toutes les variétés à été amplifié en donnant deux bandes avec une intensité différente. Pour la première bande un poids de 255.136pb, elle est absente chez la variété DK traitée avec la concentration 0.24% chez la deuxième génération, d'autres bandes d'une intensité très faible sont apparue comme montré dans le profil figure 65.

- **Amorce wms497**

- ✓ **Mutants Gamma et EMS** l'ADN à été amplifié, la présence de différents allèles.

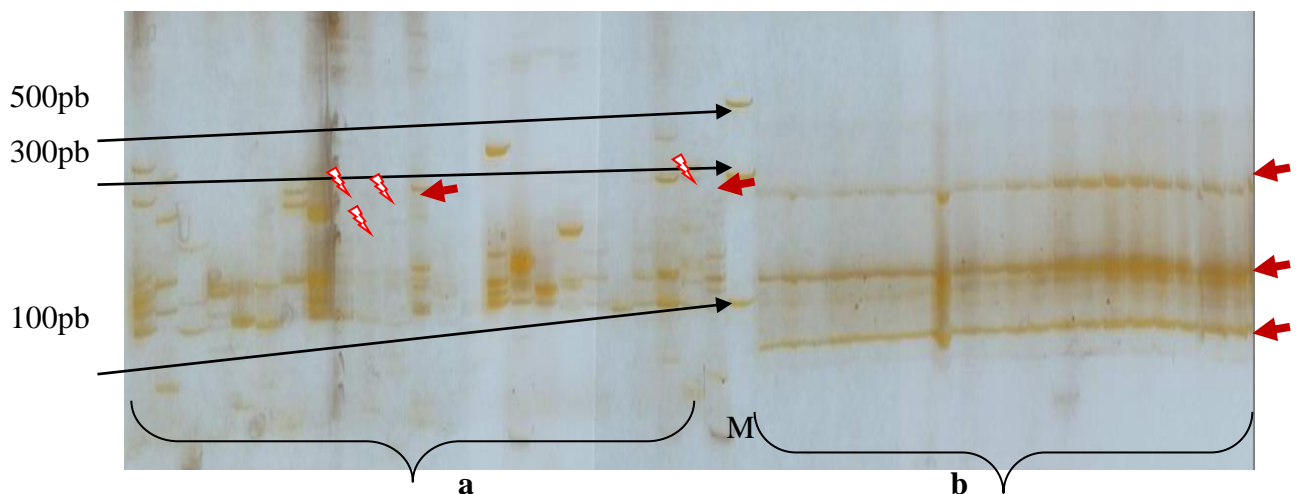


Figure 67 : Profil électrophorétique sur gel d'acrylamide des échantillons mutés avec les rayons Gamma amplifiés avec l'amorce wms 497 (a) et l'amorce X1 (b)

- **Amorce wmc177,**

- ✓ **Mutant Gamma**
- ✓ l'ADN des variétés amplifiés, et le produit d'amplification à donné 2 bandes après migration la taille des bandes est du même poids de 200.442pb, cette bande est

absente chez la variété GGR traitée avec la dose 100Gy, et une autre bande est présente d'un poids moléculaire de 23.308pb,

- ✓ **Mutant EMS** l'adn à été amplifié et à proliféré deux bandes de la même taille 196.762 pb, la bande est absente chez la variété DK la première génération traité avec la concentration 0.7% et la même variété dans la deuxième génération traitée avec les concentrations 0.24%, 0.5% ; et 0.7% ya pas eu d'amplification, l'intensité est faible. une autre bande inferieur à 100pb est observée.

- **Amorce X1,**

- ✓ **Mutants Gamma et EMS** ya eu 3 bandes qui ont migré chacune de la même façon mais avec des intensités différentes la première d'un poids moléculaire de 471.854pb, une autre à 317.793pb, l'autre à 214.740pb.

- **AmorceX2,**

- ✓ **Mutant Gamma et EMS** l'intensité été très faible ; il y a pas eu d'amplification pour tout les ADN

Le test d'amplification des microsatellites montre que les conditions d'amplification et les paramètres été adéquat, sauf pour *barc8* et *wms 322*, une optimisation des conditions d'amplification est essentiel.

Les microsatellites utilisés dans cette étude pour la variabilité génétique, s'est révélés différentes d'un microsatellite à un autre, où certains sont monomorphe, d'autre polymorphe pour chaque variété. Dans le but d'être sur que ce polymorphisme est du à une mutation et pas une mutation spontané, les mutations ont été testé sur SC avec certaines amorces, et chaque amplification à été faites plusieurs fois.

Des études ultérieurs ont montrées que les SSRs sont hautement polymorphe chez le blé (**Manifesto et al., 2001; Zhang et al., 2002**). Mais le mécanisme de l'induction de la mutation chez les microsatellites des plantes est encore mal connu.

L'une des caractéristiques de ces séquences répétées, c'est qu'ils ont tendance à avoir des mutations plus élevées qui conduisent la plupart du temps à des changements de longueur (**Udupa and baum 2001**). Les microsatellites ont une instabilité inhérente spontanée due à la susceptibilité de l'un des deux processus à savoir le glissement lors de la réplication ou une recombinaison inégale, et les taux élevés de ces deux processus sont vraisemblablement impliqués dans la sensibilité de ces loci à l'induction de rayonnements (**Bridges 2001**) d'ailleurs certains auteurs disent que certaines mutations induites non ciblées provoquent une instabilité au niveau de ces séquences répétées et comme les microsatellites sont associés avec des régions codantes du génome, donc l'instabilité de ces séquences répétées influent la

fonction des gènes dans certains cas. (Kovalchuk *et al.*, 2000, Bridges 2001, Bouffler *et al.*, 2006)

Tableau 23 : Les marqueurs SSR, le nombre total d'allèles, le nombre d'allèles polymorphes, et le pourcentage du polymorphisme des 18 mutants ainsi que le contrôle de 6 variétés des mutants Gamma et 3 variétés des mutants EMS

Amorce	Motif répété	Nombre total d'allèles		Nombre d'allèle Polymorphe		Pourcentage du polymorphisme (%)	
		GAMMA	EMS	GAMMA	EMS	GAMMA	EMS
Wmc134	(GT)17	4	9	2	1	50	25
Barc8	(TTA)16+11	1	0	1	0	100	0
Wmc264	(GA)16	1	1	1	1	100	100
Wmc322	(GT)24	0	0	0	0	0	0
Wmc24	(GT)28	1	1	1	1	100	100
Wms6	(GA)40	5	9	2	4	40	44.44
Wms124	(CT)27(GT)18imp	6	2	1	2	16.66	100
Wms497	(GT)29imp	/	/	/	/		
Wmc177	(CA)21	2	2	2	2	100	100
Wms131	(CT)22	4	2	4	1	100	50
X1		3	3	3	3	100	100
X2		3	3	3	3	100	100

Une étude comparative effectuée sur une population de plantes de blé cultivées pour une seule génération dans une zone fortement contaminée autour de Tchernobyl centrale nucléaire avec une population témoin développée ailleurs a indiqué une augmentation de la fréquence des mutations germinales dans des régions microsatellites dans la population exposée (Kovalchuk *et al.*, 2000). Des études antérieures ont montré que les mutations provoquées par des neutrons rapides, ainsi que des rayons gamma sont principalement des délétions plus grandes que 5 Kpb (Shirley *et al.*, 1992 ; Bruggemann *et al.*, 1996 ; Cechini *et al.*, 1998). Mais les rapports récents ont révélé un modèle beaucoup plus complexe de mutations germinales qui non seulement inclus la suppression complète de loci, mais a également montré un biais en faveur des mutations avec des gains et des pertes de plusieurs unités de répétition. des insertions fréquentes d'ADN d'origine inconnue ont également été observées (Kovalchuc *et al.*, 2003)

Cette étude indique qu'il y a une possibilité que les SSR détecte les variations induites par les rayons gamma, en perspective, l'analyse de la séquence de chaque polymorphisme peut aussi donner un aperçu de la nature moléculaire de la mutation

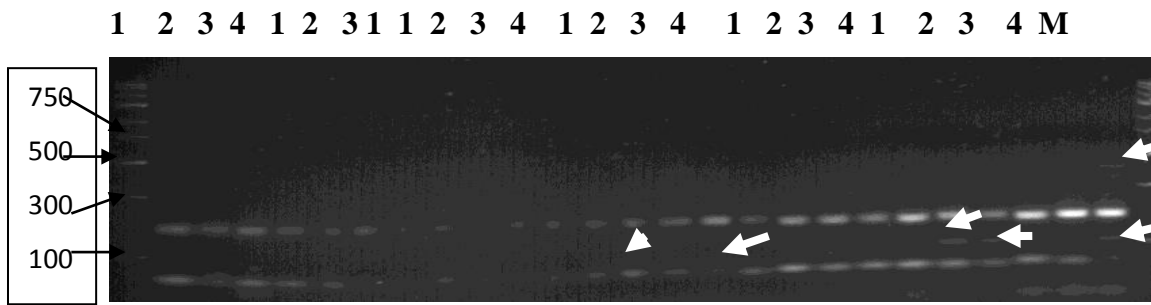


Figure 68 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec les rayons GAMMA amplifiés avec l'amorce wmc134



Figure 69: Profil électrophorétique des échantillons mutés avec GAMMA amplifiés avec l'amorce wms6

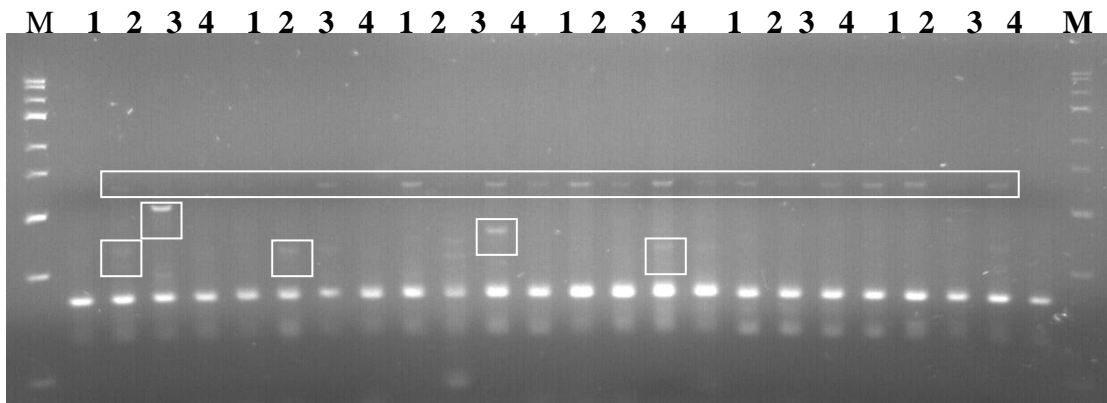


Figure 70 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec les rayons GAMMA amplifiés avec l'amorce wms124

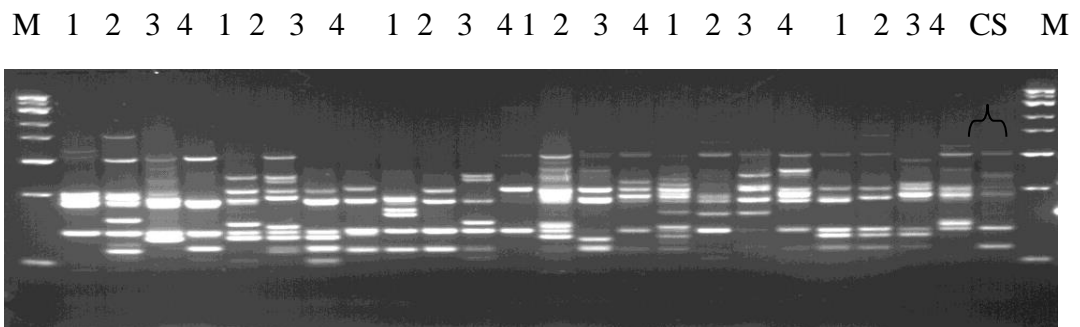


Figure 71 : Profil électrophorétique des échantillons mutés avec les rayons GAMMA amplifiés avec l'amorce wms497

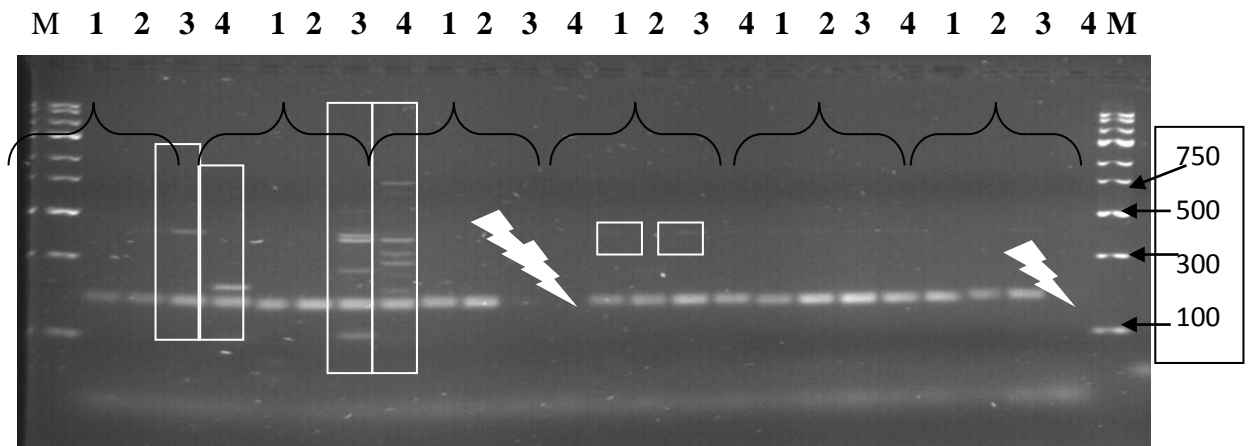


Figure 72 : Profil électrophoérétique des échantillons mutés avec l'EMS amplifiés avec l'amorce wmc134

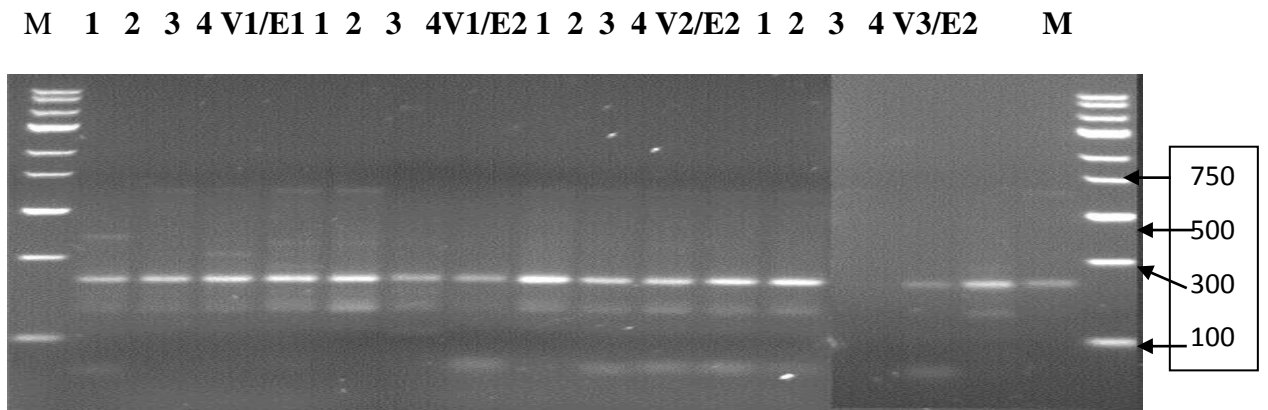


Figure 73 : Profil électrophoérétique des échantillons mutés avec l'EMS amplifiés avec l'amorce wms124

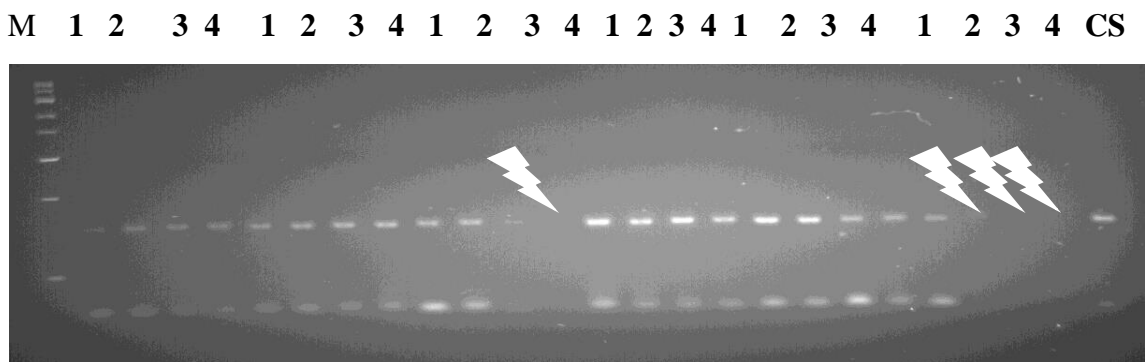


Figure 74 : Profil électrophoérétique des échantillons mutés avec l'EMS amplifiés avec l'amorce wms177

Conclusion et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de cette thèse était de caractériser et de tenter de comprendre les effets de la mutagenèse chimique et physique sur le blé dur, et de trouver les nouvelles variétés tolérantes à la sécheresse de blé dur ainsi que le polymorphisme et la diversité qu'a été générés par les mutations. La synthèse bibliographique (en partie I) a présenté les différents effets de la mutagenèse physique et chimique sur la plante. Nous avons alors décidé de caractériser certains effets de ces mutations et de rechercher une nouvelle source de tolérance à la sécheresse, selon deux approches différentes: 1) caractérisation morphologique physiologique, biochimique et cytogénétique des phénotypes ; 2) étude moléculaire par les microsatellites SSR avec 12 amorces. Après avoir résumé et discuter les résultats obtenus de ces deux approches, nous présentons, dans cette dernière partie, quelques perspectives de ces travaux.

Nous pensons avoir démontré que les travaux entrepris durant cette thèse ont conduit à savoir d'avantage sur les effets des mutagènes sur les différentes variétés de blé dur. Suivant les conditions de traitements et le genre de mutagène utilisé (physique ou chimique), nous observons une multitude de mutants présentant des caractères diversifiés. D'ailleurs, les résultats de cette recherche montrent que les différentes doses de l'irradiation Gamma ont des effets différents sur les paramètres physiologiques et biochimiques, comme l'augmentation de la capacité de germination, la présence de nouvelles bandes protéique ainsi que le traitement chimique à l'EMS, où lors de la mutagenèse, plus de 50% des plantes meurent, d'autres qui sont indésirables ; Des ségrégant non fertiles qui apparaissent à la suite de changements structuraux de chromosomes qui doivent être éliminés dans les premières générations après traitement et d'autres traitements qui n'ont eu aucun effet sur la plante, il n'y a pas eu de différence significative entre le contrôle et les mutées.

Le pourcentage de germination augmente chez les plantules irradiées avec la dose 25Gy et 100Gy comparé au contrôle non irradié dans le milieu Knops. Ces mêmes doses ont améliorées la longueur des feuilles et racines, le volume racinaire et le poids frais et secs. Quant à l'indice mitotique, il diminue avec l'augmentation de la dose donc l'effet inhibiteur

Conclusion générale et perspectives

des rayons Gamma sur l'indice mitotique indique que ces rayons ont un effet mutagène sur les cellules embryonnaire des racines du blé dur.

Ces résultats montrent que la régulation de certains paramètres physiologiques et le développement des plantes après irradiation, peut être utilisé pour le contrôle des stress biotiques et abiotique comme la sécheresse.

L'étude du comportement des variétés de blé dur suite à un stress hydrique, nous a permis de trouver quelques mutants qui répondent mieux à ce stress par rapport au contrôle : la variété Waha mutée avec les rayonnements Gamma (180Gy), la variété GGR mutée avec la dose 220Gy et la variété Gta/dur traitée avec la dose 50Gy. Ces mutants ont eu la possibilité de bien répondre au manque d'eau, leur adaptation à ce stress à été relevée suite à l'étude de plusieurs paramètres (TRE, T°, PO, et chlorophylle), ces derniers donnent un aperçu sur la capacité de la plante à résister aux stress.

Ces résultats ne sont pas en corrélation avec ceux de la culture Knops, où cette dernière a pu isolée de nouvelles populations qui ont le caractère de tolérance à la sécheresse avec les doses 100Gy, et 25Gy avec la variété DK. Tandis que pour la culture sous serre, les nouveaux mutants tolérants sont avec les doses 50Gy, 180Gy, 220Gy.

Comme les gènes responsables de la tolérance à la sécheresse sont multiples et que le mécanisme d'adaptation est bien complexe, les rayons Gamma ont eu des effets mutagènes sur de nombreux gènes. Ces résultats confirment que la mutagenèse est bien aléatoire et qu'à chaque fois les rayons touchent un gène bien précis et que chaque variété répond différemment aux doses et aux stresse.

En perspective, étudier d'autres aspects de ces 5 nouvelles population mutantes et faire le crible à fin de trouver celles qui répondent mieux à ce stress. En suite, faire le séquençage pour trouver le ou les gènes touchés par la mutation et en fin les cloner pour les introduire dans d'autres variétés et espèces.

C'est clair que la mutagenèse peut être utilisée pour la production des mutants qui sont plus tolérants aux stress environnemental ; d'autre part l'induction de mutations est nécessaire pour augmenter la variabilité génétique. L'avantage majeur des mutations induites est que les mutants à traits multiples peuvent être isolés par rapport à l'approche transgénique où seul un trait peut être introduit.

Conclusion générale et perspectives

Cette étude indique aussi qu'il y a une possibilité que les SSR détectent les variations induites par les rayons gamma, plusieurs profils ont été générés, où certains montrent que la mutation a touché le gène (absence des allèles). La fonction des gènes de tolérance à la sécheresse est influencée par ces séquences répétées. Les mutations ont touché plusieurs allèles de ces marqueurs, donc le gène qui est associé à ces séquences sera instable et par conséquent, sa fonction change. En perspective, l'analyse de la séquence de chaque polymorphisme peut aussi donner un aperçu de la nature moléculaire de la mutation.

Les résultats de l'étude *in vitro* sont considérés comme études préliminaires. Dans le but d'éviter le stress oxydatif, une étude plus approfondie doit être établie, en utilisant des populations de blé dur plus nombreuses et des doses des rayons Gamma moins faibles. La culture *in vitro* accompagnée de la mutagenèse reste une bonne technique pour l'amélioration des plantes et un complément aux techniques conventionnelles.

Cette étude a montré que les doses faibles des différents mutagènes chimiques et physiques, induisent plus de variabilité que les doses fortes. Le travail sur les mutations de blé dur est limité contrairement à d'autres espèces, quelques-unes ont été trouvées. Il y a un besoin de commencer des recherches extensives en utilisant un nombre large de doses et des concentrations différentes et de différents mutagènes, ce qui pourrait induire une vraie variabilité désirable *in vitro* et *in vivo*, dans le but d'exploiter les nouvelles ressources dans l'amélioration et le développement des variétés de blé dur.

Valorisations Scientifiques

RESEARCH ARTICLE

International Journal of Advanced Research (2015), Volume 3, Issue 10, 246 – 256 ISSN 2320-5407

Effect of Gamma irradiation on morphological, biochemical, physiological character and cytological studies, of durum wheat mutants

Yamouna Louali, Nadir Belbekri, Ryma Bouldjej, Nadia Ykhlef, Abdelhamid Djekoun

Abstract

This investigation was carried to determine the effect of Gamma radiation on germination and physiological characteristic of 6 varieties of durum wheat, 3 of them (Gta/dur (v1), Djenah khotifa(v2), Benimestina(v3)) was irradiated with different doses (10, 25, 50Gy) and three others (Waha(v4), Goumgoumrkham(v5), Mridj(v6)) was mutated with high dose (100, 180, 220Gy), the percentage of germination increased in seedling irradiated with 25Gy and 100Gy as compared to non irradiated one, plants maintained on Knops culture medium, improved with this same dose the root and shoot length, volume and weight as compared to non irradiated one, and others doses. Chlorophyll a was higher than chlorophyll b in both irradiated and non irradiated seeds. The mitotic index was also studied; it has been decreased with increasing doses of gamma radiation.

The protein study by SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis) generated a proteic polymorphism with different profiles: absence of certain bands as compared to control and presence of new bands, after inducing water stress by PEG(*polyéthylène glycol*) 6000 at 15% in culture medium. This result showed that the regulation of certain physiological parameters and the growth of plants after their irradiation with gamma can be used for the abiotic control like drought, and the inhibitory effects of gamma rays on the mitotic index indicated that gamma rays have mutagenic effects on embryonic roots of wheat.

Key words: Induce mutation, durum wheat, Gamma irradiation, mutagenesis, water stress

**1^{er} congrès international sur l'aide à l'agriculture
Algérienne.**

**Polymorphisme hétérochromatique d'une descendance issue d'un
croisement entre *Triticum durum* et *Aegilops geniculata***

Louali Yamouna, Djekoun abdelhamid, Ykhlef Nadia, Kellou Kamel

Résumé

L'étude cytogénétique demeure l'une des méthodes analytiques indispensables dans les programmes d'amélioration des blés, afin de mettre en évidence les anomalies qui peuvent toucher les chromosomes lors des croisements.

A travers cette étude cytogénétique nous avons essayé de mettre en évidence la garniture et la structure chromosomique des espèces étudiées, en utilisant la technique de coloration chromosomique au giemsa avec la détermination des caryotypes de la variété Oued zenati 368, et de l'espèce *Aegilops geniculata* ainsi que leur descendant octoploïdes OZ/AE.*geniculata*.

L'analyse caryologique par la coloration au Feulgen des chromosomes du blé à été difficile et délicate par l'application des divers prétraitements tels la colchicine et l'eau glacée. A chaque prétraitement de nombreux essais ont été effectués simultanément à des durées variées.

Le caryotype du blé dur, *d'aegilops geniculata* ainsi que leur hybride à été établi. Les idiogrammes de nos génotypes montrent que la majorité des chromosomes sont métacentriques. La variété OZ présente deux constriction secondaires avec un seul satellite. Les caryotypes sont symétriques et les deux génotypes semblent hétérogènes du point de vue morphologie des chromosomes et de chromosomes marqueurs.

Mots clés : blé, *Aegilops*, hybride interspécifique, caryotype et C-banding

Doctoriales Mars 2013

La production de génotypes mutants et tolérance à la sécheresse chez le blé dur, recherche de nouvelles sources génétiques pour la tolérance à la sécheresse.

Louali Yamouna, Ykhlef Nadia, Djekoun Abdelhamid

Résumé :

Le blé est l'aliment de base dans plusieurs régions du monde ; il représente en Algérie une culture clé, mais près d'un tiers des terres arables souffrent d'un déficit en eau qui limite notamment les rendements des productions. L'objectif de cette recherche est la production de mutants de blé dur aléatoirement qui répondent mieux à la sécheresse, L'obtention de ces mutants, caractériser d'un point de vue moléculaire, possédant des caractères d'adaptation pour la tolérance à la sécheresse pouvant ainsi éviter la période de sécheresse, avec un rendement stable nous permettrait de mettre à la disposition de l'agriculteur les variétés recherchées.

Nos expérimentations ont été faites sous serre, ainsi qu'*in vitro*, avec différents mutagènes chimiques et physique qui ont été induites sur des variétés de blé dur :

- La mutation physique par l'irradiation gamma à été induite :
 - Aux cals après 3 mois dans le milieu de callogénèse, au centre nucléaire COMENA, avec différentes doses pour chaque variété, les cals présentent des brunissements partiel et massif tandis que les témoins quelques uns ont étaient brunis, après quelques semaines de l'irradiation, ce brunissement peut s'expliquer par une augmentation des activités peroxydases (néfaste) et une diminution de l'activité catalase, ce qui nous laisse dire que l'irradiation à été en partie la cause.
 - Ainsi que pour des graines de 6variétés avec différentes doses, ou le taux de pré germination, la longueur des racines, et des feuilles ont été établie, ainsi que le volume des racines. d'autres graines ont été semées sous serre pour des éventuels paramètres.
- La mutation chimique par l'EMS à été induite sur 3 variétés de blé dur, visant a faire la technologie tilling , l'identification, et le crible des mutants s'effectue sur la M2.

Mots clés : blé dur, mutagénèse, TILLING, irradiation gamma, marqueurs moléculaire

Doctoriales avril 2015

Production de génotypes mutants et tolérance à la sécheresse chez le blé dur, recherche de nouvelles ressources génétiques pour la tolérance à la sécheresse

Louali yamouna, Ykhlef nadia, Djekoun abdelhamid

L'objectif de cette recherche est la production de mutants de blé dur aléatoirement qui répondent mieux à la sécheresse, Des mutations physique par l'irradiation gamma ont été induite aux cals après 3 mois dans le milieu de callogénèse, au centre nucléaire COMENA, avec différentes doses pour chaque variété, Ainsi que pour des graines de 6 variétés avec différentes doses, cette étude à été faites pour déterminer les effets de l'irradiation gamma sur : la vitesse de germination, et la capacité de germination, ainsi qu'une étude des paramètres physiologiques, cytogénétique des plantes, (3 variétés ont été irradié avec différentes doses et trois autres variétés ont été mutées par des doses plus fortes), après une culture hydroponique, une étude protéique par SDS PAGE suite à un stress hydrique par le PEG6000 à 15% dans le milieu de culture à été aussi élaboré. Et une étude par les marqueurs moléculaire SSR avec 13 amorces à été réalisé

Des mutations chimiques par l'EMS ont été induites sur 3 variétés de blé dur, visant à étudier des paramètres morphologiques, les composantes du rendement, ainsi qu'une étude des protéines par sds-page à été faite sur la M1 et la M2. Et une étude moléculaire par les ssr avec 12 amorces.

Mots clés : blé dur, mutagénèse, EMS, irradiation gamma, marqueurs moléculaire

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1- Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K., (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15, 63-78.
- 2- Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao T., Iwasaki T., Hosokawa D. & Shinozaki K., (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9, 1859-68.
- 3- Aït El Mekki A., (2006). Les politiques céréalières au Maroc. Les notes d'analyse du CIHEAM. N°. 7, Mars 2006.
- 4- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. (2002). *Molecular Biology of the cell*, 4th edn. New-York
- 5- Ali Benjavad Talebi1, Amin Benjavad Talebi, Behzad Shahrokhifar., (2012), Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Induced Mutagenesis in Malaysian Rice (cv. MR219) for Lethal Dose Determination, *American Journal of Plant Sciences*, 2012, 3, 1661-1665
- 6- Alvaro F., Royo C., Garcia Del Moral L.F., Villegas D.,(2008). "Grain filling and dry matter translocation responses to source-sink modifications in a historical series of durum wheat", *Crop science* 48, pp. 1523-1531.
- 7- Amigues, J., Debaeke, P., Itier, B., Lemaire, G., Seguin, B., Tardieu, F., et al., (2006). Sécheresse et agriculture. Réduire la vulnérabilité de l'agriculture à un risque accru de manque d'eau. Expertise collective scientifique, INRA.
- 8- Anonyme.,(2015).(http://www.tsa-algerie.com/20150825/legere-hausse-de-la-production-de-cereales-en-2015/)
- 9- Anonyme.,www.onicl.org.ma/centrepape.aspx?id=3&cat=srub1&index=76&nod= 1.6
- 10- Araus JL, Bort J, Steduto P, Villegas D, Royo C., (2003): Breeding cereals for Mediterranean conditions: ecophysiological clues for biotechnology application. *Annals of Applied Biology* 142, 129–141
- 11- Araus JL, Slafer GA, Reynolds MP, Royo C., (2002). Plant breeding and drought in C-3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* 89, 925–940.
- 12- Artk C. and Peksen E., (2006). The effects of gamma irradiation on seed yield and some plant characteristics of faba bean (*Vicia faba* L.) in M2 generation. *Ondokuz Mayıs-Universitesi,-Ziraat- Fakultesi-Dergisi*, 21 (1): 95-104.
- 13- Ashburner M., (1990). *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

- 14- **Ashraf H. Fahmy and Osama M. El Shihy., (2005).** Improvement of plant regeneration from long-term callus cultures of two Egyptian wheat cultivars.) Arab J. Biotech., Vol. 8, No. (1) 177-188.
- 15- **Ashraf, M. (2009).** Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Adv.*, 27: 84-93.
- 16- **Ashraf, M. and Foolad, M.R., (2007).** Roles of Glycine Betaine and Proline in Improving Plant Abiotic Stress Resistance, *Environ. Exp. Bot.* **59**: 206–216.
- 17- **Ashraf, M., (2009)** Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Adv.*, 27: 84-93.
- 18- **Ashraf, M., A.A. Cheema, M. Rashid and Z. Qamar. (2003).** Effect of gamma rays on M1 generation in Basmati rice. *Pak. J. Bot.*, 35(5): 791-795.
- 19- **Ashraf, M., A.A. Cheema, M. Rashid and Z. Qamar.,(2003).** Effect of gamma rays on M1 generation in Basmati rice. *Pak. J. Bot.*, 35(5): 791-795.
- 20- **B.S. Ahloowalia., (2001).**Induced mutations – A new paradigm in plant breeding
- 21- **Baker N.R., 1991.** A possible role for photosystem II in environmental perturbations of photosynthesis. *Physiology Plantarum* 81, 563–570.
- 22- **Barbara, G, S. Maria, W. Anna, G. Slawa and G. Magdalena.,(2003).** Changes in the ultra structure of chloroplasts and mitochondria and antioxidant enzyme Activity in *Lycopersicon esculentum* Mill. leaves prayed with acid rain. *Plant Sci.*, 164: 507-516.
- 23- **Barcaccia G., Molinari L., Porfiri O. et Veronesi F., (2002).**Molecular characterization of (*Triticum dicoccum* Schrank) Italian landraces. *Genetic Resources and CropEvolution*, 49(4): 415-426.
- 24- **Barlow E.W.R., (1986).** Water relations of expanding leaves. *Aus J Plant Physiol* 13,45-58.
- 25- **Barrs, H. D., & Kozlowski, T. T. (1968).** Determination of water deficits in plant tissues. *Water Deficits and Plant Growth, Vol. 1*, 235-368.
- 26- **Bettaieb, T., Denden, M., & Mhamdi, M. (2008).** Régénération in vitro et caractérisation physiologique de variants somaclonaux de glaïeul (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) tolérants aux basses températures. *Tropicultura*, 26(1), 10-16.
- 27- **Blum, A. and Pnuel, Y. (1990).** Physiological attributes associated with drought resistance of wheat cultivars in a mediterranean environment. *Aus. J. Agri. Res.*, 41 : 799-810.
- 28- **Blum, A., & Ebercon, A. (1981).** Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Science*, 21(1), 43-47.

- 29- **Bouffler, S.D. Et Al., (2006).** Assessing radiation-associated mutational risk to the germline repetitive DNA sequences as mutational targets and biomarkers, *Radiat. Res.* **165** (2006) 249.
- 30- **Bousba R., Djekoun A. et Ykhlef., (2010).** Identification des marqueurs biochimiques et physiologiques de la tolérance à la sécheresse chez le blé dur *Triticum durum* Desf *Actes du 3ème Meeting International 'Aridoculture et Cultures Oasisennes : .Meeting international sur l'aridoculture et les cultures oasiennes : gestion et valorisation des ressources et applications biotechnologiques dans les agrosystèmes arides et saharien. Djerba tunisie. Revue des Régions Arides – Numéro spécial – 24 (2/2010)*
- 31- **Bruggemann E, Handwerger K, Essex C, Storz G. (1996).** Analysis of fast neutron-generated mutants at the *Arabidopsis thaliana* *HY4* locus. *The Plant Journal* **10**,755–760.
- 32- **Bryan, G.J., Collins, A.J., Stephenson, P.,Orry, A. et al., (1997).** Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat. *Theor Appl Genet*, **94**: 557-563.
- 33- **Buchanan, F. C., Adams, L. J., Littlejohn, R. P., Maddox, J. F., & Crawford, A. M. (1994).** Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics*, **22**(2), 397-403.
- 34- **Cecchini E, Mulligan BJ, Covey SN, Milner JJ.(1998).** Characterization of gamma irradiation-induced deletion mutations at a selectable locus in *Arabidopsis*. *Mutation Research* **401**,199–206
- 35- **Cemalettin Yaflar ÇFTÇ, Asli DiVANLI TÜRKAN, Khalid Mahmood KHAWAR, Mehmet ATAK, Sebahattin ÖZCAN., (2006).** Use of Gamma Rays to Induce Mutations in Four Pea(*Pisum sativum* L.) Cultivars, *Turk J Biol* **30** (2006) 29-37
- 36- **Chaise L., Ferla A. J., Honore A. & Moukhli R.,(2005).** L'impact du changement climatique sur l'agriculture en Afrique. Atelier Changement Climatique. ENPC.
- 37- **Chaomei, Z. and M. Yanlin., (1993).** Radiation induced changes in enzymes of wheat during seed germination and seedling growth. *Agriculturae Nucleatae Sinica*, **7**(2): 93-97.
- 38- **Charbaji, T. and I. Nabulsi., (1999).** Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine. *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, **57**: 129-132.
- 39- **Chaudhary M.S. et al., (1973)** Effect of gamma irradiation on yield and quality of guar (*Cyamopsis tetragonoloba* (L.) Taub.), *Ann. Arid Zone* **12**: 19-22.
- 40- **Chaudhuri S., (2002).** A simple and reliable method to detect gamma irradiated lentil (*Lensculinaris Medik*) seeds by germination efficiency and Seedling growth test. *Radiat. Phys. Chem.* **64**:131–136.

Références bibliographiques

- 41- **Chaves, M.M., Flexas, J. and Pinheiro, C. (2009).** Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*, **103**, 551-560.
- 42- **Chiapusio, G., A.M. Sanchez, M.J. Reigosa, L. Gonzalez and F. Pellissier., (1997).** Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process. *J. Chem. Ecol.*, 23: 2445-2453.
- 43- **Claire M.W, Catling D.C, Zahnle K.J (2006).** Biogeochemical modeling of the rise of oxygen. *Geobiology*. 4, 239–269
- 44- **Clarck & Mac-Caig.,(1982).** Excised leaf water relation capability as an indicator of drought resistance of *Triticum* genotypes. *Can.J. Plant Sci.* **62**: 571-576 p.
- 45- **Condon AG., RA. Richards, GJ. Rebetzke, GD. Farquhar., (2004).** Breeding for high water-use efficiency. *J. Exp. Botany*, 55: 2447-2460.
- 46- **Cosgrove D.J., (1986).** Biophysical control of plant cell growth. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37, 377-405.
- 47- **Cosgrove D.J., (2005).** Growth of the cell wall. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6, 850-861.
- 48- **Costa P., Bahrman N., Frigerio J.M., Kremer A., Plomion C., (1998).** Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Molecular Biology*, 38, 587-96
- 49- **Crafts-Brandner SJ, Egli DB.,(1987).** Modification of seed growth in soybean by physical restraint: effect on leaf senescence. *J. Exp. Bot.*, 38: 2043-2049.
- 50- **Critchley C., Russel A.W., (1994).** Photoinhibition of photosynthesis *in vivo*: The role of protein turnover in photosystem II. *Physiologia Plantarum* 92, 188–196.
- 51- **Dakheel, A. J., Radosevich, S. R., & Barbour, M. G. (1993).** Effect of nitrogen and phosphorus on growth and interference between *Bromus tectorum* and *Taeniatherum asperum*. *Weed Research*, 33(5), 415-422.
- 52- **Damania A.B., (1991).** the use of genetic resources in breeding durum wheat. *Plant Breeding abstract*,61 (8), 873-881)
- 53- **De Leonardis A. M. Marone D. Mazzucotelli E. Neffar F. Rizza F. Di Fonzo N. Cattivelli L Et Mastrongelo A. M. (2007).** Durum wheat genes upregulated in the early phases of cold stress are modulated by drought in a developmental and genotype dependent manner. *Plant Science* 172 : 1005-1016.
- 54- **De Vienne D., Leonardi A., Damerval C., Zivy M., (1999).**Genetics of proteome variation for QTL characterization: application to drought-stress responses in maize. *Journal of Experimental Botany*, 50: 303-309

Références bibliographiques

- 55- Debaeke, P., Cabelguenne, M., Casals, M. L., & Puech, J. (1996).** Élaboration du rendement du blé d'hiver en conditions de déficit hydrique. II. Mise au point et test d'un modèle de simulation de la culture de blé d'hiver en conditions d'alimentation hydrique et azotée variées: Epiéphase-Blé. *Agronomie*, 16(1), 25-46.
- 56- Demmig-Adams B., Adams III W.W., (1992).** Photoprotection and other responses of plants to high light stress. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43, 599–626.
- 57- Dhole, V.J., J.J. Maheshwari and S. Patil.,(2003).** Studies on mutations induced by EMS in soybean(*Glycine max* (L.) Merrill). *Agric. Sci. Digest.*, 23(3): 226-228.
- 58- Dicko M. H, (2006)** Travaux pratique biochimie structurale et enzymologie. Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles. Université de Ouagadougou
- 59- Dille, J.E. and N. King., (1983).** Changes in mitotic indices in roots of secale exposed to di-methyl sulfoxide (DMJO). *Cytologia*, 48: 659-662.
- 60- Dille, J.E., N. King and M. Brigh., (1986).** Morphological and cytogenetic effect of isotox 25 seed treater (F) (Lindane and Captan) on roots and chromosomes 1 2 of rye (*S. cereale* L.). *Cytologia*, 51: 489-492.
- 61- Doyle, J.J.; Doyle J.L. (1990).** Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13-15.
- 62- Ehdaie B., Alloush G., Waines J.G.,(2008).** “Genotypic variation in linear rate of grain growth and contribution of stem reserves to grain yield in wheat”, *Field crop research* 106, pp.34-43.
- 63- El-Hamdouni, E.M., A. Lamarati and A. Badoc., (2000).** Micropropagation des cultivars Chandler et Tudla de fraisier. *Bull. Soc. Pharm.*, 139: 71-90.
- 64- FAO., (1997).** Perspectives de l'Alimentation - No. 7/8/9, Rome.
- 65- FAO., (2011),** Malgré les bonnes perspectives de production pour 2011, L'Algérie continue à importer du blé
- 66- FAO.,(2015)**<http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/fr/>
- 67- Feuk, D., Carson, A. R. et Scherer, S. W.,(2006).** Structural variation in the human genome. *Nat rev Genetics*, 7(2):8597
- 68- François Tardieu, Pierre Cruiziat ,Jean-Louis Durand, Eugène Triboï, Michel Zivy ,** Perception de la sécheresse par la plante. Conséquences sur la productivité et sur la qualité des produits récoltés, esco (sechresse et agriculture).

- 69- Frédéric Hénin.,(2015) rédacteur en chef, Production mondiale de blé 2015/2016**
Terre-net Article paru dans Terre-net Média
- 70- Gaufichon L., Reisdorf-Cren M., Rothstein S. J., Chardon F., Suzuki A. (2010).**
Biological functions of asparagine synthetase in plants. *Plant Sci.* 179, 141–15310.1016
- 71- Gill B.S, B. Friebe., (2002).**Cytogenetics, phylogeny and evolution of cultivated wheats. *Fao. Euphytica*, 78: 1-5.
- 72- Granier C., Inzé D., Tardieu F., (2000).**Spatial distribution cell division rate can be deduced from that of P34cdc2 kinase activity in maize leaves grown in contrasting conditions of temperature and water status. *Plant Physiology* 124, 1393-1402.
- 73- Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner C, Johnson JE, Odden AR, et al.,(2003).** Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics.* 164:731-740.
- 74- Guimaraes, E. P. (2007).**Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. *Food & Agriculture Org.*.
- 75- Guimaraes. E.C., Ruane J., Scherf B.D., Sonnino A., Dargie J.D.(eds.), (2007).**Marker-assisted selection. Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish, *FAO, Rome*).
- 76- Gunckel J.E. and Sparrow A.H., (1961).** Ionizing radiations: biochemical, physiological aspects of their effects on plants. *Encyclopedia of plant Physiology*, XVI: 555-617.
- 77- Gustafsson A., A. Hagberg G. Persson and K. Wikland.,(1971).** Induced mutation and barley improvement. *Theoretical Appl. Gene.* 41: 239-48.
- 78- Hajheidari M., Abdollahian-Noghabi M., Askari H., Heidari M., Sadeghian S.Y., Ober E.S. & Hosseini Salekdeh G., (2005).** Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 5, 950-60
- 79- Haughn G and Somerville CR.,(1987).** Selection for herbicide resistance at the whole-plant level, pp.98-107 in *Applications of Biotechnology to Agricultural Chemistry*, edited by H.M. Lebaron, R.O. Mumma, R.C. Honeycutt and J.H. Duesing. American Chemical Society, Easton, PA.
- 80- Haut Commissariat au Plan.** Rapport de Synthèse. Enquête Nationale de la consommation et des dépenses des ménages 2000/2001. Direction de la Statistique. <http://www.hcp.ma/pubData/ConsommationDepensesMenages/rapportsSynthese/2000-2001.pdf>

- 81- Hayek, T., M. Ben Salem and E. Zid.,(2000).**Mecanisme ou strategie de resistance la secheresse : Cas du ble, de l'orge et du triticale. *Options Mediterr.*, 40: 287-290
- 82- Henikoff, S., Furuyama, T., & Ahmad, K. (2004).** Histone variants, nucleosome assembly and epigenetic inheritance. *Trends in Genetics*, 20(7), 320-326.
- 83- IAEA, VIENNA., (2001).** *In vitro* techniques for selection of radiation induced mutations adapted to adverse environmental conditions. IAEA-TECDOC-1227 ISSN 1011–4289
- 84- Imtyaz Ahmed Khan, Muhammad Umar Dahot, Nighat Seema, Shafqat Yasmin, Sajida bibi, Saboohi Raza, and Abdulah., (2009).** Genetic variability in sugrucane plantlets developed through *in vitro* mutagenesis; *Pak. J. Bot.*, 41(1): 153-166.
- 85- INRA - CNRS – Université Evry – Genoscope-CNS – Génoplande – Genopole., (2005).** Blé tendre ou blé dur : une histoire de chromosomes. COMMUNIQUE DE PRESSE.
- 86- Irfaq, M. and K. Nawab.,(2001).** Effects of gamma irradiation on some morphological characteristics of three wheat cultivars. *Int. J. Biol. Sci.*, 1(10): 935-937
- 87- J A de Ronde, M Spreeth, N Mayaba, W J van Rensburg & N Matole., (2009).** Evaluation and Characterization of Mutant Cowpea Plants for Enhanced Abiotic Stress Tolerance, Induced Plant Mutations in the Genomics Era. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009,141-144
- 88- J. A. de Ronde, W. A. Cress, G. H. J. Krüger, R. J. Strasser, and J. van Staden., (2004).** Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress, *Journal of Plant Physiology*, vol. 161, no. 11, pp. 1211–1224.
- 89- Jasso D. De Rodriguez, Romero-Garcia, J. Rodriguez Garcia R et Sanchez J.L., (2002).**Characterisation of proteins from sunflower leaves and seeds:Relationship of biomass and seed yield. *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA.
- 90- Javed M.A., A. Khatri I.A. Khan, M. Ahmad, M.A. Siddiqui and A.G. Arain.,(2000).** Utilization of gamma irradiation for the genetics improvement of oriental mustard (*Brassica juncea* Coss.). *Pak. J. Bot.* 32: 77-83.
- 91- Jawardena S.D.L. and Peiris R., (1988).** Food crop breeding in Srilanks-Archivements and challenges. *Biol. News*, 2:22-34.
- 92- Jones M.M, Rawson H.M., (1979).** Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency, and osmotic potential in sorghum. *Physiologia Plantarum* 45, 103–111.

- 93- Kashi, Y. and King, D. G. (2006).** Simple sequence repeats as advantageous mutators in evolution. *Trends Genet*, 22: 253-259.
- 94- Kawaguchi R., Girke T., Bray E A and Bailey-Serres J., (2004).** Differential mRNA translation contributes to gene regulation under non-stress and dehydration stress conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 38: 823-839.
- 95- Kawasaki S., Borchert C., Deyholos M., Wang H., Brazille S., Kawai K., Galbraith D., Bohnert H.J., (2001).** Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell*, 13, 889-905
- 96- Khan IA (1985)** Studies on hydrazine hydrate (HZ) and gamma ray induced mutations affecting quantitative characters in mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.). *Genetica Iberica* 37: 47-57.
- 97- Kim, J.H., M.H. Baek, B.Y. Chung, S.G. Wi and J.S. Kim., (2004).** Alterations in the photosynthetic pigments and antioxidant machineries of red pepper (*Capsicum annuum* L.) seedlings from gamma-irradiated seeds. *Journal of Plant Biotechnology*, 47(2): 314-321.
- 98- Kiong Anna Ling Pick, Alvina Grace Lai, Sobri Hussein and Abdul Rahim Harun., (2008).** Physiological Responses of *Orthosiphon stamineus* Plantles to Gamma Irradiation, *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, C(C): CC-CC, 2008 pp3.
- 99- Klarizze, A.M.P., (2005).** Mathematical analysis of root growth in gamma-irradiated cashew (*Anacardium occidentale* L.) and mangosteen (*Garcinia mangastama* L.) using fractals. *Nature Sci.*, 3: 59-64.
- 100- Konzak, C.F. et al., (1965).**Supp. *Rod, Bot.*, 5: 49-80.
- 101- Konzak, C.F., I.M. Wickham and M.J. Dekock. (1972).** Advances in methods of mutagen treatment. 95-119. *Induced Mutations and Plant Improvement*, IAEA, Vienna
- 102- Korzun, V. (2002).** Use of molecular markers in cereal breeding. *Cellular and molecular biology letters*, 7(2B), 811-820.
- 103- Kovács E1, Keresztes A., (2002).**Effect of gamma and UV-B/C radiation on plant cells. *Micron*. 2002;33(2):199-210
- 104- Kovalchuk, O., Kovalchuk, I., Arkhipov, A., Hohn, B. Dubrova, Y.E., (2003).** Extremely complex pattern of microsatellite mutation in the germline of wheat exposed to the post-Chernobyl radioactive contamination, *Mutation Res.* 525 (2003) 93.
- 105- Kovalchuk, O., Y. E. Dubrova, A. Arkhipov, B. Hohn, And I. Kovalchuk. (2000).** Wheat mutation rate after Chernobyl. *Nature* 407:583–584.

- 106- L. Comai and S. Henikoff, (2006)** “Tilling: Practical Single- Nucleotide Mutation Discovery,” *The Plant Journal*, Vol. 45, No. 4, pp. 684-694.
- 107- Laure Gaufichon , Jean-Louis Prioul, Bernard Bachelier.,(2010).**Quelles sont les perspectives d’amélioration génétique de plantes cultivées tolérantes à la sécheresse ?
- 108- Lightner J, Caspar T.,(1998).** In J Martinez-Zapater, J Salinas, eds, *Methods on Molecular Biology*, Vol 82. Humana Press, Totowa, NJ, pp 91-104.
- 109- Litt, M. & Luty, J. A. A., (1989).** hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* **44**,397–401.
- 110- M. M. Chaves, J. Flexas and C. Pinheir., (2009).**Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell, *Annals of Botany* 103: 551 – 560.
- 111- M. Melki and Th. Dahmani., (2009).**Gamma Irradiation Effects on Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) under Various Conditions.*Pakistan Journal of Biological Sciences*, **12**: 1531-1534
- 112- M. Ousseynou TALL., (2000).** utilisation des techniques d’induction de mutations en amelioration des plantes. MEMOIRE DE FIN D’ETUDE.
- 113- Manifesto, M.M., Schlatter, A.R., Hopp, H.E., Soares, E.Y. and Dubcovsky, J., (2001).** Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Sci*, 41: 682-690.
- 114- Manifesto, M.M., Schlatter, A.R., Hopp, H.E., Soares, E.Y. and Dubcovsky, J . (2001).** Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Sci*, 41: 682-690.
- 115- Martre P., Morillon R., Barrieu F., Gretchen B.N., Park S.N., Maarten J.C., (2002).** Plasma membrane aquaporin play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* 130, 2101-2110.
- 116- Marwood, C.A. and B.M. Greenberg., (1996).** Effect of supplementary gamma irradiation on chlorophyll synthesis and accumulation of photosystems during chloroplast development in *Spirodela oligorrhiza*. *Photochemistry*, 64(4): 664-670.
- 117- Maury P., Berger M., Mojayad F., Planchon C., (2000).** Leaf water characteristics and drought acclimation in sunflower genotypes. *Plant and Soil* 223, 153-160
- 118- Melki, M. and D. Sallami., (2008).** Studies the effects of low dose of gamma rays on the behaviour of chickpea under various conditions. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11: 2326-2330.

Références bibliographiques

- 119- Melki, M. and D. Sallami., (2008).** Studies the effects of low dose of gamma rays on the behaviour of chickpea under various conditions. *Pak. J. Biol. Sci.*, 11: 2326-2330.
- 120- Meunier E., (2005).** Des plantes mutantes dans nos assiettes. *Inf'OGM*, **67**, Septembre 2005, <http://www.infogm.org/spip.php?article2406>, (10/05/2010).
- 121- Mojayad F., (1993).** Adaptation à la sécheresse, photosynthèse et photoinhibition chez le tournesol(*Helianthus annuus* L.). PhD Thesis. Institut National Polytechnique, Toulouse, France, 97p.
- 122- Mokobia C E and O Anomohanran.,(2005)** *J. Radiol. Prot.* 25 181, The effect of gamma irradiation on the germination and growth of certain Nigerian agricultural crops.
- 123- Molas, J. (2002).** Changes of chloroplast ultra structure and total chlorophyll Concentration in cabbage leaves caused by excess of organic Ni (II) complexes. *Environ. Exp. Bot.*, 47: 115-126.
- 124- Mongi Melki, th dahmani., (2009).**Gamma Irradiation Effects on Durum Wheat (Triticum durum Desf.)under Various Conditions, *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12 (23): 1531-1534
- 125- Morgan J.M., (1984).** Osmoregulation and water stress in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35, 299-319.
- 126- Morizet J., Merrien A., (1990).** Principaux traits du comportement hydrique du tournesol. In *Le tournesol et l'eau* (eds. R. Blanchet & A. Merrien), pp.7–21. Cetiom Pub., Paris.
- 127- Motoaki Seki,Mari Narusaka,Hiroshi Abe,Mie Kasuga,Kazuko Yamaguchi-Shinozaki,Piero Carninci,Yoshihide Hayashizaki,and Kazuo Shinozaki., (2001).**Monitoring the Expression Pattern of 1300 Arabidopsis Genes under Drought and Cold Stresses by Using a Full-Length cDNA Microarray.*The Plant Cell*, Vol. 13, 61–72.
- 128- Mouellef Adra.,(2010).** Caractères physiologiques et biochimiques de tolérance du blé dur (Triticum durum Desf.)au stress hydrique. Mémoire de magistère, université Mentouri
- 129- Moullet, O., Fossati, D., Mascher, F., Schori, A., & Guadagnuolo, R. (2008).** Les marqueurs moléculaires comme outils dans la sélection des céréales.*Revue suisse d'agriculture*, 40(3), 133-138.
- 130- Mourad Allal.,(2015).**http://www.leconews.com/fr/actualites/nationale/commerce/1-algerie-va-importer-4-5-millions-quintaux-de-ble-01-06-2015-174543_292.php**
- 131- Moussa, R.H., (2006).** Gamma irradiation regulation of nitrate level in rocket (*Eruca vesicaria* subsp. *sativa*) plants. *Journal of New Seeds*, 8:91-101.

- 132- Nichterlain, K., H. Bohlman, S. Niclen and M. Maluszynski.,(2000).** Achievements and trends of using induced mutations in crop improvement. In: *DAEBRNS Symposium on the use of Nuclear and Molecular Techniques in Crop Improvement*. 2000. Mumbai, pp. 27-35.
- 133- Nouri L., Ykhlef N. & Djekoun A.,(2002).** Adjustment osmotique et comportement hydrique chez certaines variétés de blé dur : relation avec la tolérance à la sécheresse. Actes de séminaire' IIIème journées Scientifiques sur le blé'.(éd). Univ. *Mentouri*. Constantine.
- 134- Ogawa A.and A. Yamauchi., (2006).** “Root Osmotic Adjustment under Osmotic Stress in Maize Seedlings. 2. Mode of Accumulation of Several Solutes for Osmotic Adustment in the Root,” *Plant Production Sciences*, Vol. **9** (1): 39-46.
- 135- Passioura J.B., (1994).** The yield of crops in relation to drought. In: *Physiology and Determination of Crop Yield*, Boote KJ et al. (Ed). Crop Science Society of America. Madison WI, pp. 343-359
- 136- Petersen, R., (1985).** Completely Randomized Design. In: *Statistics and Experimental Design*, Sekular, R. and R. Blake (Eds.). ICARDA, New York, pp: 20-27.
- 137- Philippe Grieu, Pierre Maury, Philippe Debaeke, Ahmad Sarrafi., (2008).** Améliorer la tolérance à la sécheresse du tournesol : apports de l'écophysiologie et de la génétique. *Innovations Agronomiques* (2008) 2, 37-51, fondation de l'agriculture et la ruralité dans le monde.
- 138- Pirzad . A, Shakiba M. R, Salmasi. S Z, S A Mohammadi, R Darvishzadeh1 and A Samadi, (2011).** Effect of water stress on leaf relative water content, chlorophyll, proline and soluble carbohydrates in *Matricaria chamomilla* L. *Journal of Medicinal Plants Research* . **5**(12) : 2483-2488.
- 139- Plaschke, J., Ganal, M.W. and Röder, M.S. (1995).** Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet*, 91:1001–1007.
- 140- Potdukhe NR, Wanjari SS & Raut SK, (1994)** Gamma rays induced variability in durum wheat. *Agricultural Science Digest* 14: 121-125.
- 141- Qiao Y., Zhang H., Dong B., Shi C., Li Y., Zhai H.,(2010).** “Effects of elevated CO2 concentration on growth and water use efficiency of winter wheat under two soil water regimes”, *Agricultural Water Management* 97, pp. 1742-1748.
- 142- Quaggiotti, S., A.R. Trentin, F.D. Ecchia and R. Ghisi.,(2004).** Response of maize (*Zea mays* L.) nitrate reductase to UV-B radiation. *Plant Sci.*, 167: 107-116.
- 143- R. Soner Silme, M. Ilhan Çağırğan, (2007).** TILLING (Targetting Induced Local Lesions In Genomes) Technology for Plant Functional Genomics, *Journal of Applied Biological Sciences* 1 (1): 77-80, 2007

Références bibliographiques

- 144- Rabbani M.A., Maruyama K., Abe H., Khan M.A., Katsura K., Ito Y., Yoshiwara K., Seki M., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K., (2003).** Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. *Plant Physiol* 133, 1755-67.
- 145- Ramanjulu S., Bartels D., (2002).** Drought and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell and Environment* 25, 141-151
- 146- Rehman A., M.L. Das M.A.R. Howlidar and M.A. Mansur.,(1987).** Promising mutants in *Brassica campestris*. *Mut. Breed. Newsletter*. 29: 14-15.
- 147- Rey P., Pruvot G., Becuwe N., Eymery F., Rumeau D., Peltier G., (1998).** A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant Journal*, 13, 97-107
- 148- Riccardi F., Gazeau P., de Vienne D., Zivy M., (1998).** Protein changes in response to progressive water deficit in maize: quantitative variation and polypeptide identification. *Plant Physiology*, 117, 1253-1263
- 149- Riccardi F., Gazeau P., Jacquemot M.P., Vincent D., Zivy M., (2004).** Deciphering genetic variations of proteome responses to water deficit in maize leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 1003-11
- 150- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. & Mittler R., (2004).** When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134, 1683-96.
- 151- Röder, M. S., Plaschke, J., König, S. U., Börner, A., Sorrells, M. E., Tanksley, S. D., & Ganai, M. W. (1995).** Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics MGG*, 246(3), 327-333.
- 152- Röder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A. et al., (1995).** Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mole GenGenom*, 246: 327-333.
- 153- Rupinder S and Kole CR. (2005).** Effect of mutagenic treatment with EMS on germination and some seedling parameters in mungbean. *Crop Res.* 30 (2): 236-240.
- 154- S. Mohan Jain., (2010).** Mutagenesis in crop improvement under the climate change. *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 15, No.2, Supplement 2010.
- 155- S.Mohan Jain., (1998),** Induction of somaclonal variation and mutation in developing new improved cultivars. *MIIT PUNE J*, pp 23-31

- 156- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B., Bennett J., (2002).**A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. *Field Crops Research*, 76, 199-219
- 157- Sanchez-Ballesta, MT., Rodrigo, MJ., Lafuente, MT., Granell, A., & Zacarias, L. (2004).** Dehydrin from Citrus, which confers in vitro dehydration and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *J. Agric. Food Chem.* 52, 1950–1957.
- 158- Schlötterer, C., & Tautz, D. (1992).** Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic acids research*, 20(2), 211-215.
- 159- Scossiroli RE (1964)** Wheat mutagenesis in quantitative traits. In: *Proceedings of International Wheat Genetics Symposium 2nd, Lund*, pp. 85-101.
- 160- Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y., Shinozaki K.,(2001).**Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 13, 61-72
- 161- Seki M., Narusaka M., Ishida J., Nanjo T., Fujita M., et al., (2002).** Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell*, 13, 61-72.
- 162- Shamsi IH, Jilani G, Marwat KB., (2006).** Response of poaceous weeds in wheat to post-emergence herbicides. *Caspian J Env Sci* 4: 9-16.
- 163- Shao H B., Liang Z S., Shao MA., (2005).** LEA proteins in higher plants: Structure, function, gene expression and regulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 45:131–135.
- 164- Shao H B., Liang Z S.,Shao M., (2006).** Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 47:132–139.
- 165- Sharma D.K. and Rana D.S., (2007).** Response of castor (*Ricinus communis*) genotypes to low doses of gamma irradiation. *Indian J. Agric. Sci.*, 77 (7): 467-469. Song H.S.
- 166- Sharp R.E., (2002).** Interaction with ethylene: changing views on the role of abscisic acid in root and shoot growth responses to water stress. *Plant Cell and Environment* 25, 211-222.

- 167- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., (2000).** Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3, 217-23
- 168- Shirley BW, Hanley S, Goodman HM. (1992).** Effects of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations. *The Plant Cell*, 4, 333–347.
- 169- Skriver K., Olsen F.L., Rogers J.C., Mundy J., (1991).** Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88, 7266-70
- 170- Strid, A., W.S. Chow and J.M. Anderson., (1990).** Effects of supplementary gamma irradiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochemistry*, 1020(1): 260-268
- 171- Syed Sarfraz Hussain.,(2006).** Molecular breeding for abiotic stress tolerance: drought perspective. *Proc. Pakistan Acad. Sci.* 43(3):189-210.
- 172- Tambussi, E. A., Bort, J., & Araus, J. L. (2007).** Water use efficiency in C3 cereals under Mediterranean conditions: a review of physiological aspects. *Annals of Applied Biology*, 150(3), 307-321.
- 173- Tardieu F., Cruiziat P., Durand J.L., Triboï E. Zivy M., (2007).** ESCo « sécheresse et agriculture » p 242–257.
- 174- Tautz, D., Trick, M. & Dover, G. A.,(1986).** Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature* 322, 652–656
- 175- Thapa, C.B.,(2004).** Effect of acute exposure of gamma rays on seed germination and seedling growth of *Pinus kesiya* Gord and *P. wallichiana* A.B. Jacks. *Our Nature*, 2: 13-17.
- 176- Turner N.C., (1986).** Adaptation to water deficits: A changing perspective. *Aust. J. Plant Physiol.* 13, 175–190.
- 177- Turner N.C., Wright G.C., Siddique K.H.M., (2001).** Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Advances in Agronomy* 71, 193-231.
- 178- Udupa, S. M., And M. Baum. (2001).** High mutation rate and mutational bias at (TAA)_n microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Mol. Genet. Genomics* 265:1097– 1103.
- 179- Uno Y., Furihata T., Abe H., Yoshida R., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., (2000).** Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 97, 11632-7

- 180- Vincent D., Lapierre C., Pollet B., Cornic G., Negroni L., Zivy M., (2005).** Water deficits affect caffeate O-methyltransferase, lignification, and related enzymes in maize leaves. A proteomic investigation. *Plant Physiology*, 137, 949-60
- 181- Wada H, Koshiha T, Matsui T, Satô M., (1998).**Involvement of peroxidase in differential sensitivity to γ -radiation in seedlings of two *Nicotiana* species. *Plant Sci.*, 132: 109-119.
- 182- Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1994).** Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 42(8), 1666-1673.
- 183- Wattoo J. I., K. Aslam, S. M. Shah, G. Shabir, M. Sabar, S. A. Naveed, R. Waheed, Samiullah, Q. H. Muqaddasi and M. Arif, (2012).** Ethyle methane sulphonate (EMS) induced mutagenic attempts to create genetic variability in Basmati rice. *Journal of Plant Breeding and Crop Science* Vol. 4(7), pp. 101-105,
- 184- Wi S.G, Byung Yeoup Chung', Jae-Sung Kim^a, Jin-Hong Kim, Myung-Hwa Baek, Ju-Woon Lee, Yoon Soo Kim.,(2007).**Effects of gamma irradiation on morphological changes and biological responses in plants, *Micron* Volume 38, Issue 6, August 2007, Pages 553–564.
- 185- Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K., (1994).** A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell*, 6, 251-64
- 186- Yasemin Eroglu, Halil Erhan Eroglu and Ali Irfan Ilbas., (2007).** Gamma Ray Reduces Mitotic Index in Embryonic Roots of *Hordeum vulgare* L. *Advances in Biological Research* 1 (1-2): 26-28.
- 187- Ykhlef N., Djekoun A., Kellou K.,(2007).**regeneration d'embryons issus de croisement interspecificque ble dur (*triticum durum* desf.) \times *aegilops geniculata* roth.: effet des regulateurs de croissance. *Sciences & Technologie C – N°25*, pp.44-52.
- 188- Ykhlef Nadia, Djekoun Abdelhamid.,(2000).**Adaptation photosyn thétique et résistance à la sécheresse chez l e bl é dur (*Triticum turgidum* L. var. durum) : Analyse de la variabi ité génotypique. In : Royo C. (ed.), Nachit M. (ed.), D i Fonzo N. (ed.), Arau s J.L. (ed.). *Durum wheat improvement in the Mediterranean region: New challenges* . Zaragoza : CIHEAM, 2000. p. 327 -330 (Option s Méditerranéennes : Série A.Séminaires Méditerranéens; n . 40)

- 189- Ykhlef Nadia., (2001).** Photosynthèse, activité photochimique et tolérance au déficit hydrique chez le blé dur (*Triticum durum* Desf.).Thèse de doctorat d'Etat, Université Mentouri Constantine, 146 p.
- 190- Yoh Sakuma, Kyonoshin Maruyama, Yuriko Osakabe, Feng Qin, Motoaki Seki, Kazuo Shinozaki, and Kazuko Yamaguchi-Shinozaki.,(2006).** Functional Analysis of an *Arabidopsis* Transcription Factor, DREB2A, Involved in Drought-Responsive Gene Expression. *The Plant Cell*, Vol. 18, 1292–1309.
- 191- Yu L.X., Setter T.L., (2003).** Comparative transcriptional profiling of placenta and endosperm in developing maize kernels in response to water deficit. *Plant Physiology*, 131, 568-82
- 192- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., & Horvitz, H. R. (1993).** The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 β -converting enzyme. *Cell*, 75(4), 641-652.
- 193- Zahid Hussain Shaha, Muhammad Munira, Abdul Mujeeb Kazib, Tahir Mujtabaa and Zaheer Ahmedc., (2007).** Molecular Markers Based Identification of Diversity for Drought Tolerance in Bread Wheat Varieties and Synthetic Hexaploids. *Curr. Issues Mol. Biol.* 11: 101-110.
- 194- Zaka, M.A., N. Hussain, G. Sarwar, M.R. Malik, I. Ahmad, and K.H. Gill., (2004).** Fertility status of Sargodha district soils. *Pakistan. J. Sci. Res.* 56(1-2):69-75
- 195- Zerihun Tadele, Chikelu MBA, and Bradley J. Till (2010).** TILLING for Mutations in Model Plants and Crops, Plant Breeding Unit, FAO/IAEA Agricultural and Biotechnology Laboratory p : 307-322
- 196- Zhang, X.Y., Li, C.W., Wang, L.F., Wang, H.M. et al . (2002).** An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. *Theor Appl Genet*, 106: 112-117. PMID: 12582878.
- 197- Zhang, X.Y., Li, C.W., Wang, L.F., Wang, H.M. et al., (2002).** An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I. Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. *Theor Appl Genet*, 106: 112-117. PMID:12582878.
- 198- ZhuZ. , Z. M. Pei and H. L. Zheng.,(2011).** Effect of Salinity on Osmotic Adjustment Characteristics of *Kandelia candel* *Russian Journal of Plant Physiology*, **58**(2): 226–232

Références bibliographiques

199- Zukas A.A. & Breksa A.P. (2005). Extraction methods for analysis of Citrus leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 1078: 201 - 205 p

Annexes

ANNEXE 1

Solution d'extraction des protéines totales

Solution de précipitation (placer au froid) (A)

TCA (100%)	10 ml (10g TCA/100ml acetone)	→ 10%
β-mercaptoéthanol	70 ml	→ 0.07%
Acetone qsp	100ml	

Solution de rinçage (placer au froid) (B)

β -mercaptoéthanol	70 ml	→ 0.07%
Acétone qsp	100ml	

Laemmli (Tampon de dénaturation)

Tris-HCL 6,8	12.5 ml
SDS	2 g
Glycérol	10 ml
β -mércaptoéthanol	2 ml
Bleu de Bromophénol	0.0025 g
Eau qsp	100 ml

Solution de 20 ml de SDS à 10%:

Peser 2 g de SDS.

Ajouter 18 ml d'eau distillée et chauffer à 68° C.

Ajuster le pH à 7.2 avec du HCl.

Compléter le volume à 20 ml.

Stocker à température ambiante.

ANNEXE 2

Solutions et tampons utilisés pour SDS-PAGE**Solution mère d'acrylamide à 35%** (à préparer avec gants et masque)

Acrylamide	35 g
Eau distillée qsp	100 ml

Solution mère de bis acrylamide à 2% (à préparer avec gants et masque)

Bis acrylamide	2 g
Eau distillée qsp	100 ml

Solution stock de SDS à 10%

Sodium Dodécyl Sulfate	10 g
Eau distillée qsp	100 ml

Solution d'APS (Ammonium Persulfate) à 1% : à préparer extemporanément

APS	0.1 g
Eau distillée qsp	10 ml

Tampon Tris-HCl pH 8.8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	60.57 g
Eau distillée	400 ml
Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant	8 à 10 ml
Eau distillée qsp	500 ml

Tampon Tris HCl pH 6.8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	30.285 g
Eau distillée	200 ml
Ajuster à pH 6.8 avec du HCl fumant	19.5 ml
Eau distillée qsp	250 ml

Tampon d'électrophorèse

Glycine	70.55 g
Tris (hydroxyméthyl amino Ethan)	15 g
SDS	5 g
Eau distillée qsp	5000 ml

Solution de coloration (pour deux gels)

TCA 60% distillée)	100 ml (60gTCA/100ml Eau
Solution mère de Bleu de Coomassie R-250	25 ml
Eau distillée qsp	500 ml

Solution mère de bleu de Coomassie R250

Bleu de Coomassie R250	10 g
Ethanol 95° qsp	1000 ml

L'éthanol doit être mis en agitation dans l'éprouvette, avec un barreau aimanté. Le bleu de Coomassie est ensuite ajouté (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant). Laisser en agitation au moins deux heures, puis filtrer la solution.

Composition du Kit (FPM)

Protéine	Poids moléculaire (KDa)
α -Lactalbumine	14,4
Inhibiteur de la trypsine	20,1
Carbonique anhydrase	30
Ovalbumine	45
Albumine sérique bovine	66
Phosphorylase b	97

ANNEXE 3

Préparation des gels

(Quantités pour une cuve de deux gels)

Gel de séparation (running gel) T= 15% et C = 0.027%

Acrylamide à 35%	33.37 ml
Bis acrylamide à 2%	16.20 ml
Eau distillée	8.83 ml
Tris – HCl pH 8.8	18.8 ml
SDS à 10%	0.8 ml
APS à 1%	2.5 ml
Temed	50 µl

Gel de concentration (stacking gel) T= 4%

Acrylamide à 35%	2 ml
Bis acrylamide à 2%	0.6 ml
Eau distillée	20.4 ml
Tris – HCl pH 6.8	3.4ml
SDS à 10%	0.28 ml
APS à 1%	1.4ml
Temed	30 µl

ANNEXE 4

Protocole d'extraction d'AND au CTAB

- Préchauffer le tampon CTAB 2X additionné de Bmercaptoethanol dans un bain marie à 65C°.
- Broyer 15 mg de matériel dans un mortier dans l'azote liquide
- A l'aide de spatule transférer le broyat dans un tube a vis
- Ajouter 900ul de tampon CTAB2X (annexe) additionné de Bmercaptoethanol à 65C°
- Homogénéiser au vortex
- Incuber 60min dans un bain à 65C° avec agitation
- Centrifuger 15min à 10000rpm à 4C°
- Récupérer le surnagent (800ul) dans un nouveau tube de 2ml(stocker le culot à 4C° à l'abri de la lumière).
- Ajouter 800ul (1vol) chloroforme/alcool isoamylique(24 :1)
- Agiter pendant 45min à vitesse lente (100 à 150rpm) sur une table d'agitation
- Centrifuger 15min à 10000rpm à 4C°
- Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube.
- Centrifuger 15min à 10000rpm à 4C°
- Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube. Evitez de prendre la couche blanche.
- Ajouter 3 à 5 ul de RnaseA(10ng/ul) agiter par inversion et incuber 30min à 37C°
- Ajouter 540ul (2/3v) d'isopropanol froid (-20C°)
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche
- Laisser précipiter a -20C° pendant 5 à 10 min
- Centrifuger 10 min à 1000rpm à 4C°
- Eliminer le surnagent très délicatement (à l'aide de micropipette)
- Ajouter 500ul de solution de lavage 1
- Incuber pendant 15min à 10000rpm à 4C°
- Eliminer le surnagent et ajouter 500 ul de solution de lavage 2
- Ne pas incuber plus de 5min
- Centrifuger 5 min à 10000rpm à 4C°
- Eliminer le surnagent et sécher l'adn à l'air libre pendant 10 à 20min
- Suspendre le culot dans 100 ul de TE (tampon d'elution) 0.1X
- Stocker une nuit à 4C° avant dosage

Préparation des solutions du gel d'acrylamide**Solution NAOH**

NAOH 0.2M pour 100ml → 0.80g

1l 8g

2l 16g

Stocker a température ambiante

Solution ethanol-acide acétique 0.5%

100ml ethanol

0.5ml acide acétique glacial

Stocker a température ambiante

Solution d'acrylamide 6%

Pour 99ml

Urée 48g

TBE 10ml

Acrylamide (19 :1) 40% 15ml

H₂O up QSP 99ml


Solution APS 10%

1g amonium persulfate dans 10ml H₂O

Annexe 5

GrainGenes rapport des marqueurs microsatellites


➤ Rapport du marqueur wmc134

Probe	WMC134
Locus	Xwmc134 Xwmc134-1B
Reference	 Somers DJ and Isaac P (2004) SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium.
Remarks	Wheat Microsatellite Consortium Project 1, Plate reference 7c12 Donor: Blake, Montana Microsatellite : [TG]18. Tom Primer 1 : CCAAG CTGTC TGA CT GCCAT (55%). Tom Primer 2 : TATAG ACCTC TGGCT CACGG (55%). TOM's EXPECTED PCR PRODUCT: 135 nts(GT)17 161 to 194.
Type	PCR SSR
PCR primers	Forward ccAAgcTgTcTgAcTgccATAg at 86 length 22 bases, Tm 64 Reverse AgTATAgAccTcTggcTcAcgg at 201 length 22 bases, Tm 61
SSR size	137 bases expected, Chinese Spring
Amplification Conditions	61C anneal, polymorphic product on agarose; 61C anneal, polymorphic on acrylamide (152-174 bases).
Sequence	WMC134
Source	Triticum aestivum
Species	
Data Source	Somers, Daryl J. 2004.06 Isaac, Peter G. 2004.06


➤ Rapport du marqueur BARC8

Probe	BARC8
Locus	Xbarc8-1B Xbarc8 Xbarc8-3D
Remarks	Contains motif : (TTA)15+11 BARC primer pairs are developed by P. Cregan, Q. Song and associates at the USDA-ARS Beltsville Agriculture Research Station. Meiotic map information was developed by J.R. Shi, R. Ward and associates at Michigan State University. Deletion map information was developed by B.Gill, S. Singh and associates at Kansas State University. Funding for this research is provided by USDA-ARS in conjunction with the U.S. Wheat and Barley Scab Initiative.
Type	PCR SSR
PCR primers	5' GCGGGAATCATGCATAGGAAAACAGAA 3' 5' GCGGGGCGAAACATACACATAAAAACA 3'
Amplification Conditions	Annealing temperature = 50
Sequence	BV211576
Source	Triticum aestivum
Species	
Data Source	Ward, Rick

➤ Rapport du marqueur wmc246


Probe [WMC246](#)
Locus [Xwmc246-2A](#)
[Xwmc246](#)
Reference  **Somers DJ and Isaac P** (2004) SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium.
Remarks Wheat Microsatellite Consortium Project 1, Plate reference 5d5.1
Donor: Sharp, Camden
Location from nullisomic/tetrasomic (Daryl Somers, AgCanada, Feb 2001) : 226 bases located on 4A, 288 bases located on 2A
Trimmed to Rsa1 at both ends. Multiple inserts in this clone (3) joined at 467-484 and 760-777 by linkers. Sequence given here is first insert only (thers have separate records). Bases 148-249 match part of 4E2 (complement) - near (NA)n stretch. (CA)15 38 to 67. Primers shown are for first insert, avoids small homology to 4E2. Bases 46 to 67 show homology to 23A1 bases 88 to 109 (complement) (22 in longest run, maxScore = 21). Bases 37 to 67 show homology to 21f4 bases 176 to 206 (31 in longest run, maxScore = 50), duplicate, 5d5.1 has priority.
Type PCR
SSR
PCR primers Forward TAccAgAgTgTATggTTgcAAAgT at 2 length 24 bases, Tm 62
Reverse AAcAcATgATATAgcAAccAaggA at 274 length 24 bases, Tm 61
SSR size 296 bases expected, Chinese Spring
Amplification conditions 61C anneal, polymorphic product on agarose; 61C anneal, polymorphic on acrylamide;
Sequence [WMC246](#)
Source Species [Triticum aestivum](#)
Data Source [Somers, Daryl J.](#) 2004.06
[Isaac, Peter G.](#) 2004.06

➤ Rapport du marqueur wmc322






Probe [WMC322](#)
Locus [Xwmc322-3A](#)
[Xwmc322](#)
[Xwmc322-3B](#)
Reference  **Somers DJ and Isaac P** (2004) SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium.
Remarks Wheat Microsatellite Consortium Project 1, Plate reference 17b7
Donor: Khairallah, Mexico
Trimmed to insert at both ends. (GT)24 40 to 87. Forward primer reduced size to lower Tm.
Type PCR
SSR
PCR primers Forward cgccccAcTATgcTTTg at 12 length 17 bases, Tm 61
Reverse cccAgTccAgcTAGccTcc at 88 length 19 bases, Tm 64
SSR size 95 bases expected, Chinese Spring
Amplification Conditions 61C anneal, product; 61C anneal, polymorphic on acrylamide.
Sequence [WMC322](#)
Source Species [Triticum aestivum](#)
Data Source [Somers, Daryl J.](#) 2004.06
[Isaac, Peter G.](#) 2004.06

➤ Rapport du marqueur wmc24

Probe [WMC24](#)
Locus [Xwmc24-1A](#)


	<u>Xwmc24</u>
Reference	 Somers DJ and Isaac P (2004) SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium.
Remarks	Wheat Microsatellite Consortium Project 1, Plate reference 2b9 Donor: Wang, Utah Location from nullisomic/tetrasomic (Daryl Somers, AgCanada, Feb 2001) : 136-155 bases located on 1A (GT)28 25 to 80.
Type	PCR SSR
PCR primers	Forward gTgAgcAATTTTgATTATAcTg at 4 length 22 bases, Tm 54 Reverse TAcccTgATgcTgTAATATgTg at 134 length 22 bases, Tm 57
SSR size	152 bases expected, Chinese Spring
Amplification Conditions	51C anneal, polymorphic product on agarose; 51C anneal, polymorphic on acrylamide.;
Sequence	<u>WMC24</u>
Source Species	<u>Triticum aestivum</u>
Data Source	<u>Somers, Daryl J.</u> 2004.06 <u>Isaac, Peter G.</u>

➤ Rapport du marqueur wms6


Probe	<u>WMS6</u>
Locus	<u>Xgwm6.1-4B</u> [<i>Show all 12</i>]
Reference	 Varshney RK et al. (2007) A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. Theoretical and Applied Genetics 114:1091.  Fu YB et al. (2007) Microsatellite variation in Avena sterilis oat germplasm Theoretical and Applied Genetics 114:1029-1038.  Roder MS et al. (1998) A microsatellite map of wheat Genetics 149:2007-2023.  Liu Z-W et al. (1996) Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map. Theoretical and Applied Genetics 93:869-876.  Roeder MS et al. (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Molecular and General Genetics 246:327-333.
Remarks	Insert contains repeat (GA) ₄₀ PRIMER SEQUENCE IS AVAILABLE FOR PUBLIC RESEARCH ONLY. REQUESTS FOR COMMERCIAL USE SHOULD BE DIRECTED TO M. ROEDER. Repeat type (GA) _{x40} . Product size 205 bp in Cheyenne. In 369 Avena sterilis accessions there were 3 alleles of size 48-60 bp, PIC = negative.
Type	Genomic PCR SSR
PCR primers	5' CGTATCACCTCCTAGCTAAACTAG 3' 5' AGCCTTATCATGACCCTACCTT 3' CGTATCACCTCCTAGCTAAACTAG AGCCTTATCATGACCCTACCTT
Amplification Conditions	3 min at 94 deg C; 45 cycles with 1 min at 94 deg C, 1 min at 55 deg C, and 2 min at 72 deg C; and a final extension step of 10 min at 72 deg C
Polymorphism	<u>WMS6</u>
Source Species	<u>Triticum aestivum</u>
Source Germplasm	<u>Chinese Spring</u>
Data Source	<u>Roeder, Marion S.</u> 98.09.15 <u>Roeder, Marion S.</u> 94.10.17 <u>Fu, Yong-Bi</u> 2007.04

➤ Rapport du marqueur wms124


Probe	<u>WMS124</u>
Locus	<u>Xgwm124-1B</u> <u>Xgwm124</u>

	Xgwm124-1B.2
	Xgwm124-1B.1
Reference	 Roder MS et al. (1998) A microsatellite map of wheat Genetics 149:2007-2023.
Remarks	Insert contains repeat (CT)27(GT)18imp PRIMER SEQUENCE IS AVAILABLE FOR PUBLIC RESEARCH ONLY. REQUESTS FOR COMMERCIAL USE SHOULD BE DIRECTED TO M. ROEDER.
Type	PCR SSR
PCR primers	5' GCCATGGCTATCACCCAG 3' 5' ACTGTTTCGGTGCAATTTGAG 3'
Amplification Conditions	3 min at 94 deg C; 45 cycles with 1 min at 94 deg C, 1 min at 60 deg C, and 2 min at 72 deg C; and a final extension step of 10 min at 72 deg C
Polymorphism	WMS124
Source Species	Triticum aestivum
Source	Chinese Spring
Germplasm	
Data Source	Roeder, Marion S. 98.09.15

➤ Rapport du marqueur wms497

Probe	WMS497
Locus	Xgwm497.2-1A [Show all 18]
Reference	 Roder MS et al. (1998) A microsatellite map of wheat Genetics 149:2007-2023.
Remarks	Insert contains repeat (GT)29imp PRIMER SEQUENCE IS AVAILABLE FOR PUBLIC RESEARCH ONLY. REQUESTS FOR COMMERCIAL USE SHOULD BE DIRECTED TO M. ROEDER.
Type	PCR SSR
PCR primers	5' GTAGTGAAGACAAGGGCATT 3' 5' CCGAAAGTTGGGTGATATAC 3'
Amplification Conditions	3 min at 94 deg C; 45 cycles with 1 min at 94 deg C, 1 min at 55 deg C, and 2 min at 72 deg C; and a final extension step of 10 min at 72 deg C
Polymorphism	WMS497
Source Species	Triticum aestivum
Source	Chinese Spring
Germplasm	
Data Source	Roeder, Marion S. 98.09.15


➤ Rapport du marqueur wmc177

Probe	WMC177
Locus	Xwmc177-2A Xwmc177 wmc177-2A
Reference	 Somers DJ and Isaac P (2004) SSRs from the Wheat Microsatellite Consortium.
Remarks	Wheat Microsatellite Consortium Project 1, Plate reference 9h4 Donor: Bernard, Clermont-Ferrand Location from nullisomic/tetrasomic (Daryl Somers, AgCanada, Feb 2001) : 190 bases located on 2A Trimmed to insert at 5' end and to RsaI at 3' end. After first 40 bases is similar to 7c7(CA)21 37 to 78, (CGCA)10. Bases 81 to 101 show homology to 17e7 bases 273 to 293 (21 in longest run, maxScore = 21). Bases 37 to 70 show homology to 10h2 bases 68 to 101 (34 in longest run, maxScore = 26).
Type	PCR SSR
PCR primers	Forward AgggcTcTcTTTAATTcTTgcT at 13 length 22 bases, Tm 59 Reverse ggTcTATcgTAAATccAccTgTA at 175 length 22 bases, Tm 57
SSR size	184 bases expected, Chinese Spring
Amplification	51C anneal, product; 51C anneal, polymorphic on acrylamide.;
Conditions	
Sequenc	WMC177

e

Source [Triticum aestivum](#)
Species
Data [Somers, Daryl J.](#) 2004.06
Source [Isaac, Peter G.](#) 2004.06

➤ Rapport du marqueur wms131

Probe [WMS131](#)
Locus [Rf3](#)
 [[Show all 9](#)]
Reference  **Roder MS** et al. (1998) A microsatellite map of wheat **Genetics** 149:2007-2023.
Remarks Insert contains repeat (CT)²²
 PRIMER SEQUENCE IS AVAILABLE FOR PUBLIC RESEARCH ONLY. REQUESTS FOR COMMERCIAL USE SHOULD BE DIRECTED TO M. ROEDER.
Type PCR
 SSR
PCR primers 5' AATCCCCACCGATTCTTCTC 3'
 5' AGTTCGTGGGTCTCTGATGG 3'
Amplification Conditions 3 min at 94 deg C; 45 cycles with 1 min at 94 deg C, 1 min at 60 deg C, and 2 min at 72 deg C; and a final extension step of 10 min at 72 deg C
Polymorphism [WMS131](#)
Source Species [Triticum aestivum](#)
Source [Chinese Spring](#)
Germplasm
Data Source [Roeder, Marion S.](#) 98.09.15

➤ Rapport du marqueur CFB3417

Probe [CFB3417](#)
Locus [Xcfb3417-3B](#)
Synonym Other name [CFT3417](#)
Remarks Motif (GT)⁸
Type Genomic
 PCR
 SSR
PCR primers Forward TTGTTAAGGCGAGACATTGG
 Reverse GATACACAGAGGGCGGAG
 TTGTTAAGGCGAGACATTGG
 GATACACAGAGGGCGGAG
SSR size 299
Amplification Conditions Tm 60
Sequence [3B_115_C01_FM1](#)
Source Species [Triticum aestivum](#)
Source Germplasm [Chinese Spring](#)
DNA Origin Chromosome 3B BAC ends
Data Source [Sourdille, Pierre](#) 2006.03
[Sourdille, Pierre](#) 2006.1
 0

➤ Rapport du marqueur Barc186

Probe [BARC186](#)
Locus [Xbarc186-5A](#)
[Xbarc186](#)
Remarks Contains motif : (CT)¹⁵⁺⁴
 BARC primer pairs are developed by P. Cregan, Q. Song and associates at the USDA-ARS Beltsville Agriculture Research Station. Meiotic map information was developed by J.R. Shi, R. Ward and associates at Michigan State University. Deletion map information was developed by B.Gill, S. Singh and associates at Kansas State University. Funding for this research is provided by USDA-ARS in conjunction with the U.S. Wheat and Barley Scab Initiative.
Type PCR
 SSR

PCR 5' GGAGTGTCGAGATGATGTGGAAAC 3'
prime 5' CGCAGACGTCAGCAGCTCGAGAGG 3'
rs
Ampli Annealing temperature = 58
ficatio
n
Condi
tions
Seque BV211828
nce
Sourc Triticum aestivum
e
Specie
s
Data Ward, Rick
Sourc
e

Annexe 6

Les dilutions de l'ADN des échantillons mutés par les rayons Gamma par Nanodrop

#	Sample ID	Jour et date	Conc. De l'acide nucl.	Unité	A260	A280	260/280	260/230	Type D'éch.	Facteur	V1 pour Concentration ADN 10ng 100µl	Qté H2O a ajouté
1	G1-1	26/11/2013 09:01:01	141,7	ng/µl	2,834	1,512	1,88	2,03	DNA	50	7,1	92,9
2	G1-2	26/11/2013 09:06:56	72,2	ng/µl	1,444	0,787	1,83	2,26	DNA	50	13,9	86,1
3	G1-3	26/11/2013 09:09:11	51,3	ng/µl	1,026	0,548	1,87	2,44	DNA	50	19,5	80,5
4	G1-4	26/11/2013 09:11:24	57,8	ng/µl	1,157	0,613	1,89	2,29	DNA	50	17,3	82,7
5	G2-1	26/11/2013 09:13:07	77,9	ng/µl	1,559	0,823	1,89	2,28	DNA	50	12,8	87,2
6	G2-2	26/11/2013 09:14:43	102,5	ng/µl	2,049	1,084	1,89	2,25	DNA	50	9,8	90,2
7	G2-3	26/11/2013 09:22:28	99	ng/µl	1,979	1,056	1,87	2,25	DNA	50	10,1	89,9
8	G2-4	26/11/2013 09:23:12	143,3	ng/µl	2,865	1,501	1,91	2,14	DNA	50	7,0	93,0
9	G3-1	26/11/2013 09:26:42	130,5	ng/µl	2,609	1,345	1,94	2,24	DNA	50	7,7	92,3
10	G3-2	26/11/2013 09:27:53	60,3	ng/µl	1,206	0,661	1,83	2,15	DNA	50	16,6	83,4
11	G3-3	26/11/2013 09:31:08	86,2	ng/µl	1,725	0,911	1,89	2,2	DNA	50	11,6	88,4
12	G3-4	26/11/2013 09:33:11	99,6	ng/µl	1,992	1,062	1,88	2,3	DNA	50	10,0	90,0
13	G4-1	26/11/2013 09:35:34	71,4	ng/µl	1,428	0,76	1,88	2,3	DNA	50	14,0	86,0
14	G4-2	26/11/2013 09:37:04	90,6	ng/µl	1,813	0,963	1,88	2,24	DNA	50	11,0	89,0
15	G4-3	26/11/2013 09:38:48	81,9	ng/µl	1,638	0,85	1,93	2,34	DNA	50	12,2	87,8
16	G4-4	26/11/2013 09:42:10	88,3	ng/µl	1,766	0,995	1,77	1,53	DNA	50	11,3	88,7
17	G5-1	26/11/2013 09:44:40	102,9	ng/µl	2,059	1,042	1,98	2,28	DNA	50	9,7	90,3
18	G5-2	26/11/2013 09:46:23	101	ng/µl	2,02	1,052	1,92	2,17	DNA	50	9,9	90,1
19	G5-3	26/11/2013 09:48:09	118,5	ng/µl	2,37	1,222	1,94	2,09	DNA	50	8,4	91,6
20	G5-4	26/11/2013 09:49:41	155,9	ng/µl	3,118	1,595	1,96	2,16	DNA	50	6,4	93,6
21	G6-1	26/11/2013 09:51:25	123,1	ng/µl	2,462	1,274	1,93	2,17	DNA	50	8,1	91,9
22	G6-2	26/11/2013 09:52:30	91,7	ng/µl	1,833	0,966	1,9	2,13	DNA	50	10,9	89,1
23	G6-3	26/11/2013 09:53:37	94,2	ng/µl	1,883	0,982	1,92	2,26	DNA	50	10,6	89,4
24	G6-4	26/11/2013 09:55:08	240,7	ng/µl	4,813	2,471	1,95	2,09	DNA	50	4,2	95,8

Les dilutions de l'ADN des échantillons mutés par l'EMS par Nanodrop

#	Sample ID	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor	V1	Qté H2O a ajouté
1	EMS1/1-1	27/11/2013 09:59:38	160,7	ng/µl	3,214	1,66	1,94	2,16	DNA	50	6,2	93,8
2	EMS1/1-2	27/11/2013 10:03:07	94,2	ng/µl	1,884	0,95	1,99	2,13	DNA	50	10,6	89,4
3	EMS1/1-3	27/11/2013 10:04:48	368,9	ng/µl	7,378	3,66	2,02	2,09	DNA	50	2,7	97,3
4	EMS1/1-4	27/11/2013 10:07:46	162,1	ng/µl	3,242	1,61	2,02	2,12	DNA	50	6,2	93,8
5	EMS1/2-1	27/11/2013 10:09:05	169,5	ng/µl	3,389	1,74	1,95	2,01	DNA	50	5,9	94,1
6	EMS1/2-2	27/11/2013 10:12:22	166,9	ng/µl	3,338	1,72	1,95	2,06	DNA	50	6,0	94,0
7	EMS1/2-3	27/11/2013 10:15:03	174,4	ng/µl	3,489	1,71	2,04	2,1	DNA	50	5,7	94,3
8	EMS1/2-4	27/11/2013 10:17:05	109,4	ng/µl	2,189	1,09	2,02	2,13	DNA	50	9,1	90,9
9	EMS1/3-1	27/11/2013 10:19:36	301,5	ng/µl	6,029	3,16	1,91	2,08	DNA	50	3,3	96,7
10	EMS1/3-2	27/11/2013 10:21:18	18,1	ng/µl	0,362	0,17	2,11	1,91	DNA	50	55,2	44,8
11	EMS1/3-3	27/11/2013 10:23:05	164,5	ng/µl	3,289	1,65	1,99	2,16	DNA	50	6,1	93,9
12	EMS1/3-4	27/11/2013 10:25:03	173,8	ng/µl	3,476	1,74	2	2,16	DNA	50	5,8	94,2
13	EMS2/1-1	27/11/2013 10:27:35	151,6	ng/µl	3,033	1,58	1,92	2,14	DNA	50	6,6	93,4
14	EMS2/1-2	27/11/2013 10:28:36	96,5	ng/µl	1,93	1,01	1,91	1,97	DNA	50	10,4	89,6
15	EMS2/1-3	27/11/2013 10:30:24	123,4	ng/µl	2,467	1,23	2	2,16	DNA	50	8,1	91,9
16	EMS2/1-4	27/11/2013 10:31:03	128,3	ng/µl	2,566	1,28	2,01	2,16	DNA	50	7,8	92,2
17	EMS2/2-1	27/11/2013 10:34:14	42,7	ng/µl	0,855	0,45	1,92	1,81	DNA	50	23,4	76,6
18	EMS2/2-2	27/11/2013 10:36:03	135,8	ng/µl	2,716	1,38	1,96	2,14	DNA	50	7,4	92,6
19	EMS2/2-3	27/11/2013 10:37:03	213	ng/µl	4,261	2,22	1,92	2,15	DNA	50	4,7	95,3
20	EMS2/2-4	27/11/2013 10:38:34	82,8	ng/µl	1,656	0,84	1,97	2,11	DNA	50	12,1	87,9
21	EMS2/3-1	27/11/2013 10:40:11	111,6	ng/µl	2,232	1,13	1,98	2,08	DNA	50	9,0	91,0
22	EMS2/3-2	27/11/2013 10:41:35	165	ng/µl	3,3	1,7	1,95	2,12	DNA	50	6,1	93,9
23	EMS2/3-3	27/11/2013 10:44:12	148,8	ng/µl	2,976	1,49	1,99	2,16	DNA	50	6,7	93,3
24	EMS2/3-4	27/11/2013 10:45:12	41,1	ng/µl	0,822	0,41	2,02	2,05	DNA	50	24,3	75,7

Nom et prénom: Louali Yamouna	date de soutenance : 01/12/2016										
Thème : Production de génotypes mutants chez le blé dur (<i>Triticum durum</i>) : une source de variabilité génétique pour la tolérance à la sécheresse.											
Nature du diplôme : Doctorat 3ème cycle en Biotechnologie, Biologie et Environnement, option « Biotechnologie et Génomique Végétales »											
<p>Résumé</p> <p>L'exploitation de la diversité génétique naturelle et induite est la condition de base pour l'amélioration de la plante dans le développement de variétés avec des caractères souhaités. A cet effet l'application de la mutagenèse physique et chimique a été établie.</p> <p>Quatre expérimentations ont été faites :</p> <p>la première concernant la mutation physique par les rayons Gamma sur six variétés, Une étude en culture hydroponique a été faite pour déterminer les effets de l'irradiation Gamma sur Des paramètres physiologiques et morphologiques des plantes ; Le pourcentage de germination augmente chez les plantules irradiées avec la dose 25Gy et 100Gy comparé au contrôle non irradié dans le milieu Knops, ces mêmes doses ont amélioré la longueur des feuilles et racines, le volume racinaire et le poids frais et secs.</p> <p>Un autre essai sous serre qui a fait l'objet d'une étude du comportement des variétés de blé dur suite à un stress hydrique induit à la 4ème feuille, nous a permis de trouver quelques mutants qui répondent mieux à ce stress par rapport au contrôle, pour la variété Waha mutée avec les rayonnement Gamma pour la dose 180Gy, la variété GGR mutée par la dose 220Gy, et la variété GTA/dur traitée avec la dose 50Gy. Ces nouvelles populations ont eu la possibilité de bien répondre au manque d'eau, leur adaptation à ce stress a été relevée suite à l'étude du taux de la Chlorophylle, la Température foliaire, la Teneur relative en eau et le potentiel osmotique.</p> <p>Un troisième essai in vitro a été mené à fin d'observer les variations induites par les rayons Gamma sur des cals de trois variétés de blé dur Waha, Gta/dur et Benimestina. Après l'irradiation, les cals ont présenté des brunissements dus à un stress oxydatif.</p> <p>Une seconde expérimentation visant à étudier les effets de la mutation chimique par l'EMS sur trois variétés de blé dur par l'étude du rendement en grain et ses composantes. Ainsi que la collection de la M2 pour l'étude moléculaire.</p> <p>Une troisième expérimentation a été faite pour la détermination du taux des protéines totales des feuilles pour tous les échantillons irradiés M1 et mutés avec l'EMS M1 et M2 par SDS-PAGE. Les différences observées concernant les bandes protéiques révélées, se traduisent en termes de poids moléculaire et d'intensité.</p> <p>Une quatrième visant à analyser les variations dues à la mutation : L'analyse moléculaire par les microsatellites SSR faite avec 12 Amorces a révélé un polymorphisme par l'absence et la présence de nouvelles bandes entre les contrôles et les variétés traitées. Ces 48 échantillons d'ADN ont été amplifiés par la majorité des amorces sauf pour BARC8 et WMC322 où il n'y a pas eu d'amplification. Concernant les mutants Gamma : parmi les 12 marqueurs, 7 sont polymorphes (84%) et pour le cas d'EMS : parmi les 12 amorces, 6 sont polymorphes (50%).</p> <p>Cette étude a montré que la mutagenèse aléatoire provoque des modifications dans le génome qui peuvent avoir un effet défavorable, comme elles peuvent augmenter la croissance des plantes et leur développement, cela dépend de la variété et de la dose ou la concentration.</p> <p>Mots clés : blé dur, mutagenèse, EMS, irradiation gamma, SSR, Stress hydrique</p>											
Laboratoire de recherche : Génétique, Biochimie et Biotechnologie Végétale											
<p>Membre du jury</p> <p>Président :</p> <table> <tr> <td>Pr. Nadia Ykhlef</td> <td>Professeur Université des Frères Mentouri Constantine</td> </tr> </table> <p>Rapporteur:</p> <table> <tr> <td>Pr. Abdelhamid. Djekoun</td> <td>Professeur Université des Frères Mentouri Constantine</td> </tr> </table> <p>Examineurs:</p> <table> <tr> <td>Pr. Amar Benmahammed</td> <td>Professeur Université Ferhat Abbas Sétif</td> </tr> <tr> <td>Pr. Louhichi Brinis</td> <td>Professeur Université Badji Mokhtar Annaba</td> </tr> <tr> <td>Pr. Med. Abdelhafid. Hamidechi</td> <td>Professeur Université des Frères Mentouri Constantine</td> </tr> </table>		Pr. Nadia Ykhlef	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine	Pr. Abdelhamid. Djekoun	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine	Pr. Amar Benmahammed	Professeur Université Ferhat Abbas Sétif	Pr. Louhichi Brinis	Professeur Université Badji Mokhtar Annaba	Pr. Med. Abdelhafid. Hamidechi	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine
Pr. Nadia Ykhlef	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine										
Pr. Abdelhamid. Djekoun	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine										
Pr. Amar Benmahammed	Professeur Université Ferhat Abbas Sétif										
Pr. Louhichi Brinis	Professeur Université Badji Mokhtar Annaba										
Pr. Med. Abdelhafid. Hamidechi	Professeur Université des Frères Mentouri Constantine										