

Préambule

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au laboratoire de Microbiologie et Biologie Moléculaire (LMBM) de la Faculté des Sciences (FSR), Université Mohammed V - Rabat, sous l'encadrement du professeur **BouchraBelkadi** et le co-encadrement du professeur **Abdekarim FILALI-MALTOUF**.

Ils ont été réalisés dans le cadre du projet ArganBioGen intitulé : « *Caractérisation génétique et moléculaire et multiplication par microbouturage d'arganiers adaptés à des conditions éco-climatiques extrêmes* », Ce projet a reçu le soutien financier de l'Académie Hassan II des Sciences et Techniques, Rabat et du Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de la Formation des Cadres, Maroc.

Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications et communications scientifiques suivantes :

Liste des publications:

- **Yatrib C.**, Belkadi B., Pakhrou O., et al. (2015). "Assessment of Genetic Diversity of *Argania spinosa* L. Growing in Arid and Semi-arid Areas of Morocco as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeats". Journal of Agricultural science and technology 336–346.
- **Yatrib C.**, Belkadi B., Pakhrou O., et al.(2017)." Genetic diversity and population structure of the endangered argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) in Morocco as revealed by SSR markers: implication for conservation (**Soumis**)
- Laakili A., Belkadi B., Gaboun F., **Yatrib C.**, et al. (2016). "Analysis of dendrometric diversity among natural populations of cork oak (*Quercus suber* L.) from Morocco." Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 40 :127-135.
- Pakhrou O., Medraoui L., **Yatrib C.**, et al (2016) Study of genetic diversity and differentiation of argan tree population (*Argania spinosa* L.) using AFLP markers. Australian Journal of Crop Science. 10:7680
- Pakhrou O., Medraoui L., **Yatrib C.**, et al (2017) Assessment of genetic diversity and population structure of an endemic Moroccan (*Argania spinosa* L.) based in IRAP and ISSR markers and implications for conservation. Physiology and Molecular Biology of Plants: 1-11

Liste des communications orales :

- **Yatrib C.**, B. Belkadi, O. Pakhrou, et al (2014) Caractérisation de la diversité génétique des populations d'arganier « *Argania spinosa* L. » par les marqueurs dendrométriques et moléculaires « ISSR ».
- *Journées doctoriales, du 27- 28 Novembre 2014 Rabat*
- **Yatrib C.**, Belkadi B., Medraoui L., et al (2015). Analyse et structuration de la diversité génétique de l'arganeraie Marocaine moyennant les marqueurs moléculaires ISSR et SSR
- *2^{ème} édition du congrès International de l'arganier 17-19 Décembre 2014. Agadir.*
- Pakhrou O., Medraoui L., Belkadi B., **Yatrib C.**, et al (2015). Structuration et différenciation génétique des populations d'*Argania spinosa* L. révélés par marqueurs AFLP.
 - *Actes du 3^{ème} congrès International de l'Arganier. 17-19 Décembre 2014. Agadir. Pp 151-155.*
- **Yatrib C.**, Belkadi B., Pakhrou O., et al (2016). Diversité et structuration génétique de l'arganeraie marocaine sur la base des marqueurs moléculaires ISSR et SSR.
- *Une Journée scientifique sur l'Arganier "Caractérisation génétique et moléculaire et multiplication par micro-bouturage d'arganiers a des conditions éco-climatiques extrêmes » ; 28 Novembre 2016 Agadir*
- Pakhrou O., Belkadi B., **Yatrib C.**, et al (2016). Analyse de la diversité génétique et de la structure des populations d'*Argania spinosa* L., de la région d'Essaouira par AFLP.
- *Une Journée scientifique sur l'Arganier "Caractérisation génétique et moléculaire et multiplication par micro-bouturage d'arganiers a des conditions éco-climatiques extrêmes » ; 28 Novembre 2016 Agadir- ENCG Agadir*
- **Yatrib C.**, Belkadi B., Pakhrou O., et al (2016). Development of a core collection for Argan tree in Morocco by heuristic search based on SSR markers.
 - *International conference on Ecology and Ecosystems , 18h to 20th September 2017, Toronto, Ontario, Canada*

Liste des communications affichées :

- **Yatrib C.**, Belkadi B., Pakhrou O., et al. (2015). Genetic diversity of *Argania spinosa* L. from the Argan region using Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) markers
Plant Genome Evolution, 6th to 8th Septembre 2015, Amsterdam, Netherlands
- Pakhrou O. Medraoui L. **Yatrib C.** et al (2015). Efficiency of AFLP markers in the genetic analysis of Argan tree (*Argania spinosa* L).
Plant Genome Evolution, 6th to 8th Septembre 2015, Amsterdam, Netherlands
- **Yatrib C.**, Pakhrou O., Belkadi B., et al. (2017). Development of a core collection for Argan tree in Morocco by heuristic search based on SSR markers.
International conference on Ecology and Ecosystems, 18h to 20th September 2017, Toronto, Ontario, Canada.

- Pakhrou O. Medraoui L. **Yatrib C.** *et al* (2017) Population structure and genetic diversity of an endangered and endemic Moroccan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) based on AFLP and IRAP markers.
International conference on Ecology and Ecosystems, 18h to 20th September 2017, Toronto, Ontario, Canada.

Distinction

Finale de la compétition internationale « Ma thèse en 180s ». Edition 2014, 24-26 Septembre 2014. Montréal, Québec, Canada.

Remerciements

La thèse est une aventure extraordinaire qui nous pousse à nous surpasser et qui nous construit. C'est une expérience unique, avec ses hauts et ses bas, elle reste une belle aventure. Au jour le jour je me sens complètement transformé et grandi par expérience. Cette aventure pour moi est un enrichissement aussi personnel que professionnel. C'est également l'achèvement d'une étape très importante de ma vie et le début d'une autre que j'espère aussi attractive. Un grand Merci à toutes les personnes qui ont fait que cette expérience soit unique.

Je tiens à Remercier Monsieur le professeur **Albert Sasson**, président du jury de thèse, Merci d'avoir accepté de me consacrer de votre temps afin d'examiner examinant mes travaux de recherches. J'en suis honoré et je vous exprime toute ma profonde reconnaissance.

Je tiens d'abord à remercier en premier lieu, le professeur **Abdelkarim FILALI-MALTOUF**, de la Faculté des Sciences de Rabat pour m'avoir accordé sa confiance et m'ai ouvert la porte du laboratoire et m'a épaulé tout au long de la réalisation de ce travail, vous avez aussi pris la responsabilité de co-encadrer cette thèse. Je suis très reconnaissante pour votre disponibilité, vos apports scientifiques et logistiques ainsi que vos qualités humaines. Votre revendication constante du travail sérieux m'a aidé à progresser. Que le fruit de ces longues années de travail soit à la hauteur de ce que vous avez semé en moi.

Mes remerciements vont aussi au Professeur **Bouchra BELKADI**, pour m'avoir accordée sa confiance en acceptant de diriger mes recherches. Je tiens à vous exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour votre disponibilité, votre patience, votre compréhension, vos qualités humaines et les intérêts portés pour mon sujet de recherches.

Je remercie le Professeur **Cherkaoui EL MODAFAR** de la Faculté des Sciences et Technique de Marrakech, d'avoir accepté de rapporter cette. Qu'il accepte mes sincères remerciements pour avoir consacré de son temps à l'analyse de mes travaux de recherches et d'avoir exprimées des jugements pertinents sur mon manuscrit.

Je remercie également le Professeur **Mohammed ATER** de la Faculté des Sciences Tétouan. Qu'il accepte mes sincères remerciements pour avoir pris le de son temps à l'analyse de mes travaux. Soyez assuré, cher professeur, de mon estime et de ma profonde gratitude.

Egalement, je remercie le Professeur Saad **IBN-SOUDA KOURAICHI** de la Faculté des Sciences et Techniques Fès d'avoir accepté de rapporter cette thèse. Merci également pour votre coopération et votre disponibilité ainsi que tout le personnel de la Cité d'Innovation Fès lors de notre passage pour les analyses moléculaires.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont particulièrement à Professeur **Leila MEDRAOUI**, vous avez toujours su trouver les mots pour m'encourager et me pousser vers l'avant quand le moral est bas. Votre soutien a toujours été d'une énorme valeur pour moi. Je tiens à vous remercier également pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineur.

Que Dr. **Fatima GABOUNE** de l'Institut Nationale de la Recherche Agronomique de Rabat trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour juger et d'examiner ce travail. Je vous adresse mes sentiments les plus respectueux.

Je tiens à remercier Dr **Abderrahim FERRADAOUS** du HCEFLCD- Marrakeche et Mr. Abderahmane **AIT EL HAJ** de l'ANDZOA-Agadir pour leur collaboration.

Et d'avoir accepté de juger ce travail. Qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance et mes profonds respects.

Je remercie très chaleureusement les Professeurs et les membres du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire qui m'ont beaucoup aidé et encouragé et particulièrement : **Pr. Jamal AURAG**, **Pr. Bekkay BERRAHO**, **Pr. Laila SBABOU**. Merci pour votre soutien moral et vos conseils scientifiques prodigués.

Je tiens à remercier également Docteur **Abdenasser BENJALLOUN**, pour sa disponibilité, ses apports avec le Logiciel QGIS ainsi que ses apports pour l'amélioration de mon manuscrit de thèse.

J'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable grâce à l'ensemble des membres de l'équipe du Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire. J'exprime toute ma gratitude mes collègues, pour l'enthousiasme et leur soutien quotidien. Merci à vous tous pour votre bonne humeur, pour toutes ces séances de rire et de sourire, et particulièrement : **Imane EL ATTAR**, **Imane CHAMKHI**, **Amal LAAKILI**, **Meryem MEKKAOUI**, **Meryem BELFQUIH**, **Malika OUBOUHSSAIN**, **Jawahir**. Merci pour toutes ces discussions autour d'un repas.

Une attention toute particulière à Mes chers collègues et amis, **Mohammed ALAMI** et **Ouafae PAKHROU** : merci pour votre soutien, votre aide, pour tous les voyages qu'on a partagé ensemble, les sorties de terrains, merci d'avoir partagé cette aventure avec moi.

Cet aboutissement n'aurait jamais pu se faire sans l'encouragement, le soutien et l'amour de tous les membres de ma famille et mes amis. A mes chers parents, **Khalid YATRIB** et **Amina ELKASMI**, à ma sœur **Fatima Zohra**, et mon frère **Taha**: Merci d'avoir cru en moi : Merci pour votre soutien votre patience et pour l'affection que vous m'avez manifesté durant ces années. Que la Grâce de

dieu soit avec vous... **A mesgrands-mères, mes oncles mes tantes et mes cousins** : Merci pour vos prières et vos souhaits, merci du fond u cœur. ...**A ma belle-famille** : Merci pour votre soutien et tous vos encouragements...**A mes amis** : Merci d'être là et m'avoir toujours soutenu et m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin...Une dédicace toute particulière à Ma twin **Kaoutar TAHA** , mon Mentor **Oussama**, deux amis très spéciaux qui m'ont soutenue dès le début et m'ont aidée dans les périodes de doute.

Je garde pour la fin un remerciement particulier à mon mari, **Nawfal**. Je te remercie infiniment de m'avoir aidée, soutenu, encouragé et surtout aimée...Ces dernières années n'ont pas été si simples, m'a aidé à garder le moral haut. Merci d'avoir existé dans ma vie.

Pour finir, je souhaiterais dédier ce travail à tous ceux que j'aime. Qu'ils y trouvent ici l'expression de ma profonde affection et de mes plus sincères remerciements.

Résumé

La dégradation de l'arganeraie est le résultat de la combinaison de l'absence de régénération naturelle et de la perte d'arbres, qui dépend elle-même de facteurs bioclimatiques et sociaux. La conception de stratégies de gestion et de conservation des ressources génétiques de l'arganier exige une connaissance approfondie de la structuration de sa diversité génétique dans les populations actuelles, et ceux, dans le but d'assurer la pérennité de cette espèce endémique menacée. Dans ce cadre, un échantillonnage portant sur 480 arbres d'arganier de différentes populations appartenant aux différentes régions de l'écosystème arganeraie, a été utilisé pour l'étude de sa diversité génétique à l'aide de marqueurs moléculaires neutres de type ISSR, et de marqueurs co-dominants type SSR. L'analyse de la diversité a permis de révéler un total de 550 *loci* polymorphes. Les différents paramètres de diversité ont montré que la région d'Essaouira comporte les populations les plus diversifiées. L'analyse des profils multilocus pour les deux marqueurs a montré une structuration génétique très élevée des vingt-quatre populations étudiées. Aussi, une classification génétiques basée sur : la classification hiérarchique, l'analyse des composantes principales et l'analyse bayésienne a révélé clairement une forte structuration génétique avec un modèle cohérent suggérant 2 pools génétiques et une structuration corrélée positivement avec les distances géographiques. A la lumière de ces données moléculaires, une core collection a été conçue, composée de 66 individus avec un maximum de diversité génétique. Ces résultats ont des implications importantes pour une meilleure gestion des ressources génétiques de l'arganeraie marocaine.

Mot clé : *Argania spinosa* L, ISSR, SSR, ressources génétique, core collection.

Abstract

The deterioration of the argan forest is resting of the combination of absence of natural regeneration and the loss of trees, which itself depends on bi climatic and social factors. The design of management and conservation strategies of the genetic resources of the argan tree requires a thorough knowledge of the structure of its genetic diversity, In order to ensure the sustainability of this threatened endemic species. In this context, a sampling was carried out on 480 argan trees of different populations representing all its distribution areas, was used for the study of genetic diversity using co-dominant molecular markers (SSR) , and neutral molecular markers (ISSR). The analysis genetic diversity revealed a total of 550 polymorphic loci. Thus, the different parameters of diversity have shown that the Essaouira region comprises the most diverse populations. The multilocus profile analysis for the two markers showed a very high genetic structure of the 24 studied populations. A genetic classification based on: hierarchical classification, analysis of principal components and Bayesian analysis clearly revealed a strong genetic structure with a coherent model suggesting 2 genetic pools. This structure is positively correlated with the geographical distances. Based on these molecular data, a core collection was designed, consisting of 66 individuals with maximum genetic diversity. These results have important implications for better management of the genetic resources of the argan tree.

Keywords: *Argania spinosa* L., ISSR, SSR, genetic resources, core collection.

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
ACP	Analyse des composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	Amplified Fragments Length Polymorphism
AMOVA	Analyse moléculaire de la variance
dNTP	Mélange des quatres désoxyribonucléotides: dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP: (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate)
DO	Densité optique
EDTA	Acide Ethylènediaminetétracétique
Fst	Indice de fixation génétique sur l'ensemble des individus des populations
GenAlex	Genetic Analysis in Excel
Gst	Indice de différenciation génétique
Gst	Coefficient de différenciation génétique sur l'ensemble des individus des populations
LMBM	Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire
MCMC	Chaines de Markov avec techniques de Monte Carlo
mM, μM, μL	millimolaire, micromolaire, microlitre
Mpa	Méga Pascal
Nm	Flux de gènes
PCR	Polymerase chain reaction/ réaction en chaîne par polymérase
RAPD	Random amplification of polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragments-length polymorphism
SMM	Stepwise mutaion model/ modèle pas à pas
SSR	Simple Sequence Repeat
TAE	Tris-borate-EDTA
TE	Tris-EDTA
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean

Liste des Figures

Figure 1: Arbre d'arganier de la région d'Essaouira	5
Figure 2: L'arganier (<i>Argania spinosa</i> L.)	7
Figure 3: Aire de répartition géographique de l'arganier au Maroc	11
Figure 4: L'arganier au centre des quatre piliers du système agro-sylvo-pastoral local	14
Figure 5: Polymorphisme révélé par des marqueurs RFLP.....	19
Figure 6: Principe de la PCR.....	20
Figure 7: Polymorphisme révélé par des marqueurs RAPD	21
Figure 8: Polymorphisme révélé par es marqueurs RAPD	22
Figure 9: Polymorphisme révélé par les marqueurs SSR.....	23
Figure 10: Principe des ISSR	24
Figure 11: Origine géographique des accessions. Voir tableau 1 pour le code des accessions	36
Figure 12: Collecte des feuilles à partir d'une branche (Cas d'arbre de la forêt d'Ait Issi).....	39
Figure 13: Banque de lyophilisat de la collection d'Arganier au LMBM	39
Figure 14: Description du programme « Argan-ISSR ».....	42
Figure 15: Principe de transformation des bandes en codes binaires	43
Figure 16: Programme d'amplification « SSR Arganier ».....	46
Figure 17: Programme d'amplification « SSR spécifique Arganier ».....	47
Figure 18: (A), Exemple de gel d'agarose 1% servant à l'estimation de qualité d'ADN	55
Figure 19: Profil des 20 individus de la population Retmana révélé par l'amorce FL9.....	57
Figure 20 : Dendrogramme UPGMA basé sur la distance génétique non biaisais de Nei (1978).....	61
Figure 21: Projection de l'Analyse des composantes principales des 24 populations d' <i>Argania spinosa</i> L.....	63
Figure 22: Exemple de profil SSR obtenu après amplification par l'amorce MH04	71
Figure 23: Classification UPGMA des 24 populations en se basant sur la matrice Fst	78
Figure 24: Test de Mantel pour les 24 populations par les marqueurs SSR.....	79
Figure 25: ACP représentant les populations échantillonnées par GenAlex et par le R.	80
Figure 26: (A) : Différentes valeurs de ΔK pour déterminer le nombre de populations supposées (K) selon la méthode Evanno (2005) (B) : Histogramme des coefficients de membership pour les populations étudiées selon le logiciel STRUCTURE.....	81
Figure 27: Répartition spatiale des populations d' <i>Argania spinosa</i> L. selon leur assignation à l'un des deux clusters.	82

Liste des Tableaux

Tableau 1: La classification botanique de l'arganier	8
Tableau 2: Caractérisation géographique des populations d'arganiers échantillonnées	37
Tableau 3: Liste des amorces ISSR utilisées dans cette étude	41
Tableau 4: Caractéristiques des loci microsattellites étudiés pour le typage des individus	44
Tableau 5: Polymorphisme révélé par les sept amorces ISSR	56
Tableau 6: Paramètre de diversité génétique intra-population	57
Tableau 7: Indices de diversité de Nei et estimation du flux de gène pour les 24 provenances.....	58
Tableau 8: Analyse Moléculaire de la Variance pour les 24 populations	59
Tableau 9: Distance génétique non biaisais (Sous le diagonal) et Identité génétique (au-dessus le diagonal) ...	60
Tableau 10: Description des loci SSR	71
Tableau 11: Nombre d'allèles par population et par locus	73
Tableau 12: Estimation des indices de diversité génétique par marqueurs microsattellites	74
Tableau 13: Nombre d'allèles privés par locus et par région géographique	76
Tableau 14: Différentiation génétique au sein de chaque paire de groupe géographique	76
Tableau 15: Différentiation génétique entre paire de populations (F_{st}).....	77
Tableau 16: Analyse moléculaire de la variance par les marqueurs SSR	78
Tableau 17: Liste des 66 individus constituant la Core collection obtenus par le Logiciel PowerCore	90
Tableau 18: Mesure de la diversité génétique de la core collection et de la collection totale	92
Tableau 19: Coefficient de similarité de la collection entière et de la collection aléatoire	93

Sommaire

Introduction générale et Objectif de la thèse	1
Synthèse bibliographique	4
1. L'arganier	5
1.1. Aspect botanique	5
1.2. Taxonomie de l'Arganier.....	7
1.3. Aspect historique	8
1.4. Distribution et aire de répartition géographique de l'arganier	10
1.5. Aspect écologique de l'arganier	11
1.5.1. Les exigences climatiques	11
1.5.2. Les exigences édaphiques	12
1.5.3. Les exigences écologiques	12
1.6. Les intérêts de l'arganier	13
1.6.1. Intérêt socio-économique	13
1.6.2. Intérêts écologique	14
1.6.3. Intérêt biologique et diététique.....	14
1.7. Contraintes affectant l'arganier au Maroc	15
2. Les marqueurs génétiques utilisés dans l'estimation de la diversité et leur intérêt.	16
2.1. Les marqueurs morphologiques.....	17
2.2. Les marqueurs biochimiques	17
2.3. Les marqueurs moléculaires	18
3. Les marqueurs moléculaires employés chez l'arganier.....	18
3.1. Les marqueurs RFLP	18
3.2. Les marqueurs RAPD	19
3.3. Les marqueurs AFLP	21
3.4. Les marqueurs SSR	22

3.5.	Les marqueurs ISSR	23
4.	Apports des méthodes et outils de la génétique	25
5.	Apport des marqueurs génétique chez l'arganier	25
6.	Description et méthode d'analyse de la diversité génétique	26
6.1.	Paramètres de la diversité et de différenciation génétique	27
6.1.1.	Expression de la diversité au niveau intra-spécifique	27
6.1.2.	Paramètre de la diversité génétique au niveau interpopulations	28
6.2.	Analyse de la structure de la diversité	29
7.	Conservation des ressources génétiques.....	30
7.1.	La conservation <i>in situ</i>	30
7.1.1.	<i>On-farm</i> conservation.....	31
7.1.2.	Les réserves naturelles	31
7.2.	La conservation <i>ex-situ</i>	32
7.2.1.	La Core collection	32
II.	Matériel et Méthodes	35
1.	Matériel d'étude	35
1.1.	Choix des sites et des populations d'études	35
1.2.	Caractéristiques des sites	36
2.	Méthodes d'étude	37
2.1.	Mode d'échantillonnage	38
2.2.	Collecte des échantillons	38
2.3.	Extraction de l'ADN génomique	39
2.4.	Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN extrait	40
2.5.	Amplification de l'ADN par PCR-ISSR	41
2.5.1.	Choix des amorces ISSR	41
2.5.2.	Mélange réactionnel et Amplification de l'ADN	41
2.5.3.	Analyse des produits PCR.....	42

2.5.4.	Lecture des gels ISSR	43
2.6.	Amplification de l'ADN par PCR-SSR.....	43
2.6.1.	Choix des amorces SSR	43
2.6.2.	Mélange réactionnel et amplification de l'ADN	45
2.6.3.	Analyse des produits PCR.....	48
2.7.	Homogénéisation des matrices et traitement des données.....	48
2.7.1.	Homogénéisation des données	48
2.7.2.	Analyse statistique des données	48
2.8.	La construction de la Core Collection	52
Résultats et Discussion		53
Chapitre I : Evaluation de la diversité génétique intra et inter-populations de l'arganeraie marocaine moyennant les marqueurs moléculaires ISSR		55
1.	Etude quantitative et qualitative des ADN extraits	55
2.	Caractérisation moléculaire des populations d'arganier via les marqueurs ISSR.....	56
2.1.	Analyse du polymorphisme	56
2.2.	Variabilité génétique intra-population.....	56
2.3.	Variabilité génétique inter-population.....	58
2.4.	Relations génétiques entre les populations d'arganier	59
2.4.1.	La distance génétique :	59
2.4.2.	La classification hiérarchique.....	61
2.4.3.	L'isolement par la distance	62
2.4.4.	Analyse des composantes principales	62
Discussion		63
Conclusion.....		67
Chapitre II : Structuration de la variabilité génétique des populations d'Arganier via les marqueurs moléculaires SSR		70
1.	Analyse de la diversité génétique observée.....	71
2.	Analyse de la diversité au niveau intra et inter-populations	74

3. Analyse de la différenciation génétique.....	76
4. Structuration de la diversité génétique	78
4.1. Classification hiérarchique	78
4.2. Isolement génétique par la distance.....	79
4.3. Analyse des Composantes Principales	80
4.4. Analyse Bayésienne de regroupement.....	81
Discussion	83
Conclusion.....	85
Chapitre III : Construction d'une core collection sur la base des données moléculaires	
ISSR et SSR.....	88
1. Homogénéisation des données	88
2. La core collection	89
3. Evaluation de la core collection	91
Discussion.....	93
Conclusion générale	97
Perspectives.....	98
Références Bibliographique	99
Annexes	99

Introduction générale et Objectif de la thèse

La plus grande menace qui pèse sur la planète est le réchauffement climatique. Cette dernière est due à plusieurs facteurs humains au niveau de différents écosystèmes (océans, forêts, montagnes, massifs...). De ce fait, la superficie et la richesse des forêts sont réduites et entraînent une importante disparition de la diversité génétique tant au niveau végétal qu'au niveau animal (Whitmore et al., 1992).

Au Maroc, comme partout dans le monde, la forêt marocaine régresse annuellement, en particulier celle de l'Arganier. Dans le cadre de l'évaluation des ressources forestières mondiales de la FAO (Lafhaili, 2012), les chiffres officiels fournis par le Maroc relatifs à la dégradation de l'arganeraie font état d'une diminution de superficie de 11 100 ha entre 1990 et 2010. Le Polain de Waroux et Lambin (2012) estiment aussi dans leur étude que dans le district rural d'El Faid (Province de Taroudant) la densité a diminué de 44.5% entre 1970 et 2007 sur les 110 000 ha couverts par cette étude.

L'arganier étant un arbre endémique du Sud-Ouest marocain et seul représentant de la famille tropicale Sapotacées au Maroc, il joue un rôle crucial dans l'économie agro-sylvo-pastorale (Msanda et al., 2005) représentant un axe très important du plan Maroc vert.

Pour le Haut-Commissariat des Eaux et Forêts et de la lutte contre la Désertification (HCEFLCD), la réussite effective des plantations d'arganiers est indispensable. La gestion des vergers à graines produisant des graines améliorées étant coûteuse, le Maroc favorise la création de parcs à clones et quelques plantations clonales avec une très large base génétique (Bellefontaine et al., 2010). Pour ce qui est des forêts naturelles constituées de grandes peuplements d'arbres, leurs programmes de gestion et de protection se basent surtout sur la connaissance de la diversité génétique des peuplements reconnue comme étant une information fondamentale en vue de la mise au point de stratégies de conservation (Newton et al., 1999).

Depuis une vingtaine d'années, le développement des techniques de marqueurs moléculaires rend plus précis l'étude de la diversité génétique des espèces. Actuellement, les

marqueurs génétiques sont largement utilisés pour estimer le polymorphisme et prédire l'évolution des populations végétales.

Les premiers moyens utilisés pour la description et l'estimation de cette diversité se sont basés sur les caractères phénotypiques (morphologiques ou agronomiques) mais ces derniers sont influencés par l'environnement. Cependant, et depuis une vingtaine d'années, les marqueurs moléculaires sont devenus les outils de choix dans la mesure de la variabilité génétique en raison de leurs nombreuses qualités. Car, contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement, et ils ne sont pas épistatiques. Egalement, il est devenu possible de procéder au génotypage des individus à l'aide de centaines, voire de milliers, de marqueurs, ce qui confère à ces analyses une précision inégale.

L'étude de la variabilité génétique et de la structure génétique des espèces végétales en générale, et forestier en particulier, est une étape primordiale pour le développement de stratégies de conservation efficaces (Hamrick and Godt, 1996a). Donc la gestion et la préservation des ressources génétiques de l'arganeraie marocaine est indispensable et urgente pour assurer la pérennité de cette espèce menacée et afin de maintenir un niveau adéquat de variabilité génétique.

Pour l'arganier, des études de la diversité génétique ont été réalisées en utilisant des marqueurs biochimiques (Alloenzymes) et morphologiques (Ait Aabd et al., 2011; Bani-Aameur, 2001; Bani-Aameur et al., 1999a; El Mousadik and Petit, 1996a), mais peu d'études se sont basées sur les marqueurs moléculaires (El Mousadik and Petit, 1996; Majourhat et al., 2008; Ait Aabd et al., 2015), en outre, ces dernières concernent un échantillonnage limité ne représentant pas l'ensemble de l'arganeraie marocaine.

Dans ce cadre, ma thèse vient compléter les connaissances préalablement établies en s'appuyant sur un échantillonnage qui a concerné 480 arbres des différentes régions de la forêt d'arganier. Le but serait d'évaluer la diversité génétique de l'arganeraie et d'étudier sa structuration génétique à l'état sauvage et ce moyennant des marqueurs moléculaires neutres (ISSR) et des marqueurs co-dominants de type SSR puis finalement établir une core collection représentant un maximum de la diversité contenue dans la collection totale.

Une présentation bibliographique générale de l'espèce *Arganiaspinosa* L. et des marqueurs moléculaires constituent la Partie I, suivie de la description du matériel et méthodes utilisés au niveau de la partie III.

Les résultats obtenus selon les approches utilisées seront présentés et discutés dans la partie IV comme suit :

1. Description de la diversité génétique chez l'espèce *Arganiaspinosa* L. révélée par ISSR dans son aire de distribution naturelle.
2. Structuration de la diversité génétique établie par les marqueurs SSR.
3. Constitution de la Core Collection et implication dans la conservation.

Enfin, une synthèse générale et une conclusion viendront clore ce manuscrit.

Synthèse bibliographique

1. L'arganier

L'arganier est un arbre endémique du Maroc, il occupe la 3^{ème} place à l'échelle nationale après le chêne vert et le thuya (HCEFLCD, 2012). C'est un arbre rustique, exceptionnellement adapté aux conditions rigoureuses de son habitat. À caractère xérophile, héliophile et thermophile, supportant des températures très élevées et prolongées jusqu'à 50°C à l'état adulte et pouvant se contenter d'une pluviométrie très faible (Boudy, 1952).

Son extension semble limitée aux étages climatiques semi-aride et surtout aride, il offre une grande amplitude écologique puisqu'il s'insère entre le niveau de la mer jusqu'à 1500 m d'altitude (Mhirit and Blerot, 1999), sur tous les types de substrats géologiques et sous des précipitations moyennes annuelles comprises entre 100 et 400 mm (Benabid, 1985)

1.1. Aspect botanique

L'arganier est l'unique espèce du genre *Argania*, une Syderoxyloideae de la famille Sapotacées (Auberville, 1964). C'est une curiosité floristique et botanique, et l'arbre le plus remarquable du Maroc. C'est un arbre épineux, pouvant atteindre 8 à 10 mètres de haut. Son aspect général rappelle celui de l'olivier. Sa cime est large, étalée, dense et ronde. Son tronc est court, noueux tourmenté même souvent multiple et peut vivre jusqu'à 250ans (Figure1).



Figure 1:Arbre d'arganier de la région d'Essaouira

Le feuillage de l'arganier est semi-persistant pouvant tomber suite à une forte sécheresse et les feuilles sont alternes, coriaces, entières, lancéolées ou spatulées et souvent

réunies en fascicules. Les fleurs sont quant à elles pentamères de couleur jaune verdâtre, constituées en glomérules localisés au niveau des entrenœuds et à l'aisselles des feuilles et pouvant être composés de 15 fleurs et plus (Ferradous et al., 1996). Ces dernières sont hermaphrodites, de couleur jaune-verdâtre ou parfois blanche, gamopétales à tube très court, réunies en glomérules (Alaoui, 1999). Le calice est composée de cinq sépales pubescents succédant à deux bractées (Emberger, 1925; Mensier, 1957). La corolle, en cloche, formée de cinq pétales obtuses et arrondies. La floraison se passe en Mai-juin et le mode de pollinisation est majoritairement entomophile et les insectes interviennent à 60% (Bani-Aameur et al., 1999a) (Figure 2).

Chez l'arganier, on observe deux types de floraison : une floraison pauciflore, peu abondante, sur les rameaux âgés lignifiés, c'est la première à être observée, une floraison très abondante et plus tardives sur les nouvelles pousses (Bani-Aameur et al., 1999a; Ferradous et al., 1996).

Le fruit de l'arganier a de son côté fait l'objet de plusieurs études phénotypiques (Charnane, 2001; Ferradous et al., 1996; Zahidi, 1997). C'est une baie sessile formée d'une pulpe charnue (péricarpe, partie externe enveloppant la graine composée) et d'un noyau (pseudo endocarpe). Les graines sont oléagineuses souvent soudées et leur nombre varie d'une à trois par noyau. Le fruit de l'arganier est polyforme et peut être fusiforme, ovale, apiculé, arrondi ou globuleux), de couleur verdâtre avant la maturation puis jaune ou jaune brun ensuite sombre après l'abscission. Au cours d'une année, tous les arbres ne fructifient pas (Ferradous et al., 1996; Zahidi, 1997)

L'enracinement de l'arganier est très développé. Il peut être traçant lorsque les roches dures s'opposent à son extension, ce qui lui permet de profiter même des faibles quantités de pluie (Reidacker et al., 1990).

Le bois de l'arganier est très compact, sans aubier, jaunâtre et lourd. Sa densité varie de 0.9 à 1, et c'est la source d'un excellent charbon (M'Hirit et al., 1998).

L'accroissement en circonférence est très différent selon les conditions du milieu. Il varie pour une période de 20 ans de 1.2 à 2.3 cm par an. L'accroissement en hauteur, durant la première période de 20 ans, est de l'ordre de 20 à 30 cm par an (M'Hirit et al., 1998).

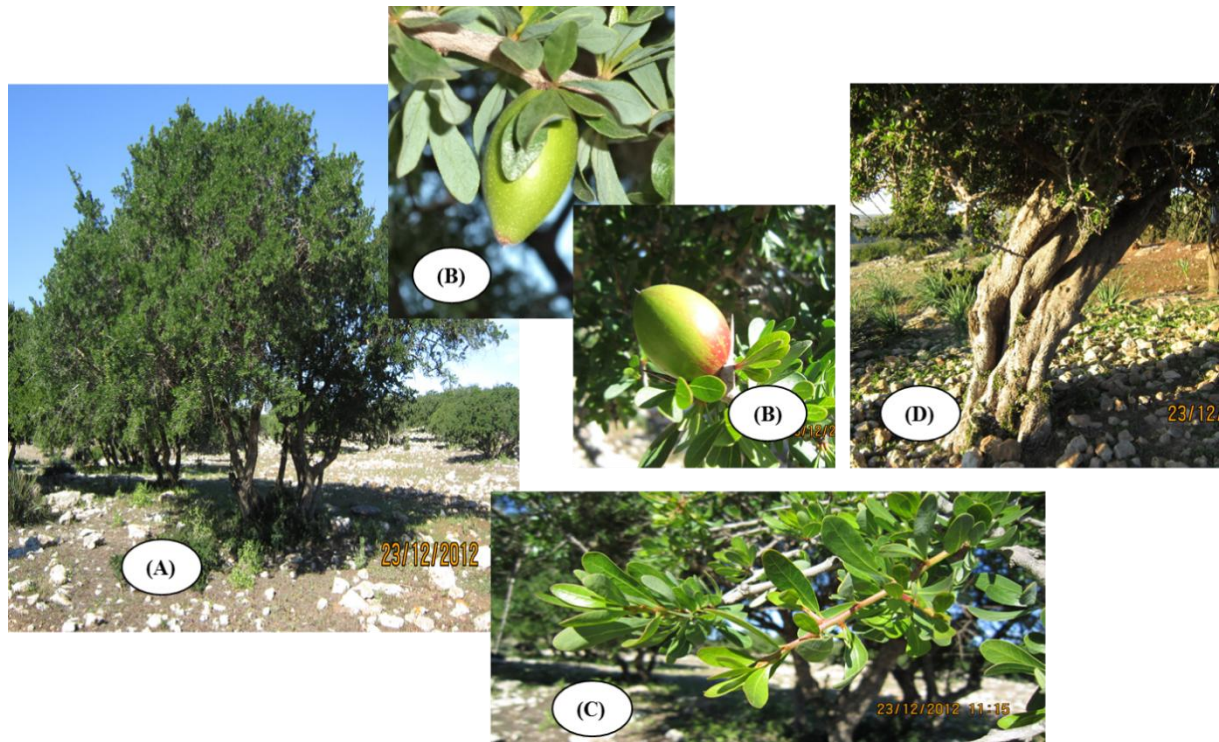


Figure 2: L'arganier (*Arganiaspinosa* L.)

(A) : Aspect de l'arbre ; (B) Aspect du fruit ; (C) Feuillage, (D) Aspect du tronc et de l'écorce

1.2. Taxonomie de l'Arganier

L'Arganier, *Argania spinosa* (L. Skeels), également appelé argan, « arbre de fer », « olivier du Maroc » est le représentant le plus septentrional d'une famille essentiellement tropicale dont plusieurs espèces représentent un grand intérêt économique d'ordre alimentaire et/ou industrielle. La classification botanique de l'arganier compte tenu de sa classification phylogénétique se décrit comme suit

Tableau 1: La classification botanique de l'arganier

Classification phylogénétique (Swenson and Anderberg, 2005)	
Règne	<i>Plantae</i>
Embranchement	<i>Phanérogames</i>
Sous_embranchement	<i>Angiospermes</i>
/Clade*	
Classe/Clade*	<i>Dicotylédones</i>
Sous classe/Clade*	<i>Gamopétales</i>
Ordre	<i>Ericales</i>
Famille	<i>Sapotaceae</i>
Genre	<i>Argania</i>
Espèce	<i>Spinosa</i>
Nom binominal	<i>Argania spinosa</i> L.

1.3. Aspect historique

Au XIII^{ème} siècle, l'arganier a été cité par IBN AL-BAYTAR dans son livre « traité des simples » qui décrit l'arbre et la technique d'extraction de l'huile et qui a été traduit par Lederer en 1877.

En 1515, El Hassane Ben Mohamed El Wazzani El Zaguti, alias Léon l'Africain, parle de l'arganier dans son livre « Description de l'Afrique » comme étant un arbre épineux qui produit un fruit duquel on extrait une huile à très mauvaise odeur servant pour l'alimentation et l'éclairage (Radi, 2003).

En 1791, Hösst mentionne l'utilisation de l'huile d'argan dans les usines de savon, en l'occurrence celle de Marseille. Dans la même année, le consul danois au Maroc Schousboe publie ses observations sur la flore marocaine et en particulier sur l'arganier. En 1801, plusieurs auteurs ont repris ses écrits et ont complété par la description de l'arbre avec plus de précisions, et ont aussi décrit le mode de l'obtention de l'huile.

En 1819, Roem et Shoult créent le genre Arganier, famille des sapotacées, un monotype qui ne comprend qu'une seule espèce, *Argania spinosa*L.(Radi, 2003)

En 1888, Cotton isole un principe actif à partir du tourteau du fruit de l'arganier et l'identifie comme un mixte de saponine et l'appelle Arginine.

Entre 1918 et 1924, les coupes charbonnières pratiquées abusivement dans l'arganeraie principalement dans la région du Mogador pour l'approvisionnement de différentes villes marocaines telles que Casablanca, Safi, Marrakech, et même en vue de l'exportation vers l'Espagne, s'intensifièrent à un tel rythme que la forêt jusqu'alors conservée tant bien que mal, fût menacée d'une éventuelle disparition.

L'exploitation dans cette zone passait de 70.000 quintaux en 1920 à presque 100.000 quintaux en 1924. Ce qui, en plus du pâturage, entraînait la disparition annuelle de près de 2.000 hectares. Déjà, une grande partie des boisements de la région Chiadma avait disparu depuis l'arrivée des Français du fait de la fabrication du charbon.

Sous l'action convergente des divers facteurs de déforestation, on peut évaluer la superficie des arganeraies détruites dans la région de Mogador depuis un siècle à 200.000 hectares environ (Boudy, 1948).

En 1924, le secteur de l'arganier est cité par Braum-Blanquet et Le Maire dans leur mémoire « les études sur la végétation et la flore marocaine ». La même année, Emberger fait connaître l'existence d'arganiers dans la haute vallée de l'Oued Grou entre Tidders et Rommani. Découvrant un autre îlot d'arganiers sur le versant du massif montagneux de BeniSnassen, pas loin d'Oujda, il précise en 1925 l'extension ancienne de l'espèce (Radi, 2003)

En 1926, Maire publie, à la suite de ses missions dans la région du Souss, un premier article sur la végétation au Sud-Ouest marocain, citant deux types d'arganeraies : Celle d'*Euphorbiaechninus* du littoral atlantique et celle de *Hesperolaburnumplatycarpum* des montagnes d'Adar-ou-amine, ébauchant ainsi la première classification d'arganeraies des plaines et des montagnes.

En 1929; Battino s'intéresse à l'huile d'argan et à d'autres produits de l'arganier, notamment l'arginine isolée par Cotton et à laquelle il prête une attention hémolytique *in vivo* et *in vitro*.

En 1938, Emberger publie « les chèvres et l'arganier ». Tandis qu'en 1965, un ingénieur des eaux et forêts démontre déjà que l'exploitation abusive et le défrichement sont les deux principaux dangers qui menacent l'arganier.

Vu l'intérêt que présente l'arganier sur le plan écologique, certains pays l'ont introduit pour enrichir leur patrimoine forestier. Le premier mérite d'acclimatation revient à la Hollande qui a testé pour la première fois, et ce depuis 1697, l'introduction de cette espèce en Europe, suivie en 1711 par l'Angleterre, en 1852 dans le sud de la France, en 1927 en Californie et actuellement en Tunisie, en Libye et en Israël semble avoir donné de bons résultats (Radi, 2003)

1.4. Distribution et aire de répartition géographique de l'arganier

L'arganier est un arbre endémique du Maroc. L'aire principale de répartition de cette plante se situe entre 29° et 32° de Latitude Nord en plus des colonies isolées au Nord du Maroc (35°N. 3°W) (Msanda et al., 2005). La plus grande concentration d'arganiers se trouve dans la région et plaine du Souss (Sud-Ouest du Maroc) où elle couvre près de 800 000 hectares, soit 14.25% de la forêt du Maroc (M'Hirit et al., 1998).

L'arganier se trouve le long du littoral océanique, depuis l'embouchure de « Oued Tensift » au Nord, jusqu'à l'embouchure de « Oued Draâ » au Sud (Figure 3). L'arganier se développe aussi dans le plain de Souss sur le versant Sud du Haut Atlas occidental et sur le versant septentrionaux et méridionaux de l'Anti-Atlas occidental jusqu'à des altitudes de 1300-1500m. Deux stations sont également signalées dans la haute vallée de « Oued Grou » au Sud-Est de Rabat (Emberger, 1924) et dans le piémont Nord-Ouest des Béni Snassèn, près de Oujda. Ces deux stations, très isolées, résultèrent d'une dispersion assez récente probablement par l'homme (El Mousadik and Petit, 1996b).

Selon le Haut-Commissariat des Eaux et Forêts et à la Lutte Contre la Désertification (HCDEFLCD), cité par (HAWA, 2007), l'espèce de l'arganier s'étale essentiellement sur le territoire des provinces d'Essaouira : 130 000ha, Agadir : 37 000ha, Chtouka Ait Baha : 90 000ha, Tiznit : 140 000ha, Taroudant : 360 000ha, et Inzeguane-Ait melloul : 13 000ha.

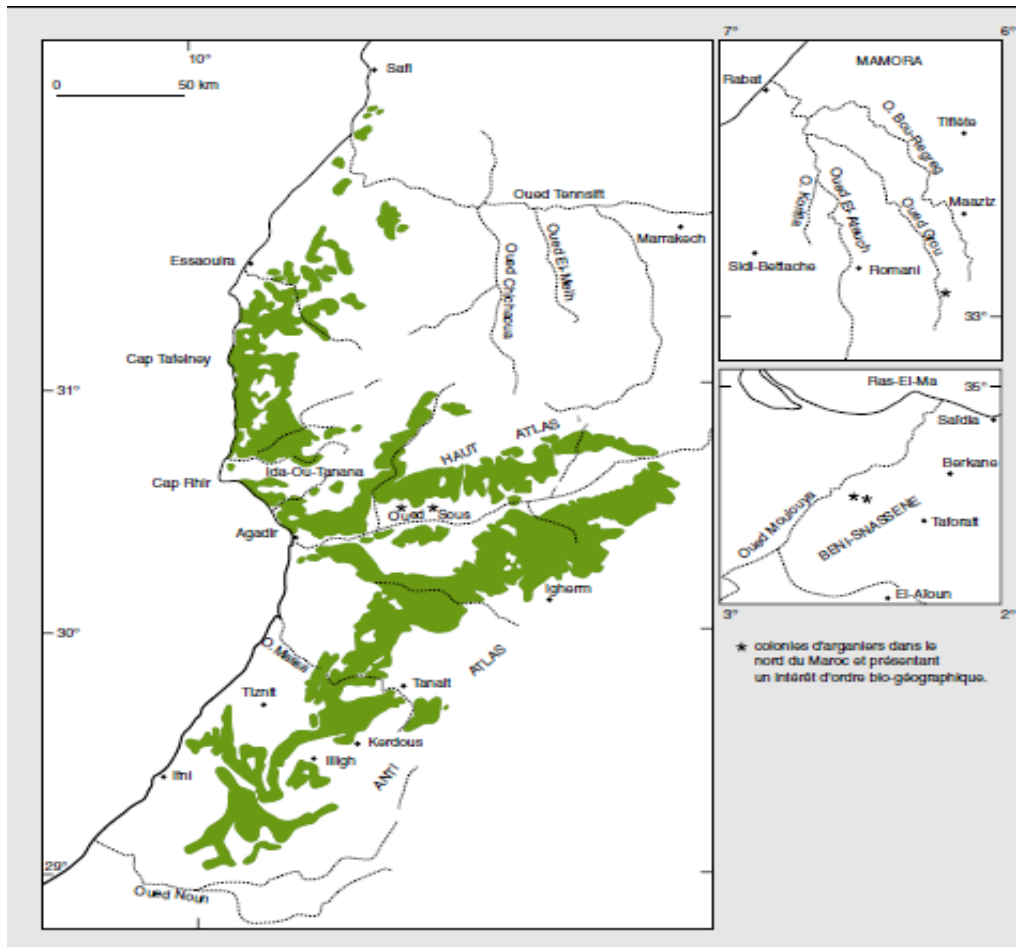


Figure 3: Aire de répartition géographique de l'arganier au Maroc (Msanda et al., 2005)

1.5. Aspect écologique de l'arganier

1.5.1. Les exigences climatiques

L'arganier est un arbre thermophile et xérophile, de bioclimat aride chaud et tempéré (le long du littoral et dans les plaines), à semi-aride chaud et tempéré (flancs du Haut Atlas et de l'Anti-Atlas), voire saharien plus au Sud (Figure 3) (Msanda et al., 2005). En pluviométrie, l'idéal pour l'arganier est une précipitation de 500 mm/an. Cependant une pluviométrie de 120 mm/an semble suffisante pour son développement dans certaines régions (Nouaim, 1994). Dans les conditions où les précipitations sont largement inférieures à 100mm/an, l'arganier ne se localise plus que le long des cours d'eau temporaires où il utilise les eaux de ruissellement (Msanda et al., 2005).

L'influence océanique adoucit le climat dans la zone d'extension de l'arganier, compensant ainsi l'aridité climatique. (Bendaanoun, 1994) révélait que les précipitations occultes ainsi que certains facteurs de compensation ont une importance primordiale pour le

développement de l'arganier; il en demeure que ces précipitations constituent un apport d'eau additif pour la végétation et atténuent les phénomènes d'évapotranspiration.

L'arganier craint le gel. En effet, il est chassé par les températures de 0°C prolongées et ne tolère des températures négatives que si elles sont de courte durée. Il ne se développe plus en dessous de l'isotherme 3,8°C (Emberger, 1960). En revanche, il supporte remarquablement bien les températures élevées. Celles-ci pouvant atteindre 50°C dans la région de Taroudant (Thierry, 1987).

En altitude, c'est le froid qui détermine la limite supérieure de l'arganier. Cette dernière se confond avec les basses neiges (Emberger, 1925), soit 900 m dans le haut Atlas (Nouaim and Chaussod, 1993) et 600m au Sud du Maroc (Peltier, 1982).

1.5.2. Les exigences édaphiques

L'arganier n'a aucune exigence vis à vis de la nature physico-chimique du substrat. Il se développe sur les substrats les plus variés à l'origine de nombreux types de sols : colluviaux, alluviaux, bruns, châtaîns, fersiallitiques, etc (El Aboudi et al., 1992; Msanda, 1993). Cependant, il ne s'accommode pas sur des sables mobiles. En effet, les racines de l'arganier en grande partie traçantes, supportent mal le décapage éolien (M'Hirit et al., 1998).

1.5.3. Les exigences écologiques

La physiologie de l'arganier n'a pas fait objet de beaucoup de travaux afin de pouvoir comprendre les mécanismes internes qui contrôlent son développement, ce qui pourrait justifier sa plasticité et sa résistance face aux stress divers.

Les travaux récents sur l'écophysiologie de l'arganier sont ceux (Bezzala, 2005; El Aboudi, 1990) qui se résument comme suit :

- L'arganier a une résistance stomatique voisine de 200 s.m⁻¹, valeur habituelle chez les arbres, qui n'est ni particulièrement faible, comparativement aux arbres feuillus des régions tempérées (+/-50 s.m⁻¹), ni particulièrement élevée comparée aux conifères ;
- Les stomates s'ouvrent et se ferment principalement sous l'action de l'éclairement caractère ordinaire des espèces végétales ;
- La transpiration diurne entraîne la chute du potentiel hydrique foliaire ;
- Le potentiel hydrique foliaire, fortement corrélé à la transpiration, peut atteindre -3,5 MPa en milieu de journée. L'arganier tolère un tel potentiel sans fermeture stomatique, en revanche, si l'on suspend l'alimentation en eau coupant des rameaux, la

fermeture des stomates est observée tandis que le potentiel hydrique foliaire tombe au-dessous de -3,5MPa ;

- Le système racinaire de l'arganier est très mal connu, en dépit de son importance pour l'alimentation en eau et en éléments minéraux de l'arbre. On sait que l'arganier possède un système racinaire de type pivotant, pouvant descendre à de grandes profondeurs. En outre, l'arbre possède un réseau dense de racines superficielles ayant une bonne capacité de renouvellement, des racines fines apparaissant après chaque épisode pluvieux. Nouaim et Perrin (1988) ont mis en évidence une symbiose racinaire de type endomycorhizienne. Cette dernière joue un rôle dans la résistance de l'arbre à la sécheresse et dans sa nutrition minérale (Reidacker et al., 1990).

1.6. Les intérêts de l'arganier

1.6.1. Intérêt socio-économique

L'arganeraie marocaine possède un statut législatif spécifique (Dahir N°1-69-169 du 4 mars 1925 et cahier des charges relatifs aux pratiques agraires sous l'arganier du 20 juillet 1983) qui fait de l'arganeraie une forêt domaniale dont le droit d'usage est dédié aux peuplements locaux de façon très étendue. Dans cette arganeraie, 1.3 million de personnes sont concernées par l'exploitation des systèmes agro-forestiers traditionnels reposant sur l'arganier (Chaussod et al., 2005).

L'arganier est un arbre « multi-usage », chaque partie ou production de l'arbre est utilisable (Figure 4). Il s'inscrit au cœur d'un système agro-sylvo-pastoral complexe dans lequel lui sont associées quatre productions majeures : l'huile tirée des noix d'argan (fruit de l'arganier), les céréales cultivées sous le couvert des arganiers, la viande de chèvres dont les troupeaux pâturent l'Arganeraie et consomment principalement feuilles, branchage et fruits d'arganier en grimant dans les arbres, et le bois d'œuvre et de feu, également fourni par ces arbres. Les produits de ce « système », ainsi que le charbon de bois principalement exploité par l'administration forestière s'inscrivent dans un rapport complexe de concurrence et de synergie (Bourbouze et al., 2005).

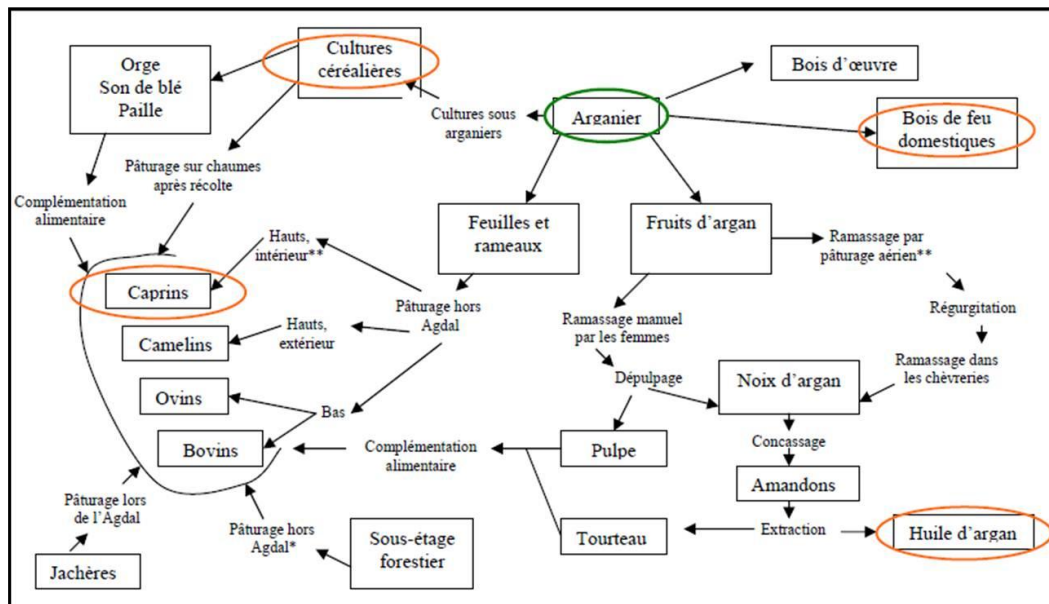


Figure 4: L'arganier au centre des quatre piliers du système agro-sylvo-pastoral local (Zugmeyer, 2006)

1.6.2. Intérêts écologique

Cet arbre a des propriétés écologiques et physiologiques et il est pratiquement le seul adapté aux régions arides et semi-arides dans lesquelles il pousse.

Dans ces zones, l'arganier est indispensable pour la conservation des sols et pâturages ainsi que pour la lutte contre la désertification. En effet, la latitude géographique de cette espèce correspond théoriquement à un climat désertique.

L'arganier est considéré dans les régions de l'extrême Sud comme une ceinture verte contre la désertification (HAWA, 2007).

Il participe aussi à la formation du sol et son enrichissement en favorisant et améliorant sa fertilité directement, par ses apports (feuilles et racines mortes) et indirectement, par la végétation qui pousse sous son abri. Bien entendu, l'arganier fournit l'ombre (effet ombrage) et du microclimat (effet litière) favorable pour le développement de nombreux organismes vivants (faune, flore et microflore), ce qui augmente considérablement la biodiversité des zones naturelles. Certains chercheurs ont inventorié jusqu'à cent variétés végétales (Chriqi et al., 2003).

1.6.3. Intérêt biologique et diététique

L'huile d'argan est riche en matières grasses du type oléique-linoléique, elle contient environ 80% d'acides gras insaturés, qui ne présentent aucun problème d'assimilation et de

digestion par l'organisme humain. La proportion des acides gras de l'huile d'argan dépasse celle du lait de la femme qui ne titre que 10% d'acide linoléique, ainsi que celle du lait de la vache, de la viande et du poisson (Chriqi et al., 2003). L'acide linoléique, bien représenté (environ 34%), intervient dans la biosynthèse des prostaglandines, hormones régulatrices des échanges membranaires qui jouent un rôle prépondérant dans la perméabilité de l'épiderme (Charrouf and Guillaume, 1999).

1.7. Contraintes affectant l'arganier au Maroc

Malgré tous ses intérêts, l'arganeraie a régressé en surface et en densité depuis le XIX^{ème} siècle (Bellefontaine et al., 2010). On estime que 600 ha sont perdus par an au niveau de la forêt d'Admine (El Yousfi, 1988). Cette régression résulte essentiellement de l'absence de la régénération et de perte d'arbres, qui dépend elle-même de facteurs biophysiques et des pressions anthropiques (Bellefontaine et al., 2010).

Le pâturage excessif par les caprins et les camelins endommage les arbres ce qui peut aussi endommager le sol et causer son érosion (M'Hirit et al., 1998). Le recul des surfaces de l'arganeraie résulte aussi de la faible voir même l'absence de la régénération naturelle. Les jeunes plantules, issues de graines qui échappent à la récolte, sont systématiquement broutées par les animaux (Bousselmame et al., 2001; M'Hirit et al., 1998). La régression s'est accélérée également avec les extensions urbaines, l'exploitation abusive du bois et le développement rapide de l'agriculture moderne surtout en zones de plaine.

Dans les plaines, la mise en culture irriguée des forêts d'arganiers a connu une expansion intense depuis les années 1970, qui a conduit à l'installation anarchique de serres, de cultures diverses et de forages profonds. Le passage des tracteurs exige un élagage des branches basses et provoque le sectionnement des racines traçantes. Ces arbres mutilés sont souvent dès lors condamnés à brève échéance, d'autant plus que la nappe phréatique s'abaisse dangereusement (Alifriqui, 2004; Faouzi, 2005).

Les récoltes de bois ne sont légalement autorisées que lorsque l'arbre est mort et tombé naturellement, mais des coupes illégales accélèrent également la disparition de l'arganeraie

Le vieillissement des peuplements, l'épuisement des souches et l'extension de l'urbanisation, des aménagements et équipements divers des villes et villages aux dépens de l'arganeraie réduisent la superficie ou la densité d'arganiers (Faouzi, 2005; M'hirit and Blerot, 1999)

De plus, l'engouement croissant à l'échelle internationale pour l'huile d'argan, à des fins alimentaires, cosmétiques ou médicinales, a entraîné, sous l'emprise des mouvements coopératifs et associatifs locaux, une très forte augmentation des récoltes de fruits qui sont pratiquement tous ramassés en laissant que très peu de graines aptes à assurer la régénération naturelle (M'Hirit et al., 1998).

Egalement, la faible implication des populations rurales en ce qui concerne la gestion des périmètres plantés et la gestion du patrimoine forestier appartenant à l'État, surtout lorsqu'après une exploitation du bois, la mise en défens du périmètre est programmée sur 6 à 18 années (Faouzi, 2006), est un obstacle important à la conservation des arganeraies.

Enfin, la diminution constante des pluies depuis plusieurs années contribue au dépérissement des arganiers en réduisant la capacité à se régénérer naturellement par graine et la survie des pousses. Un stress hydrique excessif peut augmenter la mortalité des arbres, particulièrement ceux qui se situent sur les pentes fortes et qui sont fortement exposés au soleil (Zine El Abidine, 2003). L'augmentation de l'aridité peut être due à un changement de cycle climatique, ou à des changements dans les conditions microclimatiques induits par la diminution du couvert forestier et de la végétation au sol (M'Hirit *et al.*, 1998; Nouaim, 2005). Les périodes de sécheresse peuvent aussi augmenter la pression du pâturage sur les ressources existantes

2. Les marqueurs génétiques utilisés dans l'estimation de la diversité et leur intérêt.

La diversité génétique est le résultat de plusieurs phénomènes tels que la sélection, les mutations, la migration et la dérive génétique. Ces forces évolutives ont toutes des effets sur l'importance et l'organisation de la diversité génétique. Les effets de ces forces portent sur l'ampleur et l'organisation du polymorphisme : la mutation et la migration augmentent la diversité alors que la sélection et la dérive la diminuent. L'utilisation de la diversité génétique dans le but de la conservation de la diversité est une étape qui passe inévitablement par l'estimation et par le choix du type de marqueur susceptible de la traduire le plus fidèlement possible. Les marqueurs génétiques sont des caractéristiques héréditaires qui renseignent sur le génotype de l'individu qui les porte (Vienne, 1998)(de Vienne 1998). Trois types sont fréquemment utilisés pour l'évaluation de la variabilité génétique, à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs de l'ADN.

2.1. Les marqueurs morphologiques

Les caractéristiques morphologiques constituent un outil incontournable dans la classification et la taxonomie des organismes et continuent, à nos jours, d'être utilisées (Stuessy, 2009). Ce sont les premiers marqueurs utilisés. Il s'agit de loci affectant le polymorphisme visible (sous-entendu visible à l'œil nu) : gènes de coloration, de nanisme, de l'albinisme, ... etc.

Les caractères morphologiques sont généralement quantitatifs et ont un déterminisme mono et polygénique. Toutefois, ils peuvent être influencés par des facteurs environnementaux et comprennent d'une part des mesures biométriques portant sur la plante (taille et formes des gousses, des feuilles, longueurs d'inflorescences, nombre de fleurs...) et d'autre part des données qualitatives comme la couleur du fruit, le taux de graines (Ait Abd et al., 2011; Batlle and Tous, 1997). Ces critères sont généralement utilisés pour décrire et identifier les lignées et les variétés chez les végétaux. Cependant, ces marqueurs sont peu polymorphes et en général dominants. Ils ont fréquemment une base génétique complexe, sont limités en nombre et leur expression est souvent fortement influencée par l'environnement.

2.2. Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques sont le résultat de l'expression des gènes. Ce type de marqueurs est fréquemment employé dans la recherche des génotypes résistants à des conditions de stress biotique ou abiotique. Ainsi, plusieurs méthodes sont utilisées selon les produits recherchés. Les marqueurs biochimiques, généralement des isoenzymes ou des protéines de réserves, ont un pouvoir discriminant plus élevé que les marqueurs morphologiques, traduisant directement l'activité des gènes. Ils sont neutres et peuvent être révélés dans plusieurs organes à différents stades de développement (van der Bank et al., 2001; Buth and Murphy, 1999). Ces marqueurs sont généralement mis en évidence par électrophorèse, sur la base des propriétés de migration des protéines, et révélés par la coloration histochimique spécifique des enzymes analysées. Les protéines ont l'avantage d'être plus nombreuses que les marqueurs morphologiques, mais ils dépendent de l'organe considéré (Vienne, 1998).

Les principales limitations de ces marqueurs sont le faible nombre de locus susceptibles d'être révélés, et aussi le fait qu'ils sont influencés par l'environnement tout comme les marqueurs morphologiques.

2.3. Les marqueurs moléculaires

L'utilisation de ces marqueurs est basée sur la notion du bon marqueur moléculaire qui doit être: Polymorphe, co-dominant, non épistatique et indépendant du milieu. Le choix d'un bon marqueur par le chercheur est aussi basé sur la technicité et le coût de l'expérience qui doivent être abordables en vue d'une manipulation à grande échelle.

Les marqueurs moléculaires ont été largement utilisés chez les animaux et les plantes pour des études de base ainsi qu'appliquées. L'une des utilisations majeures des marqueurs moléculaires étant l'élaboration physique et génétique des cartes chromosomiques. Ces marqueurs ont contribué aux travaux d'amélioration des plantes (Lefort-Buson et al., 1990b, 1990a) en assurant une sélection indirecte moyennant des marqueurs moléculaires liés à des caractères d'intérêt ou quantitative traits loci (QTL). Ces marqueurs présentent l'avantage d'être indépendants à l'environnement d'où la possibilité de les caractériser à différents stades de développement de la plante.

Aussi, ces marqueurs ont été adoptés pour plusieurs études de génétique des populations et d'écologie (Haig, 1998) permettant l'analyse des niveaux de la diversité et de sa structuration ainsi que l'élaboration d'hypothèses sur le flux des gènes et la sélection des espèces. Les marqueurs moléculaires sont actuellement très utilisés pour la caractérisation des germoplasms et l'identification génétique des espèces en particulier dans le but de la conservation.

3. Les marqueurs moléculaires employés chez l'arganier

3.1. Les marqueurs RFLP

De l'anglais *Restriction Fragment Length Polymorphism* ou le polymorphisme de longueur des fragments de restrictions sont des marqueurs qui permettent une analyse directe du génotype. C'est une technique basée principalement sur la détection de la variabilité de la taille de séquences nucléotidiques du génome, résultant de la digestion enzymatique et révélés par une sonde marquée (ADNc, séquence enzymatique, séquence clonée...)(Beckmann and Soller, 1986) (Figure 5).

Les mutations dans le génome entraînent la modification de certains sites de restriction d'où la génération de différents profils de restriction entre différents échantillons. Chaque fragment, de taille différente engendré, est considéré comme un allèle et peut être utilisé en analyse génétique.

Les RFLP sont les premiers marqueurs moléculaires développés et ayant été utilisés en 1980 dans la construction de la carte génétique humaine (Botstein et al., 1980). Quelques années plus tard, ils ont été adoptés pour la cartographie du génome végétale (Helentjaris et al., 1986) et précisément celui du blé. Quelques années plus tard, ces marqueurs sont adoptés pour la cartographie du génome végétal (Helentjaris et al., 1986) et particulièrement celui du blé *Triticum aestivum* L. (Chao et al., 1989; Nelson et al., 1995) et *Aegilops tauschii* (Lagudah et al., 1991).

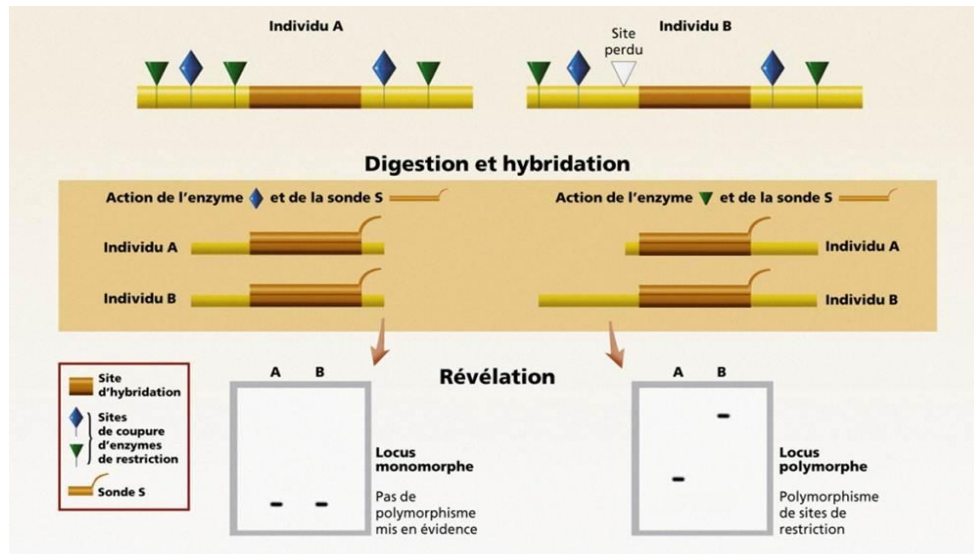


Figure 5: Polymorphisme révélé par des marqueurs RFLP (GNIS, 1999)

3.2. Les marqueurs RAPD

« *Random Amplified Polimorphic DNA* » ou amplification par PCR de séquences inconnues en utilisant une seule amorce (primer) est une technique basée sur la PCR « *Polymerase Chain Reaction* » ou amplification en chaîne de l'ADN. La PCR est une synthèse de l'ADN *in vitro*, c'est à dire que de petites quantités d'ADN sont amplifiées par hybridation de régions spécifiques de la molécule d'ADN avec des amorces dont la séquence est connue (McPherson, 1991)(Figure 6).

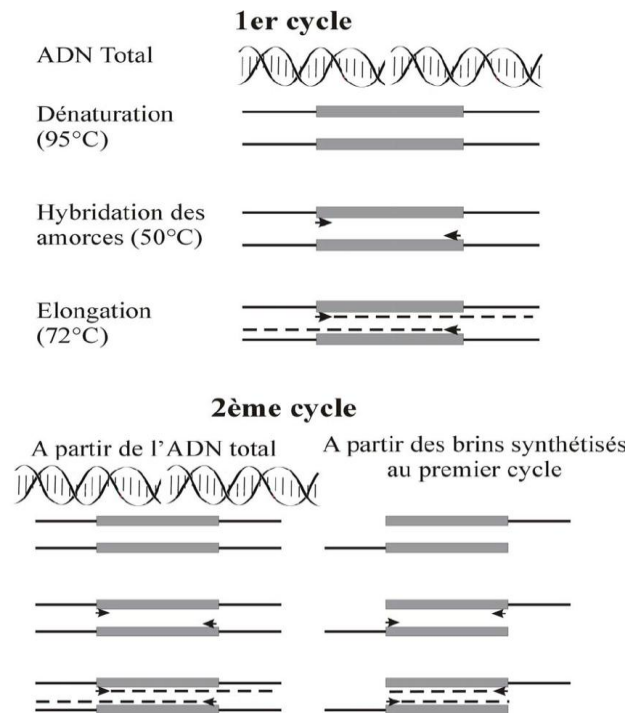


Figure 6: Principe de la PCR

La technique RAPD implique l'utilisation d'une amorce constituée d'un oligonucléotide court, le plus souvent de 10 bases de séquence arbitraire, de façon à amorcer l'amplification de fragments par la PCR. Les fragments sont séparés sur des gels d'agarose ou de polyacrylamide par électrophorèse et finalement colorés par exemple avec du bromure d'éthidium qu'on peut visionner sous rayon UV (Nanson, 2004). L'amplification a lieu au hasard dans le génome, permettant ainsi d'avoir une sorte d'empreinte digitale de celui-ci avec une dizaine d'amorces. Elle a donc des applications pour l'identification des individus, voire des peuplements et l'étude de leur polymorphisme.

Sur le plan génétique, la technique RAPD ne fournit pas de marqueurs spécifiques de locus. Elle révèle conjointement plusieurs locus qui ne sont pas nécessairement conservés lorsqu'on change de fond génétique. En effet, cette technique permet de révéler un polymorphisme de présence/absence. Ainsi, pour un locus donné, il n'y a pas d'amplification du fragment.

La technique RAPD jouit d'une grande popularité auprès des généticiens dans le domaine végétal. En effet, elle délivre en principe un nombre illimité de marqueurs. N'exigeant pas d'isotopes radioactifs, ni le « *Southern blotting* », ni le développement d'amorces propres à chaque espèce, elle est plus simple et rapide et surtout beaucoup moins coûteuse que celle de RFLP. Elle ne nécessite non plus qu'une petite quantité de l'ADN.

Cependant, elle reste beaucoup plus chère que les izoenzymes. De plus, ne pouvant détecter que des gènes dominants, elle ne permet pas d'établir la structure d'une accession, notamment sa proportion hybride (Figure 7).

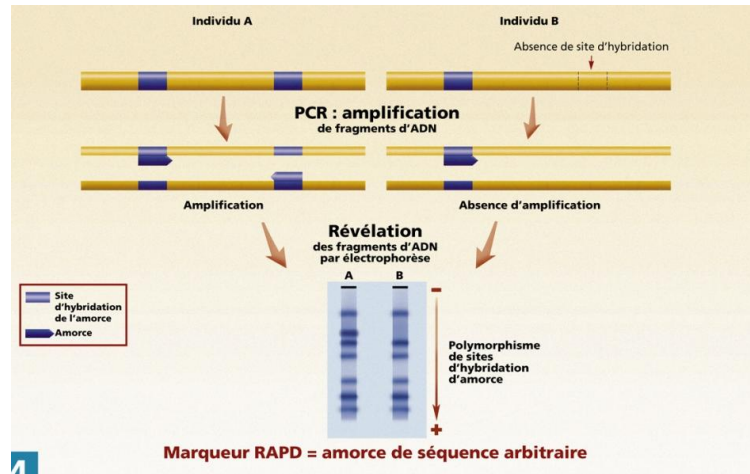


Figure 7: Polymorphisme révélé par des marqueurs RAPD (GNIS, 1999)

3.3. Les marqueurs AFLP

Amplified Fragment Length Polymorphism ou (Polymorphisme de Longueur des Fragments Amplifiés) sont des marqueurs bialléliques dominants qui mettent en évidence un polymorphisme de site de restriction et un polymorphisme d'hybridation d'amorces arbitraires. Ils sont reproductibles et révèlent un grand nombre de locus, régulièrement répartis sur le génome et très polymorphes. La technique AFLP a été mise en évidence en 1995 (Vos et al., 1995). Elle est liée à la technique RFLP et basée sur une amplification sélective de fragments de restriction obtenus par digestion d'ADN génomique.

Le principe de cette technique repose sur trois phases successives : une digestion-ligation, une amplification pré-sélective et une amplification sélective.

Les ADN génomiques sont d'abord doublement digérés par des endonucléases et les fragments obtenus sont soumis à une ligation avec des adaptateurs spécifiques. Les produits de la ligation sont ensuite amplifiés sélectivement moyennant des amorces complémentaires aux adaptateurs utilisés. Les produits de la PCR sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturé et révélés par radiographie ou nitrate d'argent (Figure 8).

L'inconvénient des AFLP, c'est qu'ils montrent un mode dominant d'hérédité, ce qui réduit leur pouvoir lors des analyses génétiques de la population sur la diversité interraciales et la consanguinité. Cependant, ils restent très informatifs et permettant de révéler jusqu'à 16 fois plus de *loci* que les marqueurs RFLP. Ils ont été largement utilisés pour la détection du

polymorphisme génétique et la détermination des liaisons en analysant des individus de populations isolées (Sbabou et al., 2010).

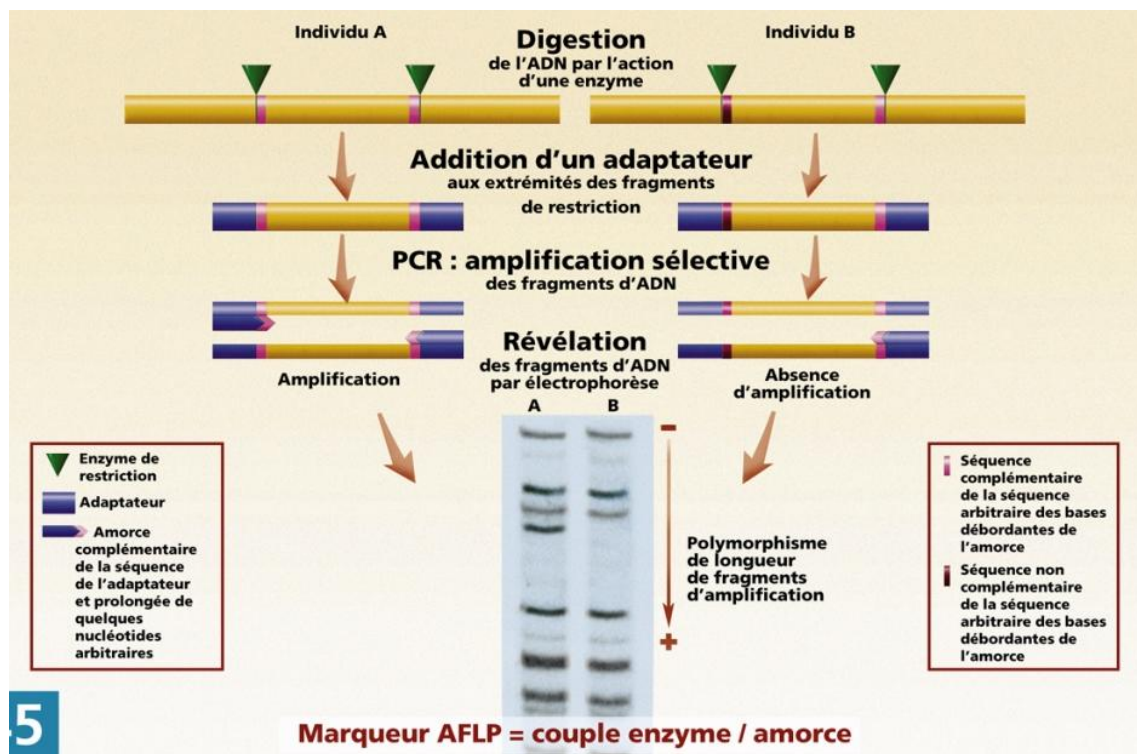


Figure 8: Polymorphisme révélé par es marqueurs RAPD (GNIS, 1999)

3.4. Les marqueurs SSR

La découverte dans le génome nucléaire de nombreuses zones hypervariables a ouvert la voie au développement de nouveaux marqueurs pour la cartographie du génome humain. Ces zones sont appelées microsatellites ou séquences répétées en tandem ou SSR (Simple Sequence Repeats)(Tautz, 1989). Les microsatellites sont constitués de répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri-, ou tétra-nucléotidiques sur une longueur inférieure à 100 paires de bases(Tautz, 1989). De tels motifs sont très nombreux dans le génome des organismes eucaryotes. Les SSR présentent un taux de polymorphisme extrêmement élevé qui repose sur la variation du nombre d'unités de répétition (n) constituant le microsatellite. Comme l'illustre la figure 9, chaque locus microsatellite est encadré par des séquences qui lui sont spécifiques (en bleu) et qui permettent son amplification par PCR.L'analyse des produits amplifiés s'effectue sur gel de polyacrylamide et le polymorphisme entre les individus se traduit par une différence de taille des allèles. Un individu B, possédant plus de copies du motif répété

(rectangles rouges) que l'individu A, produira un amplicon de taille supérieure qui migrera plus lentement que l'amplicon obtenu pour l'individu A(Nanson, 2004).

Les avantages de ces marqueurs sont leur abondance et leur répartition sur tout le génome, leur haut degré de polymorphisme, leur nature multiallélique et leur codominance qui sont à la base de la PCR. Leur analyse est facilement automatisable et ils ne requiert pas de grandes quantités de l'ADN, et n'exigent pas de marquage radioactif.

Les inconvénients sont principalement la nécessité de disposer de gel à haute résolution et de visualiser la présence/absence des bandes. Les SSRs sont ainsi à l'origine de la plupart des cartes génétiques actuelles. Et sont aussi utilisées par (Kramer and Petit, 1993) pour l'étude de l'introgression entre les 2 chênes européens principaux : *Quercus robur*L.et *Quercus petraea*L.. Egalement, ces marqueurs se sont révélés très utiles dans la sélection par marqueurs et l'analyse de la génétique des populations chez plusieurs espèces (Abdul Kareem et al., 2012; Jia, 2016; Lopes et al., 2014).

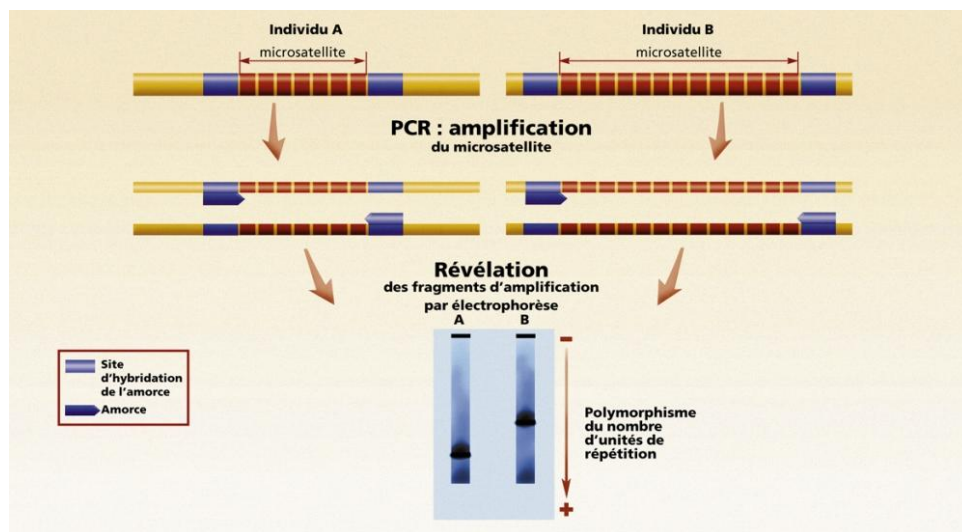


Figure 9: Polymorphisme révélé par les marqueurs SSR (Gnis, 1999)

3.5. Les marqueurs ISSR

La technique dite ISSR (Internal simple sequence repeat) consiste en une amplification à l'aide d'une amorce unique des fragments compris entre des microsatellites de même séquence mais en conformation inverse (Zietkiewicz et al., 1994). Les amorces utilisées sont un motif répété complémentaire de la séquence d'un brin microsatellite, et de résidus nucléotidiques ancrés en 5' ou 3'(Figure 10). Les résidus nucléotidiques ou bases arbitraires s'hybrident aux régions flanquantes des microsatellites. Le polymorphisme entre

les individus peut ainsi résulter d'insertions ou de délétion dans les régions entre microsatellites adjacentes. Des modifications de séquences de ces mêmes microsatellites ou des régions flanquantes peuvent aussi empêcher la fixation de l'amorce et créer des différences de profils entre les individus (Figure 10). La technique ISSR génère des marqueurs dominants, c'est-à-dire ne différencie pas les homozygotes des hétérozygotes, au contraire des marqueurs co-dominants. Malgré cela, ils présentent l'avantage de donner un grand nombre d'allèles polymorphes. Leur mise en œuvre est également relativement facile, et ne nécessite pas de connaissance préalable du génome.

Les marqueurs ISSR ont été largement et diversement appliqués dans le marquage, le développement et l'analyse de fréquence des motifs microsatellites (Kim et al., 2005; Van Der Nest et al., 2000), dans la caractérisation de germplasm (Charters et al., 1996; Gilbert et al., 1999; Kurokawa et al., 2003). Aussi, ils ont été utilisés dans la cartographie génétique et pour le marquage de gènes d'intérêt (Gupta et al., 2013). Egalement, les ISSR ont leur place dans les études de la structure génétique des populations ainsi que l'analyse de la diversité génétique interspécifique (Abdul Kareem et al., 2012; Barth et al., 2002; Bettencourt et al., 2015; Charters et al., 1996; Liu and Wendel, 2001; Liu et al., 2013; Sica et al., 2005).

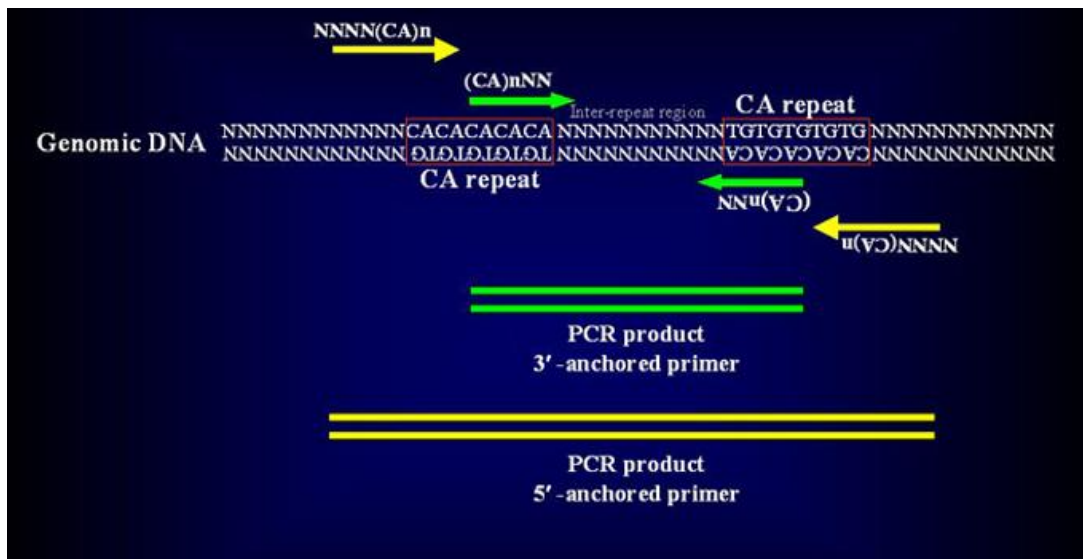


Figure 10: Principe des ISSR

Amplification des ISSR en utilisant des amorces ancrées 5' et 3' pour des répétitions CA. Les flèches indiquent les amorces et les doubles lignes indiquent les produits d'amplification

4. Apports des méthodes et outils de la génétique

La génétique des populations essaie d'étudier chez les êtres vivants la structure génétique et sa variation éventuelle d'une génération à l'autre sous la façon dont se fusionnent les gamètes d'une part et sous l'action de divers phénomènes tels que mutation, migration, sélection naturelle d'autre part. Dans le cadre de la gestion des ressources phytogénétiques, la connaissance des patrimoines génétiques à partir de ces outils de la génétique avance la stratégie de gestion. Pour le cas de la forêt qui constitue une grande accession d'arbres, la stratégie de conservation et d'amélioration des arbres sont basés surtout sur la connaissance des ressources existantes tant au niveau quantitatif mais surtout qualitatif sur le plan génétique. Dans le programme de gestion et protection, la diversité génétique est reconnue comme une information fondamentale en vue de la mise au point de stratégies de conservation (Newton et al., 1999).

Depuis une vingtaine d'années, le développement des techniques de marqueurs moléculaires rend plus précise l'étude de la diversité génétique des espèces. Actuellement, les marqueurs génétiques sont largement utilisés pour estimer le polymorphisme et prédire l'évolution des populations végétales. L'avancée dans la connaissance du génome des plantes a favorisé le développement de marqueurs moléculaires ciblant une région de l'un des génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial. Le développement de la génomique donne accès aux gènes contrôlant des caractères adaptatifs, très importants pour la gestion des ressources génétiques. La recherche de marqueurs moléculaires aide aussi le sélectionneur à mieux connaître la génétique des caractères importants afin d'optimiser l'efficacité des programmes de sélection. Ces marqueurs sont en effet très précieux car ils permettent de tester rapidement les variétés et de retenir celles qui possèdent les caractéristiques recherchées.

5. Apport des marqueurs génétique chez l'arganier

Dans le cas d'*Argania spinosa* L. et à terme, les études menées avaient pour objectif une caractérisation de la diversité génétique via :

- Les marqueurs biochimiques : Les premières données sur la diversité chez l'arganier sont celles obtenues via les isoenzymes par (Mousadik and Petit, 1996) et ce en se basant sur la richesse allélique chez les populations d'arganier. L'étude a concerné 10 populations avec 20 à 50 individus en utilisant 9 marqueurs iso-enzymatiques polymorphes et a démontré que l'espèce possède un niveau de diversité élevé.

- Les marqueurs morphologiques : une variabilité a été observée chez 30 échantillons étudiés de 3 populations différentes. Les feuilles et les fruits présentent différents aspects architecturaux (dressé ou pleureuse, ramification moins épineuses à très épineuses...). La pollinisation est entomophile avec un mode de reproduction allogame à 60% (Bani-Aameur et al., 1999a). L'arganier est caractérisé aussi par une période de floraison, une fertilité de pollen et une différente réceptivité de stigmates selon les individus échantillonnés, l'historique climatique, et leurs origines géographiques (Bani-Aameur, 2001).
- Les marqueurs moléculaires : peu d'études ont été menées sur l'arganier. En 1996, Mousadik et Petitont étudié le polymorphisme du génome chloroplastique des populations d'arganier à l'aide de la techniques PCR- RFLP déduisant que la diversité chloroplastique totale réside entre les populations. Egalement, un niveau élevé de différenciation génétique a été observé chez les plants élevés en pépinières selon les différentes origines géographiques.

En utilisant les RAPD ; Bani-Aameur et Benlahbil (2004) ont révélé également une grande diversité génétique chez cette espèce et ce dans une dizaine d'arbres d'arganier. Dans le même sens, (Majourhat et al., 2008) utilisant 19 marqueurs RAPD et 20 marqueurs SSR non spécifiques démontrent une grande variabilité génétique au sein des 38 accessions d'arganier. Plus tard, (El Bahloul et al., 2014) ont développé des marqueurs SSR spécifiques à *Argania spinosa* L. et qui ont servi au génotypage de 150 arbres échantillonnés de 8 populations éloignées.

6. Description et méthode d'analyse de la diversité génétique

Il est aujourd'hui indispensable de veiller au maintien d'une ressource génétique suffisamment large afin de garantir l'adaptation aux changements environnementaux et pour répondre aux besoins de l'homme. Ainsi, l'information génétique est devenue un outil important en biologie de la conservation, au même titre que les considérations écologiques, éthiques, économiques voir politiques.

Afin de maintenir la diversité interspécifique, il est nécessaire de connaître et bien appréhender la diversité à l'intérieur et entre les populations.

Parmi les objectifs principaux de la génétique des populations est l'étude de la distribution de la variation génétique au sein et entre les populations. Plusieurs approches se sont développées afin d'évaluer la structuration géographique de cette variation.

6.1. Paramètres de la diversité et de différenciation génétique

6.1.1. Expression de la diversité au niveau intra-spécifique

Au niveau allélique, trois paramètres de diversité sont couramment utilisés :

- **Pourcentage de locus polymorphe (P%)**

Le taux de polymorphisme est facile à calculer, mais son intérêt est limité puisqu'il ne peut pas être traité différemment les gènes très ou peu polymorphes : $\%P = (NBP \cdot 100) / NBT$
NBP : nombre de bandes polymorphes ; NBT : nombre de bandes totales.

- **Nombre moyen d'allèles par locus (A_r)**

Le nombre moyen d'allèle par locus est appelé également la richesse allélique. Il est défini comme suit : pour n_i allèles au locus i et pour L locus nous avons la relation suivante :

$$A_r = (1/L) \sum n_i \dots$$

- **La diversité génétique de Nei :**

La mesure de diversité de Nei (1973) exprime la probabilité pour que deux variantes tirées au hasard dans une population soient différentes. Considérons une population subdivisée en un grand nombre de populations (k) dans laquelle i allèles sont en ségrégation : p_i est la fréquence de l'allèle i dans la population générale et p_{ki} est la fréquence de l'allèle i dans la population k .

La diversité à l'intérieur d'une population est définie par : h_k

$$h_k = 1 - \sum_i p_{ki}^2$$

La diversité moyenne au sein des populations est définie par : h_s

$h_s = 1 - \sum_i \overline{p_i^2}$ avec $\overline{p_i^2}$ la moyenne sur les k populations des carrés des fréquences de l'allèles i .

La diversité totale est définie par : h_T

$h_T = 1 - \sum_i p_i^2$ avec p_i^2 la moyenne pondérée de la fréquence de l'allèle i dans les k populations.

6.1.2. Paramètre de la diversité génétique au niveau interpopulations

- **Paramètre de différenciation génétique**

Egalement, Wright (1965; 1978) a défini l'indice **Fst** (variance standardisé) comme l'hétérogénéité des fréquences alléliques entre subdivisions d'une population. Il représente la corrélation entre allèles à l'intérieur d'une sous population par rapport à l'ensemble des sous-populations. Ce paramètre est utilisé d'une façon hiérarchique ; soit t un ensemble formé de s populations, et chaque population étant composé de i individus. La différenciation des populations par rapport au total (**Fst**) est calculé en fonction des **Fis** (différenciation des individus à l'intérieurs des populations) et **Fit** (différenciation des individus par rapport au total) ils sont liés par la relation suivante : **Fst = 1 - [(1-Fit)/ (1-Fis)]**. Et dans la littérature, le **Fst** est souvent remplacé par un paramètre qui lui est analogue, le **Gst** (Nei, 1973; 1977).

La différenciation entre les populations et définie par : G_{ST}

$$G_{ST} = \frac{h_T - h_S}{h_T} = 1 - \frac{h_S}{h_T}$$

- **Quantification du flux génique**

Pour quantifier l'importance des flux de gènes entre les populations, on calcul de nombre de migrants par génération (**Nm**) ; où **N** est l'effectif efficace de la population et **m** est le taux de migration et se calcule par la relation suivante (Slatkin, 1987) :

$$N_m = \frac{(1 - G_{ST})}{4G_{ST}}$$

Et l'expression corrigé en introduisant le nombre n (nombre de populations) et devient :

$$N_m = \frac{(1 - G_{ST})}{4G_{ST} [n/(1 - n)]^2}$$

Et plus la valeur de Nm est supérieur à 1, plus l'échange de gènes entre les populations est important.

- **Distance génétique (D)**

Sur la base des fréquences alléliques, on peut mesurer le degré de ressemblance et/ou de dissemblance entre les populations. Les distances génétiques peuvent être classées en distance probabilistes et topologiques (Lefort-Buson and Vienne, 1985).

Nous avons utilisé l'estimation non biaisé de la distance de Nei (1978). Et ceci est utilisé sur les marqueurs nucléaires, ce qui permet de comparer nos résultats avec les données de la littérature. Pour cela, on calcule d'abord l'indice d'identité génétique de Nei : prenons un locus donné, où x_i est la fréquence du i ème allèle dans la population X. la probabilité d'identité de deux allèles pris au hasard à ce locus est $J_x = \sum x_i^2$. de même pour la population Y, où y_i est la fréquence du i ème allèles, cette probabilité est $J_y = \sum y_i^2$. Il importe de noter que pour Nei des allèles identiques descendent forcément du même ancêtre, ce qui ramène J_x et J_y à des coefficients de consanguinité de leur population respective.

De la même façon, la probabilité d'identité de deux allèles pris au hasard, l'un dans la population X et l'autre dans la population Y, est $J_{xy} = \sum x_i y_i$. Ces probabilités sont reliées en divisant le coefficient de parenté par le produit des coefficients de consanguinité du locus considéré : $I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$ et $D = -\text{Log} I$ (Dans le cas de plusieurs locus on calcule la moyenne des probabilités) Afin de pallier le biais dû à l'échantillonnage, Nei (1978) a introduit l'effectif n de chaque population, et l'estimation corrigée de la distance D quelque soit l'effectif soumis devient le cologarithme de la formule suivante :

$$D = -\log(J_{XY} / \left[\frac{1}{l \sum \left(2n_x J_x - \frac{1}{2n_x} - 1 \right) \left(2n_y J_y - \frac{1}{2n_y} - 1 \right)} \right]^{1/2}$$

(l : nombre de locus).

6.2. Analyse de la structure de la diversité

Les divers paramètres cités, de par leur aptitude à décrire la diversité de manière hiérarchisée, renseignent sur la distribution de la diversité au sein et entre les populations, mais non sur son organisation spatiale.

De là, d'autres méthodes sont utilisées et prennent en compte les dépendances spatiales entre populations:

- Les méthodes statistiques spatiales développées par les géologues, permettent de prendre en compte la structuration géographique des paramètres étudiés (Corre et al., 1997; Petit et al., 1997). L'outil de description et de modélisation de ces structures spatiales est la géostatistique (Matheron, 1965).

-Des approches similaires ont été introduites en biologie, avec le développement de l'autocorrélation spatiale (Sokal and Oden, 1978). Les mesures de corrélations permettent de mettre en évidence les relations entre un paramètre génétique et une variable géographique (relation entre la distance génétique et la distance géographique ; (Kim et al., 2005). Ainsi, le test de (Mantel, 1967) permet notamment de tester l'association entre la distance génétique et la distance géographique en randomisant les échantillons (Dumolin-Lapègue et al., 1997).

7. Conservation des ressources génétiques

Face à la dégradation rapide des ressources génétiques, les efforts de conservations ont commencé à l'échelle mondiale dans les années 50. La diversité génétique est une composante essentielle de la biodiversité. Elle décrit la variabilité des gènes entre ou à l'intérieur des espèces et de leurs populations. Cette diversité est le résultat d'un processus évolutif complexe où plusieurs facteurs interviennent, notamment, la sélection naturelle les changements démographiques (extension, extinction et dérive) ainsi que les flux génique intra et interspécifiques.

L'intérêt actuel porté à la biodiversité montre à quel point il est nécessaire de veiller au maintien d'une ressource génétique suffisamment large pour garantir l'adaptation des organismes face aux changements environnementaux directs (les exploitations forestières et les changements d'usage des terres par exemple) et indirects sur le long terme (changements climatiques globaux). En effet, cette diversité génétique est très importante car elle représente le support de base sur lequel peut agir la sélection.

De là une préservation de ces ressources est un moyen d'assurer que ces derniers restent à la disposition des générations actuelle et futures. Donc une fois, ces ressources sont identifiées et caractérisées, deux approches de conservations majeurs peuvent être adoptées, soit l'approche *in situ* soit l'approche *exsitu*.

7.1. La conservation *in situ*

Il s'agit d'une conservation des espèces dans leurs milieux naturels et concerne surtout les espèces en voie d'extinction. L'objectif de la conservation *in situ* est, d'une part, la conservation des ressources génétiques au sens pur, car elle se justifie par la prise en compte de la composante évolutive dans la conservation des ressources génétique. Et d'autre part, la

gestion des écosystèmes naturels et agricoles, étant donné qu'elle exploite la dynamique des milieux naturels et cultivés dans le but de préserver les environnements eux-mêmes.

L'avantage de la conservation *in situ* par rapport à la conservation *ex situ* est qu'elle maintient la restauration des populations dans le milieu même où se sont développés leurs caractères distinctifs et dans lequel elles peuvent continuer d'évoluer avec leurs prédateurs et leurs parasites.

Deux stratégies de conservation sont principalement adoptées dans la conservation *in situ*, il s'agit de *on-farm* conservation et les réserves naturelles.

7.1.1. *On-farm* conservation

Comme son nom l'indique, il s'agit d'une conservation à la ferme et qui vise l'entretien durable des variétés locales (lignées, populations) en les cultivant conformément aux conditions environnementales. Il s'agit d'une conservation *in situ* des ressources génétiques cultivées. En outre, en utilisant des technologies de plus en plus proches des conditions dans lesquelles ces plantes ont vu le jour et ont évolué. Cette conservation dynamique permet le développement et le suivi évolutif des espèces sous l'influence de l'environnement régional et des technologies utilisées (Holubec et al., 2010).

La dite "*On-farm* Conservation", est une stratégie qui concerne à la fois les principales variétés traditionnelles cultivées et des variétés locales de plantes mineures qui maintiennent d'inévitables introgressions avec les variétés sauvages et mauvaises herbes apparentées environnantes (Maxted et al., 2002).

7.1.2. Les réserves naturelles

Une réserve naturelle est une partie du territoire où la conservation de la faune, de la flore, du sol, des eaux, des gisements de minéraux et de fossiles et, en général, du milieu naturel présente une importance particulière. Il convient de soustraire ce territoire à toute intervention artificielle susceptible de le dégrader. Il s'agit de la stratégie de conservation la plus adoptée de conservation *in situ*. De nos jours, les réserves naturelles sont d'une grande importance pour l'humanité, vu qu'elles représentent un rempart contre la désertification et chez beaucoup de pays, elles sont considérées comme un des rares endroits les plus diversifiées de végétations spontanées dans beaucoup de pays.

7.2. La conservation *ex-situ*

C'est une technique de conservation de la faune et de la flore sauvage qui intervient hors du milieu naturel. Elle consiste à maintenir, en l'état, l'intégrité génétique des ressources depuis leur collecte et pour une durée la plus longue possible. Elle répond donc à la problématique de la pérennisation et le maintien de la diversité des plantes en dehors de leur habitat d'origines. L'objectif de cette technique n'est pas de substituer la protection *in-situ* mais de renforcer les stations naturelles affaiblies, sinon c'est la réintroduction en nature si l'espèce a disparu ou en voie d'extinction (BGCI, 2016).

La meilleure sorte de conservation de matériel végétale dans les collections *ex-situ* dépend des espèces. Pour des espèces ayant des graines « orthodoxes » (capables d'être séchées et stockées à de basses T°C durant de nombreuses années tout en restant viables), les banques de graines constituent une conservation directe de la plus grande valeur, au coût le plus bas. Pour les espèces ayant des graines « récalcitrantes » (pas en mesure d'être séchées ni stockées), la culture de tissus ou la cryoconservation peut fournir une conservation directe de grande valeur, mais à un coût plus élevé. Les collections de plantes vivantes peuvent constituer un mode de conservation direct ou indirecte de bonne valeur, en fonction de la façon dont elles sont collectées et entretenues (Maxted et al., 1997).

Le type de collections *ex situ* conservées par différentes institutions dépendra aussi de facteurs tels que la mission de l'organisation, la présence d'installations appropriées, le contexte culturel et le climat, le temps et l'expertise d'un personnel dévoué, ainsi que du soutien financier. Une collaboration entre les institutions permettra une action de conservation *ex situ* plus efficace, mettant en commun les ressources, les installations appropriées, les formations et tout autre soutien nécessaire (BGCI, 2016).

7.2.1. La Core collection

L'augmentation constante des effectifs des collections de plantes constituées dans le but de la conservation de leur diversité génétique et aussi le développement des programmes de sélection accroît les problèmes de gestion (espaces, coût, etc.). D'où l'apparition de la Core collection qui a été défini la première fois comme un échantillon réduit représentatif de la diversité de la collection de base. Le but de cette mini collection, c'est d'éviter les redondances et de maximiser la variabilité de la collection de base. (Frankel, 1984).

Plus tard, (Brown, 1995) a précisé que la core collection réduite, est susceptible de renfermer 80% de la variabilité rassemblée. C'est cette dernière qui est multipliée à l'attention

des utilisateurs. La principale méthode d'obtention d'une core collection est la démarche de maximisation M qui selon (Schoen and Brown, 1993) est basée sur une maximisation du nombre d'allèles capturés. C'est l'approche la plus performante pour conserver les allèles les plus spécifiques, éliminer des individus redondants et capturer le maximum de la diversité génétique disponible dans la collection de base.

La Core collection offre donc plusieurs nouvelles sources de variations utilisées dans les programmes d'amélioration, de reproduction, et de conservation et sa taille limitée est la raison principale de sa gestion globale.

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

1. Matériel d'étude

1.1. Choix des sites et des populations d'études

Les individus ont été échantillonnés à travers l'aire naturelle d'*Argania spinosa* L. au Maroc, le but serai de couvrir le maximum possible de toute l'aire naturelle de l'espèce afin mieux représenter la variabilité au niveau des populations.

Les sites d'études ont été identifiés à partir des documentations et des enquêtes préalables auprès des chercheurs et des responsables forestiers au niveau du Haut-commissariat des eaux et des forêts et de lutte contre la désertification.

En général, les sites sont répartis sur 4 zones biogéographiques.

- Plaines et plateau de l'Oriental
- Plaines Atlantiques
- Région de l'Arganier (Chiadma-Haha et Souss Massa)
- Région Saharienne du Sud

La répartition bioclimatique a été effectuée par le HCEFLCD et on l'a repris sur la (Figure 11) par le logiciel QGis version 2.4.0-Chugiak.

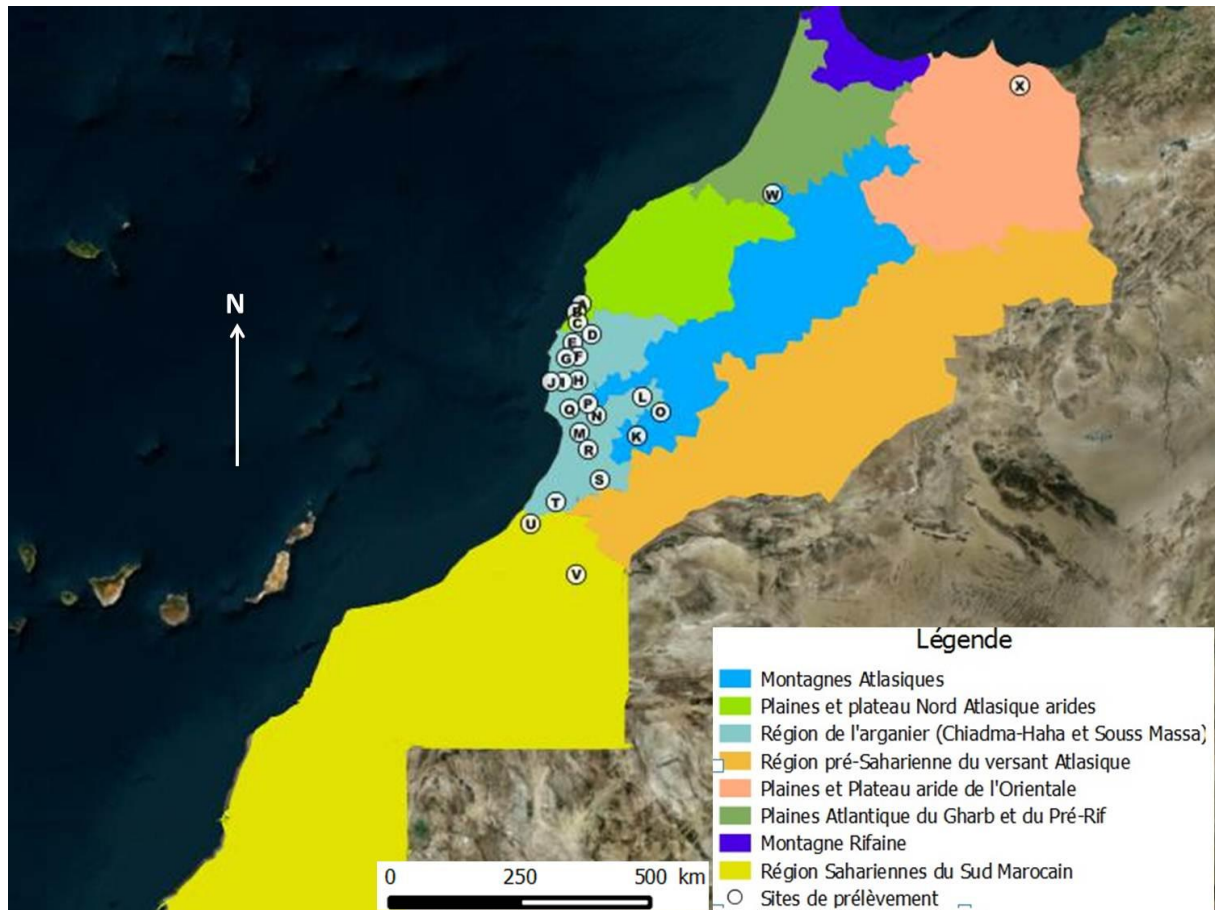


Figure 11: Origine géographique des accessions. Voir tableau 1 pour le code des accessions

1.2. Caractéristiques des sites

Les régions d'études se situent dans des zones d'altitudes différentes du Maroc (situé entre 58 et 1247m). Les caractéristiques des sites sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 2:Caractérisation géographique des populations d'arganiers échantillonnées

Région Bio-climatique	Provenance	code	Code sur la carte	Bio-climat	Altitude	Longitude	Latitude
Plaines et plateaux nord atlasiques arides	Retmana	RT	A	Semi-aride	58	9°19'24.2"	32°02'05.4"
	Oued Lhaj	OH	B	Semi-aride	120	9°24'11.7"	31°56'13.7"
	Jbel kourati	JK	C	Semi-aride	360	9°24'03.00"	31°47'22.4"
La région de l'arganier (Chiadma-Haha et Souss Massa)	Mramer	MR	D	Semi-aride	396	9°10' 02.03 "	31°38' 23.9"
	Rbaï	RB	E	Semi-aride	269	9°28' 34.4 "	31°32'07.8"
	Tamsroute	TS	F	Semi-aride	540	9°22' 58.0 "	31°21'34.9"
	Meknafa	MK	G	Semi-aride	242	9°33'56.1"	31°19'20.6"
	Ait Issi	AI	H	Semi-aride	980	09°22'32.4"	31°02'13.5"
	Tamanar North	TM	I	Semi-aride	576	9°37'20,3"	31°00'41,5"
	Immouzar	IZ	Q	Semi-aride	1100	9°30'54"	30°39'00,9"
	Ait Baha	AB	R	Aride	490	9°13'32,6"	30°06'27,1"
	Tafraoute	TA		Aride	900	9°03'21,5"	29°42'47,2"
	Lakhessas	LA	S	Aride	954	9°43'50,3"	29°24'12,4"
	Timzgida	TO	J	Semi-aride	231	9°48'09,02"	31°00'20,2"
	Ouftass						
	Admine forest	AD	M	Aride	83	9°21'38"	30°19'53,1"
Menizla	MZ	N	Aride	256	9°05'39,2"	30°33'44,8"	
Plaines et plateaux arides de l'oriental	Benei Snassen	BS	X	Aride	195	2°34'983	34°51'095
Plaines atlantique du Gharb et du Prérif.	Oued Grou	OG	W	Sub-humide	403	6°22'94.5"	33°27'44.3"
Montagne Atlasique	Aoulouz	AO	O	Aride	782	9°06'47.0"	30°37'11.2"
	Doutana	DT	P	Semi-aride	796	9°14'01.5"	30°43'35.4"
	Oulcadi	OL	K	aride	1247	8°29'08.5"	30°17'19.5"
Région saharienne du sud marocain	Guelmim	GU	U	Aride	349	10°06'40.5"	29°06'51.8"
	Assa Zag	AZ	V	Aride	336	9°25'22.5"	28°25'53.6°

2. Méthodes d'étude

Ce chapitre concerne les différentes méthodes utilisées (techniques analytiques et statistiques) lors de l'étude de la diversité génétique, et de la structuration des populations d'Arganier.

L'étude de la variabilité a été menée par approche moléculaire en utilisant les marqueurs Inter-microsatellites et les marqueurs microsatellites qui permettent de révéler une série de plusieurs allèles pour chaque locus étudié. Les deux marqueurs sont complémentaires et ont été testés pour mieux identifier la structure de la diversité génétique et les flux de gènes au sein et entre les populations.

2.1. Mode d'échantillonnage

La collecte est issue donc de 3 campagnes de prospections entre Décembre 2012 et Mars 2013 en collaboration avec les chercheurs du Haut-commissariat aux Eaux et Forêts et à la Lutte contre la Désertification, de l'Université Caddy Ayyad et l'Université Ibn Zohr .Ainsi , l'échantillonnage a concerné six régions bioclimatiques du pays,soit 24 populations échantillonnées.

Lors de nos prospections, nous avons opté avec les spécialistes forestiers pour la méthode d'échantillonnage par transect. Le principe de cette méthode est d'échantillonner un nombre fixe d'individus pour tous les sites de récoltes plutôt que de prendre un aire type (Andrianoelina andrianaivo, 2009). La longueur du transect est variable et dépend de la distance à partir de laquelle on arrive à atteindre le nombre d'individus fixés. Selon la densité de la forêt, nous avons choisi une direction pour la recherche des pieds d'*Argania spinosa* L. et la distance entre deux individus consécutifs trouvés est très variable.

2.2. Collecte des échantillons

Pour les espèces forestières, les feuilles sont le matériel végétal utilisé dans l'étude de la variabilité génétique par marqueurs moléculaires. Des échantillons de feuilles saines (couleur verte sans traces de maladies) ont été récoltés sur chaque individu à étudier. En général, les feuilles des arbres dans les forêts naturelles sont attaquées par des insectes ou présentent des maladies. Par conséquent, les feuilles ont été prélevées sur le rameau qui a présenté des feuilles à majorité saines. Chaque échantillon des feuilles a été conservé dans des sachets. Au niveau de chaque population, 20 arbres ont été choisis aléatoirement sans aucune sélection phénotypique pour l'échantillonnage, soit donc un total de 480 arbres. Ces feuilles ont été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

Au faire à mesure de la collecte des échantillons, une fiche descriptive a été remplie, contenant des informations sur les arbres échantillonnées, ainsi que le site concernés, tel que : les coordonnées GPS, la forme la hauteurde l'arbre, la circonférence du tronc, la forme et la couleur du fruit (Annexe 1).



Figure 12: Collecte des feuilles à partir d'une branche (Cas d'arbre de la forêt d'Ait Issi)

2.3. Extraction de l'ADN génomique

Une fois au laboratoire, les échantillons de jeunes feuilles ont été lyophilisés (lyophilisateur Christ, Alpha 1-2 LO) puis broyés (broyeur Plus Retsch, MM 400) puis conservés dans des tubes Eppendorfs de 2mL (200mg/tube avec 4 répétitions) et conservés dans des cryoboîtes étiquetées. Une banque de lyophilisat a été constituée et conservée à température ambiante au Laboratoire de Microbiologie et de Biologie Moléculaire (Figure 13).



Figure 13: Banque de lyophilisat de la collection d'Arganier au LMBM

Les ADN génomiques ont été extraits grâce à l'ISOLATE Plant DNA Mini Kit (BIOLINE), au lieu de la méthode classique d'extraction au CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide), ou au Phénol/chloroforme. Kit Bioline Pant II (Bioline, USA). Environ une quantité de 50 mg de poudre sèche par échantillon a été mélangée dans chaque tube de 2mL avec 400µL de tampon de lyse (lysis buffer) et 10µL de RNase. Les échantillons ont été incubés à 65°C pendant 30min, puis mélangés avec 100µL de tampon de précipitation.

Ils ont ensuite été incubés pendant 5 min dans la glace puis centrifugés à 15000g pendant 5min. Le surnageant de chaque échantillon a été transféré dans des mini colonnes PD1 (Spin column) puis centrifugé à nouveau à 10 000g pendant 1 min pour séparer l'ADN (qui se fixe à la membrane de silice des colonnes) du lysat. Les membranes ont ensuite été lavées en trois fois par l'ajout du tampon de lavage (Wash buffer). Et entre chaque 2 lavages, les colonnes sont centrifugées pendant 1min à 10000g.

Les membranes ont ensuite été placées sur des tubes d'élution (1.5mL), puis 100µL de tampon d'élution a été rajouté sur chaque colonne. Les tubes ont été ensuite incubés à température ambiante et centrifugée à 6000g pendant 2min. Cette dernière étape d'élution a été répétée une fois, puis les tubes ont été stockés à 4°C, en vue de l'amplification.

Préalablement à l'amplification, l'ADN extrait a été dilué au 1/5. Et le restant est stocké à -20°C jusqu'à prochaine utilisation (Annexe 2).

2.4. Evaluation quantitative et qualitative de l'ADN extrait

L'étude de la quantité et la pureté de l'ADN isolé est assurée par deux techniques :

D'abord, l'ADN extrait est dosé par le spectrophotomètre (ND-2000, NanoDrop), ce dernier permet de préciser la concentration des acides nucléiques en mesurant leur densité optique (DO) à une longueur d'onde d'absorbance qui correspond à 260 nm et celle des protéines à une longueur d'onde égale à 280 nm. Le rapport des densités optiques (260/280) permet de déterminer le degré de netteté de l'ADN et voir s'il est contaminé par les protéines ou les ARNs. Un rapport entre 1.8- 2.2 indique que l'ADN est très pur, par contre une valeur inférieure à 1.7 désigne une contamination par les protéines, tandis qu'un rapport supérieur à 2.2 représente une contamination probable par les ARNs. D'autre part, le rapport DO (230/260) estime la contamination de l'ADN par les polyphénols ou les acides gras et les polysaccharides qui présentent une longueur d'onde d'absorbance de 230 nm.

Ensuite la qualité de l'ADN est vérifiée sur gel d'agarose pur à une concentration de 1%, à 120V pendant 90 min. En effet, un volume de 3µl de tampon de charge est ajouté à 8 µl d'ADN concentré suspendu dans du TE (Tris_EDTA), le mélange est déposé dans les puits du gel d'électrophorèse. La révélation est réalisée par imprégnation du gel dans une solution de Bromure d'Ethidium (BET : un colorant, intercalant à fluorescence orange quand il est exposé aux rayons UV) (Annexe 1).

2.5. Amplification de l'ADN par PCR-ISSR

2.5.1. Choix des amorces ISSR

Le choix des marqueurs appropriés dépend de l'objectif de l'étude. Dans notre cas, nous sommes intéressés à mesurer et quantifier la diversité génétique chez l'arganier. La technique ISSR, basée sur la réaction PCR en utilisant des amorces à simples séquences répétées, a été choisie en raison du grand nombre de loci qui peut être examiné.

Un screening initial de 22 amorces ISSR a été effectué chez 10 individus choisis de façon aléatoire. Parmi ces 22 amorces, sept ont été choisies pour leur bonne reproductibilité à savoir la netteté, l'intensité, le nombre des bandes, et le pourcentage de polymorphisme. Le tableau 3 présente les caractéristiques des 7 amorces choisies.

Tableau 3: Liste des amorces ISSR utilisées dans cette étude

<u>Nom</u>	<u>Séquences d'amorces</u>	<u>Motif répétitif</u>	<u>Tm</u> [°C]
<u>FL2</u>	5'-ACACACACACACACACG – 3'	(AC) ₈ CG	59.9
<u>FL3</u>	5'-ACACACACACACACACCT– 3'	(AC) ₈ CT	57.6
<u>FL4</u>	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCC– 3'	(AG) ₈ CC	51.7
<u>FL6</u>	5'-CACACACACACACACAAG– 3'	(CA) ₈ AG	53.7
<u>FL8</u>	5'-GAGAGAGAGAGAGAGACC– 3'	(GA) ₈ CC	56.0
<u>FL9</u>	5'-GAGAGAGAGAGAGAGACG– 3'	(GA) ₈ CG	56.0
<u>FL10</u>	5'-GAGAGAGAGAGAGAGACT– 3'	(GA) ₈ CT	57.3

2.5.2. Mélange réactionnel et Amplification de l'ADN

La PCR-ISSR a été réalisée après plusieurs optimisation du Protocole standard de (Zietkiewicz et al., 1994) afin de pouvoir l'adapter à notre matériel génétique. Le programme « Argan-ISSR » a été utilisé pour les 7 marqueurs. Chaque mélange PCR destiné à ce programme, d'un volume final de mélange réactionnel de 25µL contient :

- 75ng d'extrait d'ADN génomique
- 5µL de tampon 10X
- 1.5 µL de dNTP mixte (Proméga) (10mM)
- 1.5 µL de MgCl₂ (25mM)
- 1.5 µL d'amorce ISSR

- 1 U Taq polymérase (Proméga)

Le profil d'amplification consiste en une dénaturation pendant 7min à 94°C, suivie par 45 cycles de (1) 30s à 94°C, (2) 45s à la température d'hybridation de chaque amorce (voir tableau 3) et (3) 2 min d'élongation à 72°C. Après amplification, les échantillons sont stockés à 4°C. (Figure 14)

Les réactions de PCR ont été effectuées avec les Thermocycleur GenAmp® (Applied Biosystem, CA, UA).

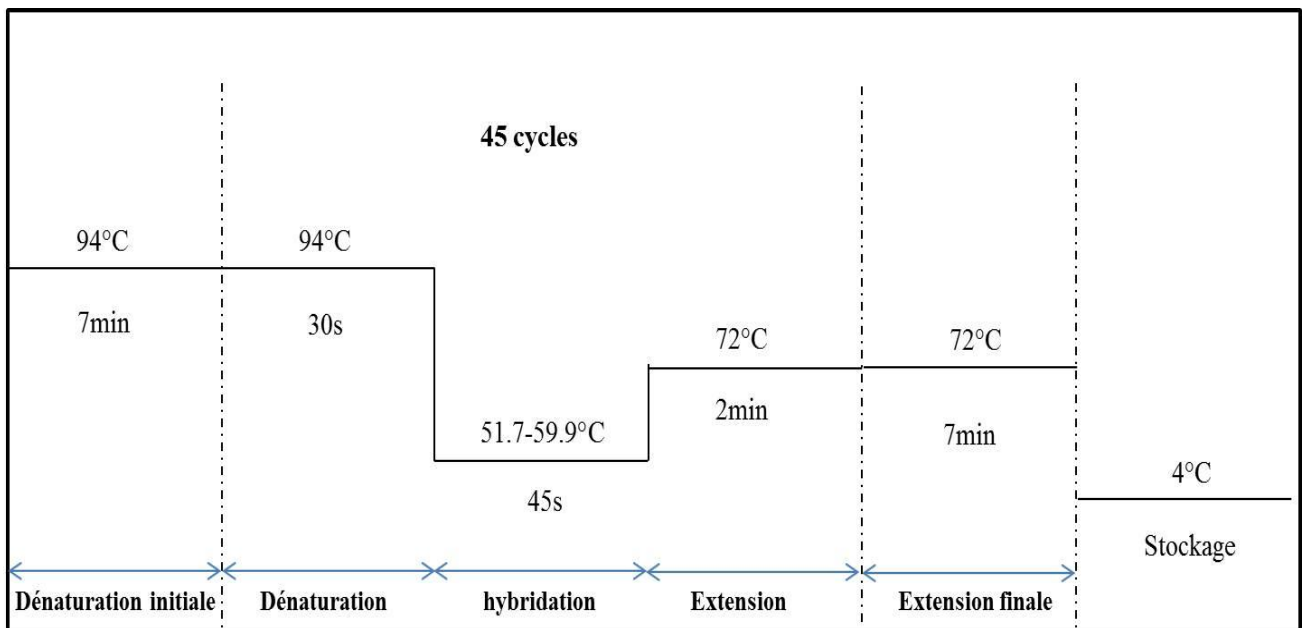


Figure 14:Description du programme « Argan-ISSR »

2.5.3. Analyse des produits PCR

Après amplification de chaque contenu de tube, un tampon de charge est ajouté aux produits obtenus de la PCR, puis le mélange subit une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans un tampon de migration TAE 1% (Tris, Acetate, EDTA), sous une tension de 100V pendant 2 heures. Afin de connaître la taille des fragments amplifiés, on utilise un marqueur de taille 1Kb DNA Ladder (Promega).

Après électrophorèse, le gel d'agarose est trempé dans un bain de Bromure d'Ethidium dilué afin que le produit amplifié sous forme de bandes puisse être lisible avant d'être photographié sous une lumière UV en utilisant l'appareil EnduroTMGDS (Labnet, USA).

2.5.4. Lecture des gels ISSR

Puisque les marqueurs ISSR sont des marqueurs dominants, chaque fragment amplifié correspond à un locus bi-allélique. En plus, un locus est considéré comme polymorphe s'il n'est pas présent chez tous les individus. Sur cette base, les bandes obtenues sont utilisées comme marqueurs de loci de chaque amorce et notées comme étant présentes (1) ou absentes (0) ce qui permet à la fin d'obtenir une matrice binaire (Figure 15) utilisée pour les analyses statistiques.

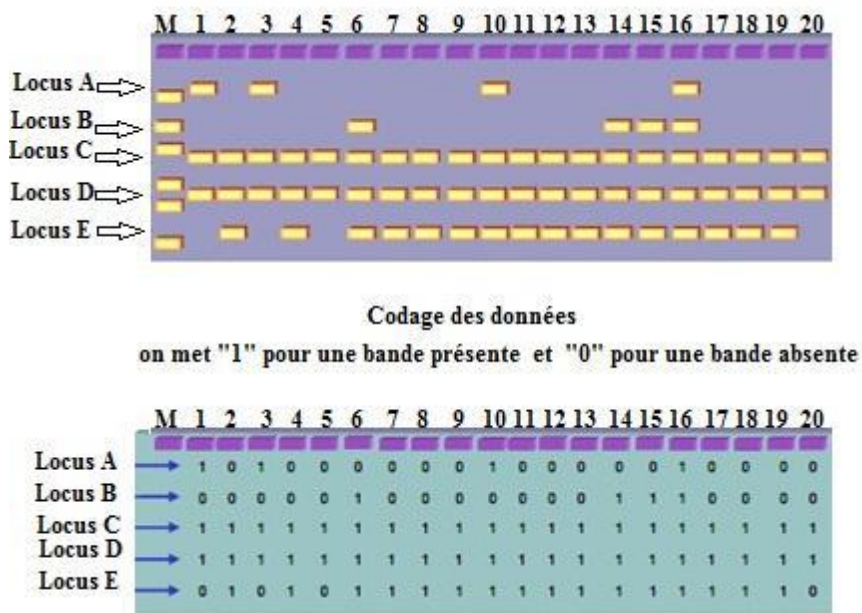


Figure 15: Principe de transformation des bandes en codes binaires, (1) = présence de bande et (0) =absence de bande

2.6. Amplification de l'ADN par PCR-SSR

2.6.1. Choix des amorces SSR

L'amplification a été faite par Polymerase Chain Reaction (PCR). D'abord un screening initial a été fait pour un total de 24 couples d'amorces dont 13 couples ont été sélectionnées pour la suite de l'analyse. De ces derniers, 11 couples d'amorces sont issus du génome de l'Arganier (El Bahloul et al., 2014) et d'autres ont été isolés chez d'autres Sapotacées *Manilkara huberi* (Azevedo et al., 2007) et *Vitellaria paradoxa* (Cardi et al., 2005) et testés chez l'arganier (Majourhat et al., 2007). Trois fluorochromes ont été utilisés pour marquer les

Matériel et Méthodes

amorces : 6-FAM, HEX, ATTO566 ; un fluorochrome a été attribué à chacun des 13 marqueurs SSR. Le kit PCR utilisé est le GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, CA, USA).

Tableau 4: Caractéristiques des loci microsatellites étudiés pour le typage des individus

Locus	Motif répété	Séquences des amorces (5'-->3') F:Fluorochrome-forward; R: reverse	T° PCR	GenBank Accession Number
<u>PCR multiplex</u>				
<u>1</u>				
<i>MH04</i>	(CT) ₁₂	F:GCACTCTCCATGGTTCCAGT R:AAAGAGTCAATGGCGTGAGC	52	AY514006
<i>MH06</i>	(GA) ₁₄	F:ACACGCACAAAACAAACCAA R:TTCTTGAAGGAGGGTTGCTC	56	AY514007
<i>MVpCIRE11</i>	(GT) ₁₀	F:TTGCTATTTGCTGTT R:TTCATCACCTTCCTCTC	48	AJ829710
<i>MH07</i>	(CT) ₂₃	F:ATTGCAGCATATCCACACCA R: GCAAAGGGTGATGGGTTAGA	56	AY514008
<u>PCR multiplex</u>				
<u>2</u>				
<i>MVpCIRE05</i>	(TG) ₇	F:GTTTGTATGGTTTCGGTT R:CTTCGTTTTTCAGTAGGTCTC	52	AJ829708
<i>MH12</i>	(CT) ₉ (AC) ₆	F:TGCGGAACTGTGGAAAGAGT R:ATCCACACAATGACTGACG	56	AY514010
<i>MH08</i>	(CT) ₁₁	F:GTAATGGGAGCCGTTTGAGA R:CTGGGTAGCATTTGTTGCAT	56	AY514009
<i>MH20</i>	(GA) ₁₃	F:GAAGTTTTGACCATTTGGGAAT R:GACATAACACTAACCCTTCACGA	56	AY514013
<u>PCR multiplex</u>				
<u>3</u>				
<i>ASMS01</i>	(CT) ₁₁ (CA) ₁₇	F:GTTTCTTGCAGTTTGAGAATTGAAAGGACAACG R: CCTCCCATCTAATATTTCTAGTTCCATCC	57	KC138526
<i>ASMS04</i>	(GA) ₁₄	F: GTTTCTTCAAAAATAAATGTGAATGAGCAC R: TGATGGGATTATGAGAAAGAG	57	KC138527
<i>ASMS20</i>	(CT) ₁₄	F: GTTTCTTAATACTTCAATGCGAAGGTCGTG R: ATTACTCCCAACCTCAGTCAGC	53.8	KC138529
<i>ASMS2012-34</i>	(AG) ₁₆	F: CCCATTGTAGACTTCCGCTTAC R: GTTTCTTAACCACAGAGAGCAGCAACTTT	55	KC527589
<i>ASMS2012-37</i>	(AG) ₁₅	F: CGGAAAGGAATTAGGATTTGG R: GTTTCTTCGGTTCGTCTCTTCTCCAGTAT	55	KC527590

2.6.2. Mélange réactionnel et amplification de l'ADN

Deux programmes d'amplification ont été utilisés.

Le programme « SSR-Arganier »(Figure 16) a été utilisé pour les 8 marqueurs SSR issus des autres espèces. Chaque mélange PCR destiné à ce programme a comme volume final de 15 μ L, contenant : L'ADN génomique (50ng/ μ L), du tampon 5X, l'dNTP (10mM), MgCl₂ (25mM), l'amorce sens et l'amorce anti-sens (5 μ M) et Gotaq (5U/ μ L).

Ce programme consiste en une dénaturation pendant 10 min à 94°C suivie par 35 cycles de : (1)45s à 95°C, (2) 45s à la température d'hybridation des amorces (Tableau 4) et (3) 45s d'élongation à 72°C, puis une étape finale d'élongation de 10min à 72°C. Après l'amplification, les échantillons sont stockés à 4°C.

Le programme « SSR spécifique-Arganier »(Figure 17) est celui développé par (El Bahloul et al., 2014) mais avec quelques modifications. Chaque mélange PCR destiné à ce programme, d'un volume final de 20 μ L, contenant de l'ADN (50ng/ μ L), le tampon 5X, la dNTP (10mM), MgCl₂ (25mM), l'amorce sens et anti-sens (5 μ M) et la Gotap (5U/ μ L).

Le profil d'amplification consiste en une dénaturation pendant 2min à 94°C, suivie par 35 cycles de : (1) 30s à 94°C, (2) 30s à température d'hybridation de chaque amorce (Tableau 4) et (3) 30s d'élongation à 72°C, puis une étape finale d'élongation de 7min à 72°C. Après l'amplification, les échantillons sont stockés à 4°C.

Les réactions de PCR ont été effectuées avec le thermocycleur « Veriti, 96 Well » (Applied Biosystem, CA, USA).

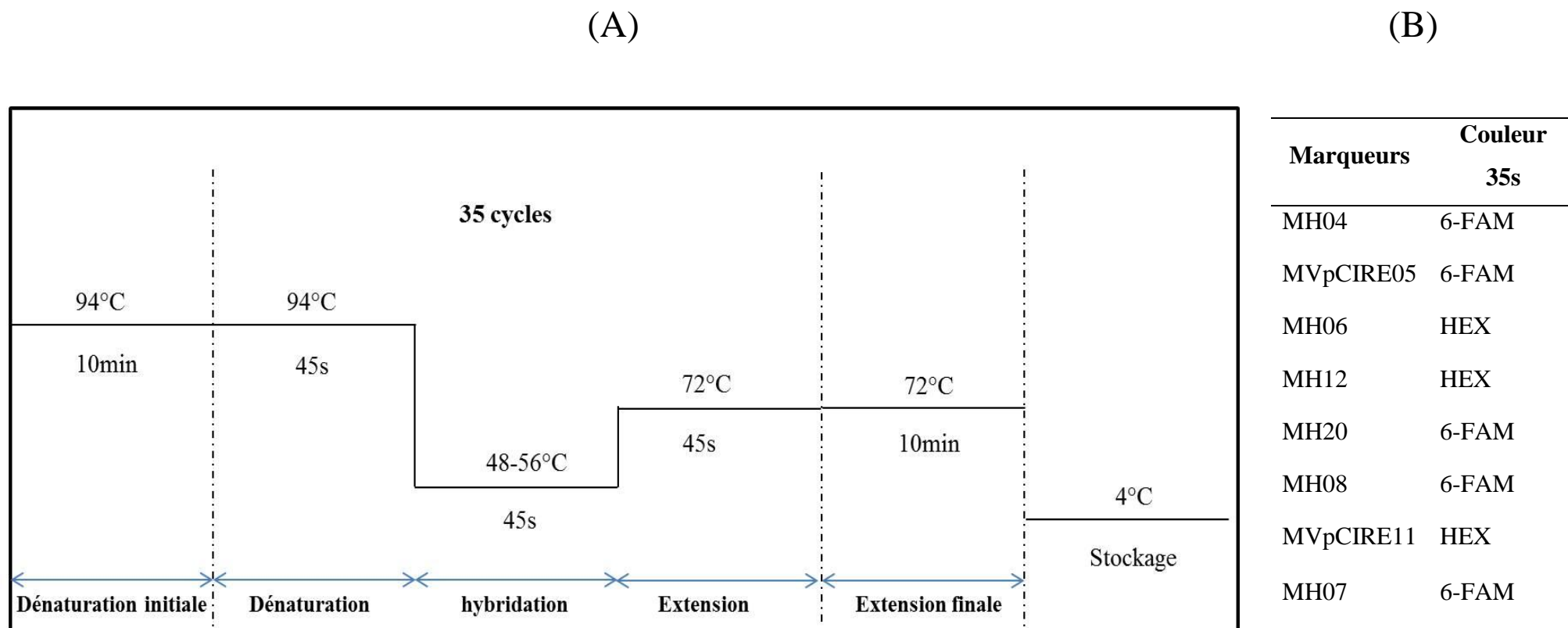


Figure 16: Programme d'amplification « SSR Arganier »

A. Description du programme PCR « SSR Arganier».

B. Liste des marqueurs destinés au programme « SSR Arganier » et fluorochrome correspondant

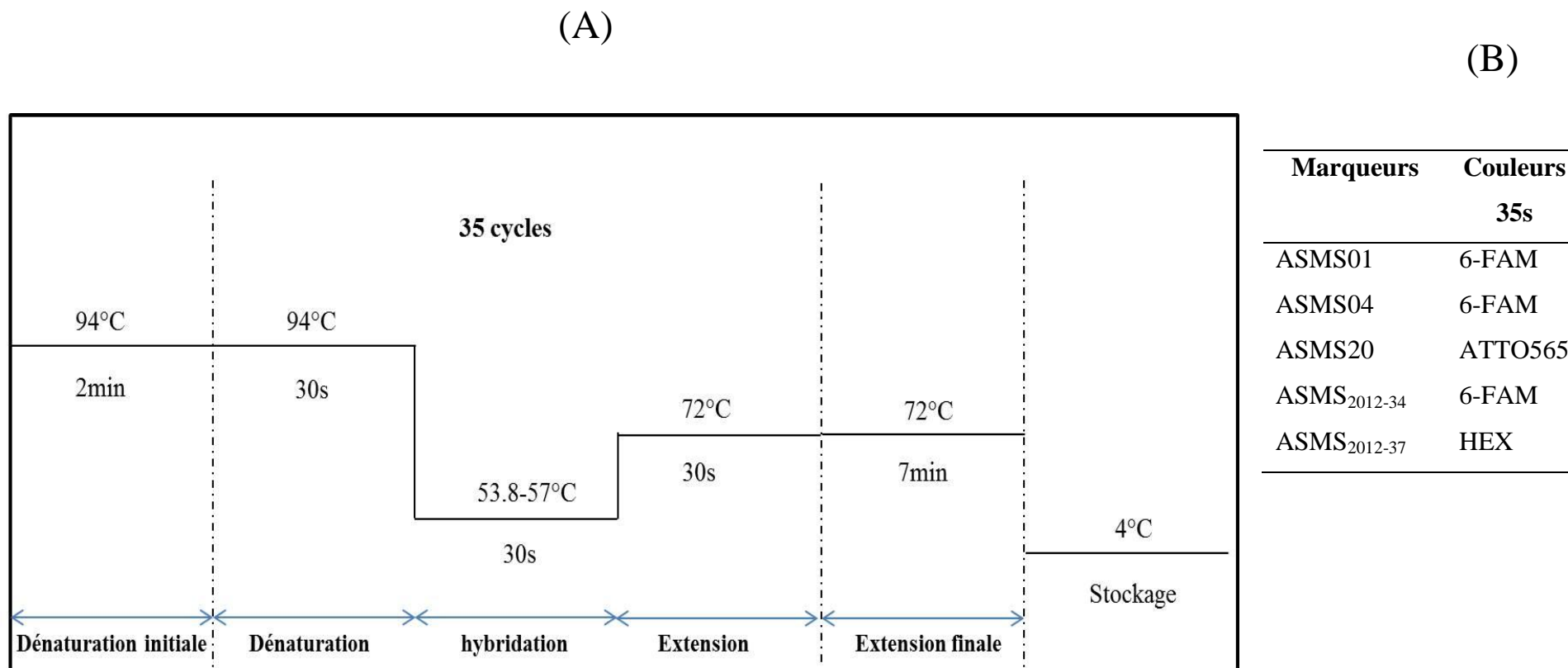


Figure 17: Programme d'amplification « SSR spécifique Arganier »

- A. Description du programme PCR «SSR spécifique-Arganier ».
- B. Liste des marqueurs destinés au programme « SSR Arganier » et fluorochrome correspondant

2.6.3. Analyse des produits PCR

Avant l'analyse par le séquenceur, 0.25µL des produits PCR de chaque échantillon sont mélangés avec 9.5µL de formamide (ce qui permet la rupture des liaisons hydrogènes entre les bases d'ADN) et 0.5 µL de marqueur de taille GeneScan™ 500ROX (Applied Biosystem). Les produits sont ensuite déposés par multiplexage quand cela est possible. Ensuite, les échantillons obtenus sont soumis à une migration par séquenceur de gène capillaire ABI prism 3130 (Applied Biosystems).

Les résultats obtenus sont ensuite analysés par le logiciel Gene Mapper (Applied Biosystems) qui permet l'analyse des données brutes obtenues et les assigne à des données biologiques : Les allèles sont visualisés sous forme de pics de différentes couleurs.

2.7. Homogénéisation des matrices et traitement des données

2.7.1. Homogénéisation des données

Une fois les allèles présents pour chaque marqueur sont identifiés grâce à Gene Mapper, on établit une matrice des données des allèles pour l'ensemble des populations étudiées. Les profils génétiques présentant un degré de diploïdie supérieur à deux n'ont pas été conservés dans la matrice de données finale, car les analyses statistiques ne peuvent s'appliquer qu'aux individus haploïdes ou diploïdes.

Aussi, les profils qui présentent de très petites différences peuvent également être dues à des erreurs de lecture des allèles sur le logiciel Gene Mapper. La lecture a été faite à différents moments par des personnes différentes, le risque de décalage de lecture n'est donc pas négligeable. Cela est visible sur les profils lorsque, chez les homonymes (Accessions présentent un nom identique), la différence pour un marqueur donnée n'est que de une ou deux paires de bases. Quand ce cas s'est produit, une relecture des profils avec Gene Mapper a été nécessaire pour décider de l'affectation de l'allèle à attribuer.

2.7.2. Analyse statistique des données

Les matrices de données obtenues par les marqueurs moléculaires ISSR (représentées par leurs codes présence/absence) et SSR (représentée par leur taille de fragments) serviront à calculer certains paramètres d'estimation du polymorphisme, de diversité et de différenciation.

a. Mesure des paramètres de diversité génétique au niveau intra-population

Plusieurs paramètres sont à prendre en considération afin d'évaluer la diversité génétiques au niveau intra-population :

- Pourcentage de locus polymorphe (%P) : Le taux de polymorphisme est facile à calculer mais son intérêt est limité puisqu'il ne peut pas être traité différemment les gènes très ou peu polymorphe : $\%P = (NBP \cdot 100) / NBT$
NBP : Nombre de bande polymorphe ; NBT : Nombre de bandes totales ;
- Le nombre moyen d'allèles par locus ;
- Le taux de polymorphisme, ou Polymorphic Information content (PIC) : C'est un paramètre qui permet d'évaluer la capacité d'un marqueur à détecter un polymorphisme dans une population (Botstein et al., 1980) ;
- L'hétérozygotie observée (H_o) : C'est la moyenne des fréquences des hétérozygotes observées à chacun des locus étudiés ;
- L'hétérozygotie attendue (H_e) : C'est la probabilité qu'à un locus donnée, deux allèles choisis aléatoirement soient différents ;
- L'indice de diversité de Nei (H) ;
- L'indice de diversité de Shannon (I) : Il permet de mesurer le degré de diversité d'une population ;
- Le flux de gène (Nm) ;
- La distance génétique (D).

L'ensemble de ces paramètres de diversité génétique a été calculé à l'aide des logiciels PopGen vers. 1.32 (Yeh et al., 1999) et FSTAT vers. 2.9.3.2 (Goudet, 2002) pour la matrice ISSR. Pour la matrice SSR, le logiciel R a été utilisé via le package PopGenPack.

b. Mesure de la diversité génétique entre les populations

- Coefficient de différenciation ;

Afin de décrire la diversité génétique entre les population, on s'est basé sur l'indice de (Wright, 1951) (F_{st}) qui mesure la réduction d'hétérozygotie liée aux différences des fréquences alléliques entre populations. Et de là, on a :

- F_{is} : Déficit en hétérozygote au sein des populations ;
- F_{st} : Déficit en hétérozygotes dû à la subdivision de la population totale en sous-population, et c'est aussi la différenciation des populations par rapport au total ;

- Fit : Déficit global en hétérozygote sur l'ensemble des populations, c'est-à-dire en considérant toutes les populations comme étant une seule et unique population ;

Les indices de fixation de Wright (F), estimé par la formule (Weir and Cockerham, 1984), sont liés par la formule : $(1 - F_{it}) = (1 - F_{is})(1 - F_{st})$.

Lorsque les loci sont multialléliques, on utilise une généralisation de cet indice, qui est le G_{st} de (Nei, 1973). Selon (Wright, 1978), si la valeur de G_{st} est entre 0 et 0.05, la différenciation est faible, (0.05 à 0.15) modérée, (0.15 à 0.25) importante, au-dessus de 0.25 très importante. Ce coefficient est lié au flux de gènes qui est calculé selon (McDermott, 1993) par la relation suivante : $Nm = \frac{0.5(1-G_{st})}{G_{st}}$

- Analyse moléculaire de la variance

L'analyse moléculaire de la variance « AMOVA » a été mesurée en se basant sur la variance totale phénotypique intra et inter-populations (Excoffier et al., 1992). Elle a été calculée en utilisant le logiciel GenAlex v6.52 (Peakall and Smouse, 2012) avec un nombre de permutation de 5000 pour le test de signification. La variance de l'AMOVA calculée est utilisée comme une estimation de la diversité génétique intra et inter-population.

c. Relations génétiques entre les populations

Plusieurs méthodes et paramètres nous permettent d'étudier la structuration à différents niveaux d'organisation de l'espèce. Il s'agit de visualiser d'une façon hiérarchisée les variations génétiques et géographiques des populations.

- La distance génétique

Les indices de similarité (I) et les distances génétiques ($D = -\log I$) servent à mesurer la ressemblance ou la dissemblance entre deux populations. La distance génétique entre deux échantillons est définie comme la proportion d'éléments génétiques non commune, par exemple $D = 0$ si les deux échantillons ont les mêmes fréquences alléliques. Dans le cadre de ce travail, les distances génétiques entre paires de populations ont été calculées selon l'approche classique basée sur les fréquences alléliques dans chaque population en retenant la distance non biaisée de Nei (1978). Dans le cas d'un ensemble de populations, ces indices sont calculés en prenant les populations deux à deux, les deux populations peuvent être ensuite agrégées en fonction de leur ressemblance pour construire un dendrogramme.

- Classification hiérarchique

Une analyse typologique par la méthode UPGMA basée sur la distance de Nei (1978), a été effectuée pour les deux matrices moyennant le logiciel NTSys-pc ver. 2.1. et permettant de regrouper les différentes populations en groupes (cluster).

- Test de Mantel

Afin d'évaluer la relation entre la distance génétique et la distance géographique, le test de Mantel (Mantel, 1967) a été appliqué. Pour cela, le Logiciel GenAlex v6.6 a été utilisé pour la matrice ISSR. Et le Logiciel R vis le PoGen Package a été utilisé pour la matrice des SSR.

- Analyse des composantes principales

Les techniques d'Analyse en Composantes principales (ACP) ou d'Analyse en Coordonnées Principales (PCoA) (Peakall and Smouse, 2012) sont des techniques d'analyse qui permettent de visualiser les similarités ou les dissimilaires des variables étudiées. Elles sont basées sur la matrice de similarité ou de dissimilarité et attribue à chaque élément un emplacement dans un espace à faible dimension.

Ainsi, on peut distinguer les relations entre les variables analysées et voir si ces variables permettraient de discriminer des populations. Cette représentation permet de projeter les populations étudiées sur un plan défini par les deux axes qui définissent les degrés les plus explicatifs des variables.

- Analyse bayésienne de regroupement

L'analyse Bayésienne de regroupement vise à estimer la structure génétique d'un ensemble d'individus en rassemblant ces derniers dans des groupes, sur la base de leurs profils génétiques. Elle permet l'identification de groupes génétiques différents. On obtient après analyse des groupes distincts et génétiquement différents. Cette approche est implémentée dans le programme STRUCTURE (Pritchard et al., 2000). Ce dernier travaille sous deux hypothèses : les populations sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg (panmixie et pas de pression évolutive), et il y a existence d'un équilibre de liaison entre les différents loci.

Dans cette étude, avec le logiciel STRUCTURE v2.3.3, on a adopté le model sans admixture avec 4000 itérations MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Vingt essais ont été effectués pour chaque valeur de K (nombre de populations estimé) allant de 1 à 7. La valeur la plus probable de K a été calculée à l'aide de ΔK , qui représente la plus grande vitesse de variation

entre chaque valeur ultérieure de K. Au final, le logiciel STRUCTURE attribue à chaque individu sa probabilité d'appartenance à chaque population. On utilise ces probabilités pour déterminer la composition de chaque population.

2.8. La construction de la Core Collection

Afin de pouvoir choisir un échantillon réduit et représentatif de la collection totale d'arganier et de sa diversité, la démarche de maximisation M basée sur la maximisation du nombre d'allèles capturées est la démarche la plus performante jusqu'à présent pour conserver les allèles les plus spécifiques et éliminer des individus redondants. En se basant sur les deux matrices des marqueurs moléculaires ISSR et SSR, ainsi que les données géographiques des populations échantillonnées, le Logiciel Power Core vers. 1.0 a été utilisé afin d'établir une Core collection représentative de la diversité génétique de la collection d'origine.

Résultats et Discussion

Chapitre I :

Evaluation de la diversité génétique intra et inter-populations de l'arganeraie marocaine moyennant les marqueurs moléculaires ISSR

Chapitre I : Evaluation de la diversité génétique intra et inter-populations de l'arganeraie marocaine moyennant les marqueurs moléculaires ISSR

1. Etude quantitative et qualitative des ADN extraits

L'évaluation par spectrophotométrie des 240 ADN extraits de feuilles d'arganier a enregistré des rapports de DO_{260}/DO_{280} compris entre 1.6 et 1.9. Ces rapports témoignent d'une très bonne qualité d'ADN malgré la richesse des feuilles d'arganier en polyphénols. Les concentrations d'ADN calculées ont atteint des valeurs élevées allant jusqu'à 950 ng/ μ L (Annexe 3).

Mais, le dosage par Nanodrop ne nous informe pas sur l'intégrité de l'ADN car même si l'ADN est dégradé, les bases azotées présentes absorbent toujours à 260nm. Donc, pour s'assurer de sa pureté, on a procédé à une vérification de la qualité de l'ADN par une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Figure 18).

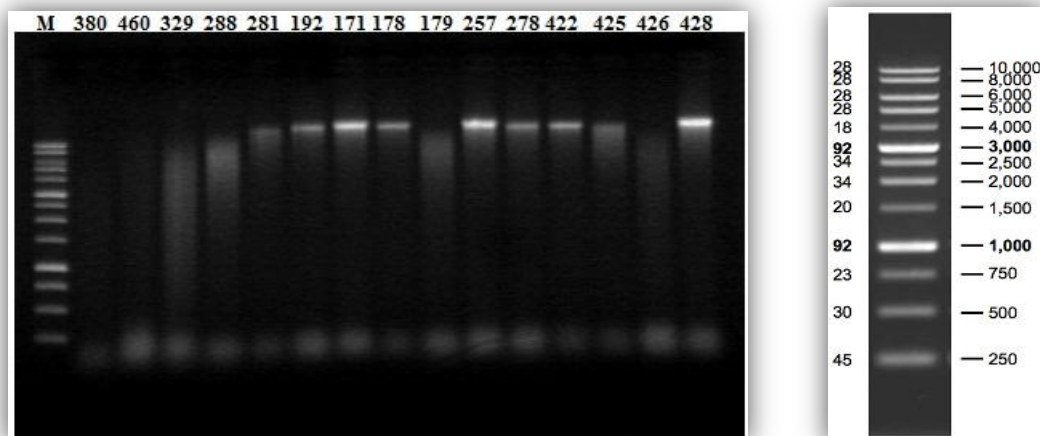


Figure 18: (A), Exemple de gel d'agarose 1% servant à l'estimation de qualité d'ADN extrait sur gel d'agarose 1%. (B) Marqueur de poids moléculaire 1 Kb, sur un gel d'agarose de 1%

2. Caractérisation moléculaire des populations d'arganier via les marqueurs ISSR

2.1. Analyse du polymorphisme

Les 7 amorces utilisées ont toutes généré des profils lisibles et polymorphes (Figure19) avec un pourcentage de polymorphisme génétique de 100%. Au total, 305 bandes d'ADN ont été amplifiées et ceci chez les 24 populations naturelles d'arganier. La totalité des fragments amplifiés se sont avérés polymorphes. Le nombre de marqueurs varie entre 24 et 56 avec une moyenne de 37.28 marqueurs par amorce et un pourcentage de 100% de bandes polymorphes ce qui indique un taux élevé de polymorphisme au sein des populations étudiées.

Tableau 5: Polymorphisme révélé par les sept amorces ISSR

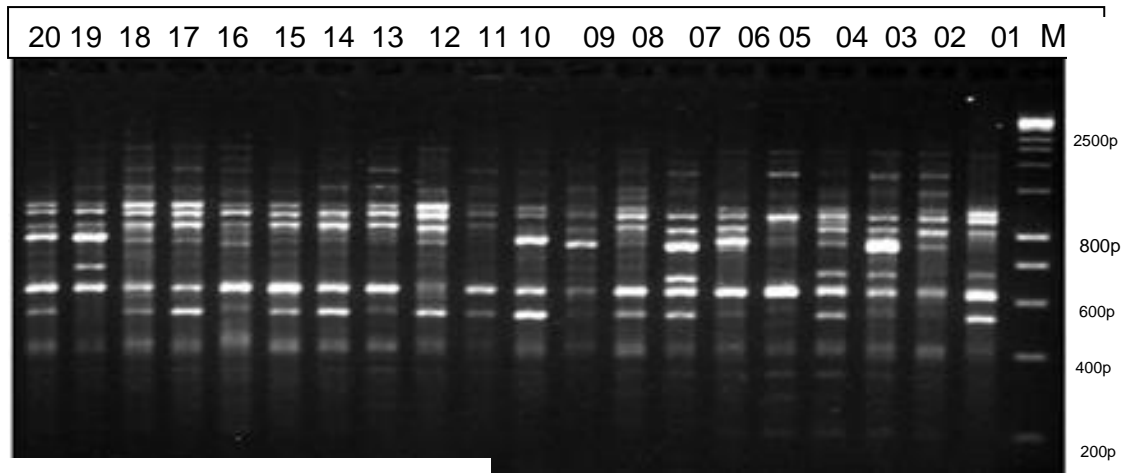
	nombre de marqueurs/amorces	NBP	%P	Taille des bandes en pb
FL2	39	39	100	150-1500
FL3	38	38	100	200-2000
FL4	32	32	100	100-1500
FL6	34	34	100	200-2000
FL8	36	36	100	200-2000
FL9	64	64	100	150-1500
FL10	62	62	100	200-2000
Totale	305	305		
Moyenne	43.57		100	150-2000

NBP : Nombre de bandes polymorphes ; %P : Pourcentage de polymorphisme ; pb : Paire de base

2.2. Variabilité génétique intra-population

L'étude de la variabilité intra-population (Tableau 5), montre que le nombre d'allèles par locus (N_a) varie de 0.464 chez les populations de Lakhssas et Beni Snassen à 0.782 chez la population Rbai avec une moyenne de 0.607. L'indice de Shannon (I) varie de 0.113 à 0.200 et l'indice de diversité de Nei (h) varie de 0.075 à 0.132.

Au fait, l'ensemble de ces résultats montre une tendance similaire pour tous les paramètres mesurés. Ainsi la population de Rbai présente les valeurs les plus élevées et donc elle est la population la plus diversifiée alors que la population de Béni Snassen présente les valeurs les plus faibles.



M : marqueur de taille

Figure 19: Profil des 20 individus de la population Retmana révélé par l'amorce FL9.

Tableau 6: Paramètre de diversité génétique intra-population

Populations	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>I</i>	<i>h</i>	<i>%P</i>
Retmana	20	0.556	0.139	0.093	26.05%
Ouled Lhaj	20	0.628	0.164	0.110	30.27%
Jbel Kourat	20	0.701	0.174	0.114	34.48%
Mramer	20	0.705	0.164	0.108	33.72%
Rbai	20	0.782	0.200	0.132	38.31%
Tamesrart	20	0.655	0.170	0.114	31.80%
Neknafa	20	0.613	0.152	0.100	29.12%
Ait Issi	20	0.651	0.159	0.105	31.42%
Tamanar Nord	20	0.613	0.148	0.097	29.89%
Timzgidah Oufetass	20	0.602	0.166	0.112	29.50%
Oulcadi	20	0.575	0.142	0.094	26.82%
Tizi Ntest	20	0.663	0.155	0.102	31.03%
Admine	20	0.678	0.182	0.121	33.72%
Mnizla	20	0.640	0.168	0.112	31.42%
Aoulouz	20	0.709	0.188	0.125	35.25%
Imouzzer	20	0.594	0.149	0.099	29.12%
Doutana	20	0.536	0.136	0.091	25.29%
Ait Baha	20	0.632	0.155	0.102	30.27%
Tafraout	20	0.590	0.153	0.102	28.74%
Lakhssas	20	0.464	0.126	0.085	22.61%

Guemim	20	0.506	0.137	0.092	24.52%
Assa Zag	20	0.475	0.116	0.077	22.22%
Oued Grou	20	0.536	0.135	0.090	25.67%
Benié Snassen	20	0.464	0.113	0.075	21.46%
Moyenne ± Ecart-type Standard	20.000	0.607±0.079	0.154±0.021	0.102±0.014	0.293±0.041

(*Na*) : Nombre d'allèles par locus ; (*I*) : Indice de Shannon ; (*h*) : l'indice de diversité de Nei ;

%*P* : Pourcentage de polymorphisme.

2.3. Variabilité génétique inter-population

Au niveau inter-population, les paramètres de différenciation entre les populations sont estimés à partir des statistiques de (Nei, 1973, 1978). Pour les 24 populations étudiées, le coefficient de différenciation génétique (*Gst*) est de 0.35. Il s'agit d'une valeur élevée mettant en évidence l'existence de grandes variations entre les structures génétiques des populations. Ainsi, l'estimation du nombre de migrant par génération $Nm=0.928$ signifie un flux de gène limité (Tableau 7)

Tableau 7: Indices de diversité de Nei et estimation du flux de gène pour les 24 provenances.

Sur la totalité des loci polymorphes	<i>I</i>	<i>Ht</i>	<i>Hs</i>	<i>Gst</i>	<i>Nm</i>
Moyenne ± Ecart-type standard	0.154±0.021	0.185±0.015	0.105±0.006	0.3502	0.928

Ht : la diversité génétique totale; ***Hs*** : la diversité génétique au sein des populations; ***Gst*** : coefficient de la différenciation génétique entre les populations; ***Nm*** : le flux de gènes entre les populations

Dans le même sens, l'Analyse Moléculaire de la Variance (AMOVA) a été réalisée par le logiciel GenAlex vers. 6.6 en utilisant la matrice présence(1)/absence(0) et a montré d'une façon très hautement significative que 42% de la variabilité génétique existe entre les populations étudiées de l'arganier et 53% au sein des populations (Tableau 8).

Tableau 8: Analyse Moléculaire de la Variance pour les 24 populations

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%V	P
Inter-populations	23	5178.975	287.721	13.593	42%	P <.001
Intra-populations	462	9650.000	15.863	18.984	58%	P <.001
Total	479	14829.031		32.577	100%	

df : degré de liberté ; **SS** : La somme des carrées ; **MS** : Carré moyen ; **Est. Var** : Estimation de la variance ; **%V** : Pourcentage de variation

2.4. Relations génétiques entre les populations d'arganier

2.4.1. La distance génétique :

En utilisant le Logiciel PopGene32, une matrice de distance génétique a été obtenue, montrant que la distance génétique de Nei (D) entre les 24 populations étudiées varie de 0.0171 et 0.1454. Les populations Retmana et Ouled Haj présentent la plus faible distance génétique, tandis que les populations Beni Snassen et Ouled Haj s'avèrent les plus distantes génétiquement (Tableau 9).

Tableau 9: Distance génétique non biaisais (Sous le diagonal) et Identité génétique (au-dessus le diagonal) entre les 24 populations

Population	RT	OH	JK	MR	RB	TS	NK	AI	TM	TO	OL	TZ	AD	MN	AO	IZ	DT	AB	TA	LA	GU	AZ	OG	BS
RT	****	0.9831	0.9686	0.9256	0.9073	0.9094	0.8874	0.8987	0.9097	0.9183	0.8771	0.8767	0.9276	0.9025	0.9006	0.9069	0.8887	0.9019	0.9216	0.9224	0.9122	0.8887	0.9083	0.8978
OH	0.0171	****	0.9776	0.9321	0.9168	0.9131	0.8979	0.9101	0.9178	0.9274	0.8852	0.8879	0.9359	0.9105	0.9098	0.9108	0.8917	0.9133	0.9344	0.9303	0.9245	0.9056	0.9188	0.9076
JK	0.0319	0.0226	****	0.9545	0.9389	0.9335	0.9198	0.929	0.9333	0.9329	0.8961	0.8983	0.9473	0.9168	0.9249	0.9259	0.9055	0.9216	0.9384	0.938	0.938	0.9196	0.9347	0.92
MR	0.0773	0.0703	0.0465	****	0.9665	0.9224	0.9103	0.9253	0.9251	0.8948	0.8646	0.8671	0.9146	0.8949	0.9067	0.9092	0.8812	0.9068	0.9366	0.9329	0.9193	0.9003	0.907	0.8967
RB	0.0973	0.0868	0.063	0.0341	****	0.9354	0.9206	0.9364	0.9377	0.9154	0.8786	0.8879	0.9267	0.9074	0.9239	0.9177	0.8936	0.9129	0.9408	0.9353	0.9222	0.9093	0.9148	0.9017
TS	0.095	0.0909	0.0688	0.0808	0.0667	****	0.974	0.9534	0.9334	0.9202	0.8801	0.8907	0.9312	0.9032	0.9222	0.922	0.9012	0.9078	0.92	0.9139	0.9131	0.9011	0.9206	0.9101
NK	0.1194	0.1077	0.0837	0.094	0.0827	0.0263	****	0.9516	0.9236	0.9091	0.8694	0.8762	0.9204	0.8901	0.9039	0.9146	0.8966	0.8963	0.9072	0.9055	0.8961	0.8804	0.8998	0.8947
AI	0.1068	0.0942	0.0737	0.0776	0.0657	0.0477	0.0497	****	0.9475	0.9256	0.8876	0.8974	0.9363	0.9048	0.9251	0.936	0.9104	0.9084	0.9234	0.9205	0.9117	0.9057	0.927	0.9127
TM	0.0946	0.0858	0.069	0.0779	0.0643	0.069	0.0795	0.0539	****	0.9406	0.8905	0.8899	0.9406	0.9231	0.9365	0.9459	0.9199	0.9072	0.9301	0.9257	0.9234	0.9157	0.9305	0.9084
TO	0.0852	0.0754	0.0694	0.1111	0.0884	0.0831	0.0953	0.0773	0.0613	****	0.8959	0.9235	0.9536	0.9172	0.9304	0.9314	0.9136	0.9037	0.9188	0.9153	0.922	0.9053	0.9305	0.9173
OL	0.1312	0.1219	0.1097	0.1454	0.1295	0.1277	0.14	0.1192	0.116	0.11	****	0.9491	0.903	0.8934	0.8988	0.8948	0.8689	0.9325	0.9173	0.917	0.9222	0.9127	0.8905	0.8663
TZt	0.1316	0.1189	0.1072	0.1425	0.1189	0.1157	0.1322	0.1082	0.1166	0.0796	0.0522	****	0.9205	0.8916	0.905	0.8991	0.8788	0.9113	0.908	0.8998	0.9168	0.904	0.9034	0.8883
AD	0.0751	0.0663	0.0542	0.0892	0.0761	0.0713	0.083	0.0658	0.0612	0.0475	0.102	0.0828	****	0.9573	0.9588	0.9497	0.9326	0.9172	0.9346	0.9343	0.9259	0.9164	0.9416	0.9316
MN	0.1026	0.0938	0.0869	0.111	0.0972	0.1018	0.1164	0.1001	0.08	0.0864	0.1128	0.1147	0.0437	****	0.9765	0.9394	0.9212	0.9102	0.9233	0.924	0.9158	0.9089	0.9295	0.9174
AO	0.1047	0.0945	0.078	0.098	0.0791	0.081	0.1011	0.0779	0.0656	0.0722	0.1067	0.0998	0.0421	0.0238	****	0.9512	0.928	0.9162	0.9375	0.929	0.9301	0.9198	0.9426	0.9254
IZ	0.0977	0.0934	0.077	0.0952	0.0859	0.0812	0.0893	0.0662	0.0556	0.0711	0.1112	0.1063	0.0517	0.0626	0.05	****	0.9706	0.9108	0.9257	0.928	0.9223	0.9141	0.9395	0.9196
DT	0.118	0.1147	0.0993	0.1265	0.1125	0.104	0.1092	0.0939	0.0835	0.0904	0.1406	0.1291	0.0698	0.0821	0.0747	0.0298	****	0.8876	0.9034	0.9073	0.9035	0.8902	0.9357	0.9137
AB	0.1033	0.0907	0.0817	0.0979	0.0911	0.0968	0.1095	0.0961	0.0974	0.1012	0.0698	0.0929	0.0864	0.0941	0.0875	0.0934	0.1193	****	0.9623	0.9514	0.9431	0.9233	0.9038	0.8839
TA	0.0817	0.0678	0.0636	0.0655	0.061	0.0834	0.0974	0.0797	0.0725	0.0847	0.0863	0.0965	0.0676	0.0798	0.0646	0.0772	0.1016	0.0385	****	0.974	0.9599	0.9399	0.9248	0.9131
LA	0.0808	0.0723	0.064	0.0694	0.0669	0.0901	0.0993	0.0829	0.0772	0.0886	0.0867	0.1055	0.068	0.079	0.0737	0.0747	0.0973	0.0499	0.0264	****	0.9611	0.9428	0.9211	0.9048
GU	0.0919	0.0785	0.064	0.0841	0.081	0.0909	0.1097	0.0924	0.0797	0.0812	0.081	0.0868	0.077	0.0879	0.0725	0.0809	0.1015	0.0586	0.0409	0.0396	****	0.9634	0.9242	0.9142
AZ	0.118	0.0991	0.0838	0.105	0.0951	0.1042	0.1274	0.099	0.0881	0.0995	0.0913	0.1009	0.0873	0.0956	0.0836	0.0898	0.1164	0.0798	0.062	0.0589	0.0373	****	0.9119	0.8958
OG	0.0962	0.0847	0.0675	0.0976	0.089	0.0827	0.1055	0.0758	0.0721	0.0721	0.1159	0.1015	0.0602	0.0731	0.0592	0.0624	0.0665	0.1012	0.0782	0.0822	0.0789	0.0922	****	0.9717
BS	0.1078	0.097	0.0834	0.109	0.1035	0.0942	0.1112	0.0914	0.0961	0.0863	0.1436	0.1184	0.0709	0.0862	0.0775	0.0838	0.0903	0.1234	0.0909	0.1	0.0897	0.1101	0.0287	****

2.4.2. La classification hiérarchique

La classification hiérarchique basée sur la méthode UPGMA effectuée par le logiciel NTSys-pc a permis de classer les 24 populations en 2 groupes majeurs, le groupe (I) regroupe les deux populations Oulcadi et Tizi Ntest et le groupe (II) renferme 4 sous-groupes (a) :

- (a) Comprend les populations : Retmana, Ouled Haj, Jbel Kourati, Mramer et Rbai
- (b) Renferme les populations : Ait Baha, Tafraout, Lakhssass, Guelmim et Assa Zag
- (c) Contient les populations de : Tamsrart, Neknafa, et Ait Issi
- (d) Et le dernier sous-groupe est constitué de : Tamanar, Timzgidah Oufetass, Admine, Mnizla, Aoulouz, Imouzzar et Doutana en plus des deux reliques du Nord (Oued Grou et Beni Snassen).

Le regroupement UPGMA illustre en partie la distribution géographique des populations, mais il rassemble tout de même quelques populations qui ne sont pas de la même région géographique tel que les reliques du Nord. Et qui sont géographiquement loin de la région de l'arganier mais qui s'avère génétiquement proches de cette dernière (Figure 20).

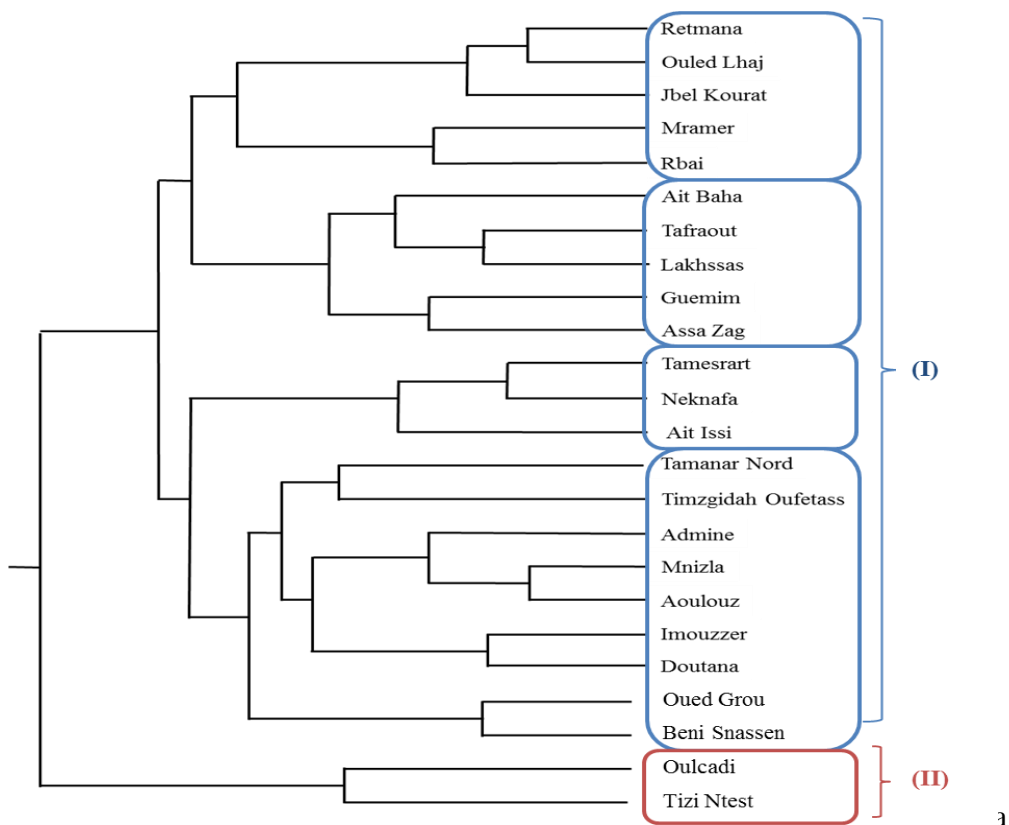


Figure 20 : Dendrogramme UPGMA basé sur la distance génétique non biaisais de Nei (1978) des 24 populations étudiées

2.4.3. L'isolement par la distance

Les résultats de l'indice de différenciation G_{ST} ont déjà montré une différenciation élevée entre les populations. Cette différenciation est expliquée par la distance géographique des régions de populations étudiées et surtout pour les populations au Nord du pays.

Donc afin de comprendre l'origine de la structuration et de la différenciation entre les populations d'*Argania spinosa* L. dans son aire de répartition, il est nécessaire d'étudier la corrélation entre les matrices de distances génétiques et les distances géographiques. Le test de Mantel (1967) permet d'établir cette corrélation, ce qui va donc permettre de voir si les individus les plus proches géographiquement sont aussi proches génétiquement.

Le résultat du test de Mantel met en évidence une corrélation positive mais non significative ($r=0.065$; $p=0.05$) entre la distance génétique et la distance géographique pour les 24 populations étudiées.

2.4.4. Analyse des composantes principales

L'Analyse des coordonnées principales (PCoA) permet de simplifier l'illustration des données numériques sur un espace à deux dimensions. Cet algorithme, se basant sur la recherche des axes propres de la matrice de variances des marqueurs génétiques, est l'un des algorithmes les plus utilisés en génétique des populations (Jay et al., 2012) et cette analyse est basée sur la distance génétique entre les populations. La projection de la PCoA pour les 480 individus pour les 24 populations montre que 53.03% de la variabilité est expliquée par les 2 premiers axes et confirme la distribution obtenue par la classification hiérarchique. Elle répartie les populations en deux pools génétiques sans pour autant prendre en considération la distribution géographique de toute les populations. Toutefois, elle rassemble les populations du Sud Saharien dans le même pool génétique et les autres populations dans le 2^{ème} pool (Figure21).

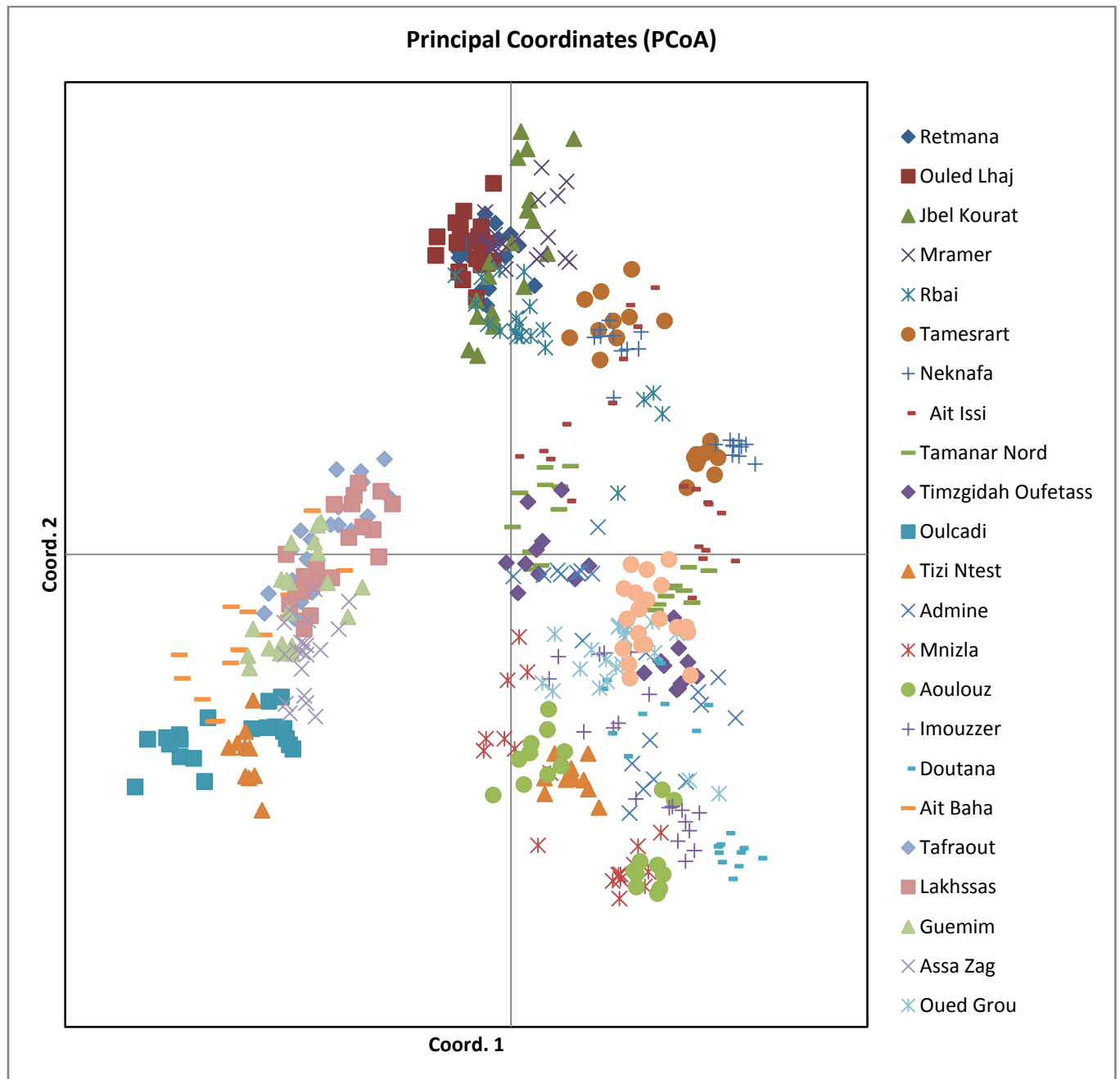


Figure 21: Projection de l'Analyse des composantes principales des 24 populations *d'Arganiaspinosa* L. établie à l'aide du logiciel GenAlex

Discussion

En raison de leur capacité à détecter de faibles niveaux de diversité, les marqueurs ISSR ont été utilisés pour étudier la variation génétique de nombreuses espèces végétales (Zietkiewicz et al., 1994).

Ils sont également potentiellement efficaces pour analyser les profils biogéographiques parmi les populations de la même espèce (Martins-Lopes et al., 2009). De là, 13 marqueurs ISSR ont été utilisés afin d'étudier la diversité génétique d'*Argania spinosa* L. sur un total de 480 individus collectés de 24 populations représentant toute l'aire de distribution de cette forêt endémique du Maroc.

Cette étude est d'une importance considérable car elle permettra de mettre en évidence les populations qui présentent un niveau élevé de diversité génétique, afin de leur donner la priorité lors de l'établissement du programme de conservation génétique (Petit et al., 1997). Et c'est la première à utiliser les marqueurs ISSR après les travaux de (Ait Abd et al., 2015) établis sur une moyenne de 30 individus par populations prises sur 5 sites éloignés. L'ADN amplifié a produit un total de 305 bandes claires, reproductibles et amplifiables avec une taille qui varie de 150 à 2000pb. Et le nombre de fragments par marqueurs varie de 32 (FL4) à 64 (FL).

Egalement, les résultats obtenus de diversité génétique à l'aide de ces marqueurs au sein des populations d'arganier (Tableau 6) montrent que tous les paramètres estimés ont la même tendance (N_a , h , I , %P). Donc la population Rbai (RB) de la région de l'arganier apparaît la plus diversifiée pour tous les paramètres calculés (% de polymorphisme = 38.31% ; diversité génétique de Nei $h=0.152$, Indice de diversité de Shannon $I= 0.200$), alors que la population de Beni Snassen (BS) des plaines et plateau de l'Orientale est la moins diversifiée (%p=21.46% ; $N_a= 0.464$; $I=0.113$; $h=0.075$). Ceci est dû probablement à l'isolement géographique de cette population dans l'extrême Nord du pays ce qui limite la brassage génique et favorise l'effet de la dérive génétique. Toutefois, à l'échelle des 24 populations considérées comme un seul groupe, un gain en diversité très élevé est obtenu (%P=98.8% ; $I=0.301\pm 0.1668$; $h=0.175\pm 0.120$; $N_a=1.242\pm 0.209$).

Cette étude révèle un polymorphisme plus élevé que celui révélé à l'aide des autres marqueurs moléculaires tel que les isoenzymes (El Mousadik and Petit, 1996a) et les RAPD (Bani-Aameur and Benlahbil, 2004; Majourhat et al., 2008). Egalement, l'espèce *Argania spinosa* L. présente une moyenne de diversité génétique relativement élevée comparée à d'autres espèces forestières (Abdul Kareem et al., 2012; Bettencourt et al., 2015; Camacho and Liston, 2001; Feyissa et al., 2007).

Cependant, le niveau de diversité génétique mesuré chez l'arganier était en accord avec d'autres études effectuées sur d'autres espèces endémiques avec un niveau de diversité

génétique bas à l'échelle de la population et un niveau de diversité élevé à l'échelle de l'espèce ;Ceci est le cas de *Heptacodium miconiodes* (Capridoliaceae), une espèce rare et endémique en Chine (Jin and Li, 2007), et aussi *Lactoris fernandeziana* (Lacctoridaceas) endémique de l'archipel Juan Fernandez en Chilie (Crawford et al., 2001). Ces deux espèces présentent un %P= 27.22%, %P= 27% à l'échelle de la population et %P=78%, %P= 73% à l'échelle de l'espèce respectivement. Egalement, l'indice de diversité de Nei et l'indice d'information de Shannon présente la même tendance avec un niveau de diversité très modéré à l'échelle de la population ($h= 0.102\pm 0.014$ et $I=0.154\pm 0.021$) et un niveau de diversité élevé à l'échelle de l'espèce ($h=0.175\pm 0.12$ et $I=0.301\pm 0.166$). Ce qui suggère que les populations d'argan sont menacées non pas en raison d'un manque de variation génétique, mais à cause d'autre facteurs détériorant tel que le surpâturage et la surexploitation humaine.

L'analyse des profils multi-locus a montré un haut niveau de différenciation génétique entre les populations d'arganier ($G_{st}= 0.350$) ce qui est comparable au niveau de la différenciation obtenue chez la même espèce avec un nombre limité de *loci* ($G_{st_{\text{izoenzymes}}}= 0.25$, (El Mousadik and Petit, 1996c) ; $G_{st_{\text{chloroplastique}}}= 0.60$ (El Mousadik and Petit, 1996a)). Les valeurs atteintes sont parmi les plus élevées et peuvent aussi être comparées à d'autres espèces forestières telle que *Quecus pertaea* qui couvre tout l'Europe mais qui pourtant se caractérise par une faible différenciation ($G_{st}=0.026$; (Kremer et al., 2002). Cela montre bien que l'arganier est parmi les ressources forestières les plus différenciées génétiquement.

Actuellement, la répartition naturelle des populations d'arganier est limitée à une zone spécifique. De plus, le niveau de différenciation génétique s'avère plus élevé par rapport aux espèces endémiques ligneuses pérennes (Hamrick and Godt, 1996b).

Mais,des résultats similaires ont été reportés chez d'autres espèces tropicales menacées ou endémiques tel que *Madhuca hainanensis*(Dai et al., 2013) ; *Vouacapoua americana*(Dutech et al., 2003) et même chez des espèces de la même famille des arbres tropicaux (Sapotaceae) *Vittelaria paradoxa*(Fontaine et al., 2004).

Par ailleurs, le flux de gène de plus de quatre migrants par génération est, en théorie, suffisant (Slatkin, 1987) afin d'éviter une différenciation génétique entre populations. Dans cette étude, Nm estimé pour l'arganier est assez faible ($Nm=0.92$). Ainsi, il est inférieur à la moyenne (1.15) pour les arbres à pollinisation croisée (Hamrick and Godt, 1990).

Dans le même sens, l'analyse de l'AMOVA a montré la présence d'une différenciation génétique importante entre les populations d'arganier, ainsi 42% de la diversité est partagée entre les populations.

Le niveau de différenciation élevé chez les populations d'arganier est le produit d'interaction de différents facteurs tel que la distribution géographique, le mode de reproduction (majoritairement entomogame) ainsi que la dérive génétique ou l'isolation génétique de ses populations. La distribution géographique est l'un des principaux facteurs qui influent sur la diversité génétique d'une espèce. (Hamrick and Godt, 1990) suggèrent que l'endémisme et les distributions limitées des populations au sein d'une espèce donnée favorisent cette différenciation génétique élevée. *Argania spinosa* L. est une espèce entomogame où les insectes interviennent pour 60% (Bani-Aameur et al., 1999b). Les espèces automogames maintiennent généralement une faible variation génétique au sein des populations et une forte différenciation génétique entre les populations, et inversement chez les espèces allogames (Affre et al., 2003). Cependant, le flux de gène reste limité ($Nm=0.92$) et cela peut être justifié par les barrières géographiques qui peuvent rendre la dispersion du pollen plus difficile. En effet, dans ce modèle, on peut imaginer un brassage génétique qui se fait de proche en proche, ce qui augmente la diversité intra-population et diminue la diversité inter-population de telle manière à ne pas avoir les mêmes structures ou recombinaisons génétiques d'une population à une autre plus éloignée ou située dans des zones isolées.

Plusieurs techniques et paramètres sont mises en œuvre afin de permettre l'évaluation de la structuration de la diversité génétique à différents niveaux d'organisation de l'espèce. En fait, il s'agit d'illustrer de manière hiérarchique la variabilité génétique et biogéographique des populations étudiées.

D'abord, on a eu recours à l'indice de similarité et à la distance génétique, dont le but est d'estimer le degré de similarité ou de dissimilarité entre les populations ; deux à deux. Les distances génétiques entre paires de populations ont été calculées selon la méthode classique basée sur les fréquences alléliques de chaque population en optant pour la distance non biaisée de Nei (1987). Les paramètres calculés ont révélé que les distances génétiques de Nei varient de 0.0171 entre Retmana (RT) et Ouled Haj (OH) (populations de la même région biogéographique) à 0.145 (OH) et (BS). Cette dernière se trouvant dans les plateaux de l'orientale est aussi géographiquement éloignée des autres populations.

Ensuite, une deuxième approche a été adoptée, il s'agit d'une analyse typologique par la méthode UPGMA basée sur la distance génétique de Nei, précédemment estimée. Cette approche a permis de regrouper toutes les 24 populations en 2 Clusters ; le premier est subdivisé en 4 sous-groupes sans pour autant prendre en considération la situation géographique de ces populations car ce cluster comporte aussi bien des populations de la

région Saharienne du pays que les reliques du Nord qui s'avèrent génétiquement proches mais géographiquement éloignés des autres populations.

Afin, de comprendre d'avantage l'origine de la structuration de la diversité génétique entre populations, une comparaison de la matrice de la distance génétique et de la distance géographique a été effectuée dans le but d'évaluer leur corrélation. Pour cela, le test de Mantel a été réalisé et le résultat obtenu montre clairement que les deux distances sont corrélées positivement mais il y a absence de corrélation significative ($r=0.065$; $p=0.05$).

En se basant toujours sur la distance génétique de Nei, une analyse des composantes principales a été construite, qui à son tour montre que les 24 populations étudiées peuvent être divisées en deux pools génétiques.

En effet, il est primordial de comprendre les relations génétiques entre les différentes populations d'*Argania spinosa* L. ; cela dans le but de pouvoir conserver et d'exploiter une importante partie de ses ressources génétiques.

Globalement, la classification hiérarchique des populations d'arganier par l'arbre UPGMA et l'analyse des composantes principales montre clairement que la structure génétique des populations est corrélée avec la proximité géographique. Toutefois, il y a des populations qui sont proches génétiquement, mais qui sont loin géographiquement tel que BS avec les populations de la région de l'arganier, mais cela peut être expliqué par différents mécanismes comme les mécanismes de dispersion des graines ou par l'échange de semences entre les différentes régions. En effet, la structure génétique des populations des plantes reflète généralement les interactions de différents processus évolutifs, y compris l'histoire évolutive à long terme de l'espèce (tel que la fragmentation de l'habitats et l'isolement de la population), ainsi que la dérive génétique, les mutations et la sélection (Hamrick and Godt, 1996a; Schaal et al., 1998; Slatkin, 1987). Par conséquent, le développement de la structure génétique au sein et entre les populations de l'arganier dans son aire de répartition est fortement associé au flux de gènes causé par le mouvement de pollen et des graines.

Conclusion

Ce chapitre a permis d'apporter de nouvelles données sur la structuration de la variabilité génétique des populations d'arganier dans son aire de répartition naturelle.

C'est la 1^{ère} étude de la diversité en se basant sur les marqueurs génétiques neutres de type ISSR et couvrant toute l'aire de répartition de cette espèce. Les résultats obtenus montrent que les populations de la région de l'Arganier sont les populations les plus diversifiées pour tous

Chapitre I

les paramètres génétiques, et particulièrement la population de Rbai. L'analyse des profils multilocus a montré une structuration génétique très élevée des 24 populations étudiées ($G_{st}=0.35$, $AMOVA=0.42$, $N_m=0.92$). Une structuration qui n'est pas corrélée avec la distance géographique ($r=0.065$, $P=0.05$). D'autres part, les différentes méthodes d'Analyse notamment l'PCoA et UPGMA ont permis de diviser la diversité en deux pools génétiques, de telle manière à utiliser ces données comme base pour construire des collections ou germoplasmes.

Néanmoins, il est nécessaire d'étudier la diversité et la structuration de cette espèce en utilisant des marqueurs co-dominants afin de compléter les données apportées dans ce chapitre avant de procéder à la conception de la core collection pour une effective stratégie de conservation.

Chapitre II :

Structuration de la variabilité génétique des populations d'Arganier via les marqueurs moléculaires SSR

Chapitre II : Structuration de la variabilité génétique des populations d'Arganier via les marqueurs moléculaires SSR

Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude de la diversité génétique de l'espèce *Argania spinosa* L. afin de pouvoir établir sa structuration. Comme nous avons pu voir précédemment avec les marqueurs ISSR, cette espèce présente un taux de polymorphisme important alors qu'elle s'étend sur une aire de répartition géographique très limitée. Pour étudier la structuration de sa diversité, nous avons opté pour des marqueurs co-dominants de type SSR. Treize paires d'amorces SSR sont utilisées dont certaines spécifiques de l'espèce *Argania spinosa* L. et d'autres utilisées sur des sapotacées. L'étude a porté sur un sous-échantillon de notre collection totale provenant de toutes les populations précédemment échantillonnées et donc couvrant toute l'aire de répartition de l'arganeraie marocaine.

L'objectif de l'étude est de cartographier la diversité génétique de *Argania spinosa* L. en se basant sur les profils de marqueurs microsatellites et d'examiner la structuration de cette diversité à l'échelle de sa distribution naturelle ce qui permettra une amélioration des stratégies de conservation et une authentification du germoplasme. Ce travail a été effectué moyennant différents logiciels comme le R et STRUCTURE et ce afin de cerner les zones géographiques prioritaires pour les programmes de conservation.

Les résultats de ce chapitre font l'objet d'un article “ **Genetic diversity and population structure of the endangered argan tree (*Argania spinosa* L. Skeels) in Morocco as revealed by SSR markers: Implication for conservation**” soumis auprès d'Australien Journal of Crop Science”.

1. Analyse de la diversité génétique observée

Notre étude a commencé par un screening initial des amorces SSR disponibles sur la littérature de l'arganier. Aussi, sur un total de 20 amorces non spécifiques de l'Arganier qui ont été utilisées par Majourhat et *al.* (2008), nous en avons sélectionné 8 (MH04, MVpCIRE05, MH06, MH12, MH20, MH08, MVpCIRE11 et MH07). En plus, sur les 11 amorces développées spécifiquement sur l'arganier par El Bahloul et *al.* (2014), nous avons choisi 5 amorces (ASMS01, ASMS20, ASMS₂₀₁₂04, ASMS₂₀₁₂34 et ASMS₂₀₁₂37) présentant un polymorphisme élevé (Tableau 10). En effet, l'ensemble des amorces utilisées (13) ont permis d'obtenir des profils polymorphes, clairs et reproductibles avec des tailles de fragments variables de 121 à 324pb (Figure 22).

Tableau 10: Description des *loci* SSR

Locus	Motif répétitif	Nombre d'allèle générés	Tailles des fragments (pb)	F_{is}	An	PIC
ASMS01	(CT) ₁₁ (CA) ₁₇	29	143-178	0.085	0.025	0.937
ASMS20	(CT) ₁₄	34	121-250	0.115	0.065	0.908
ASMS ₂₀₁₂ 04	(CTT) ₇	35	167-323	0.075	0.068	0.883
ASMS ₂₀₁₂ 34	(AG) ₁₆	34	199-324	0.088	0.058	0.913
ASMS ₂₀₁₂ 37	(AG) ₁₅	32	180-314	0.086	0.065	0.917
MH07	(CT) ₁₂	8	125-151	0.171	-0.001	0.581
MH04	(TG) ₇	13	161-196	0.117	0.003	0.753
MH06	(GA) ₁₄	14	158-195	0.229	0.058	0.769
ME11	(CT) ₉ (AC) ₆	9	224-240	0.400	0.269	0.488
MH20	(GA) ₁₃	10	136-165	0.161	0.100	0.773
MH08	(CT) ₁₁	12	173-200	0.366	0.329	0.82
ME05	(GT) ₁₀	6	245-258	0.191	0.127	0.723
MH12	(CT) ₂₃	9	189-211	0.128	0.213	0.663
Moyenne		18.846	121-324	0.170	0.106	59.874

Avec : pb : paire de base ; F_{is} : indice de fixation ; An : fréquence d'allèles nuls ; PIC : Indice de polymorphisme

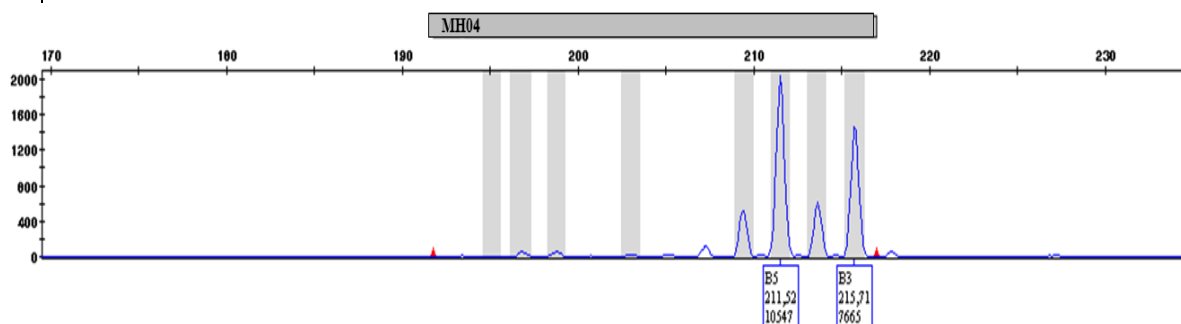


Figure 22: Exemple de profil SSR obtenu après amplification par l'amorce MH04

Chapitre II

Les 13 amorces utilisées ont permis l'amplification de 240 individus et ont généré un total de 245 allèles dans les 4 régions biogéographiques (Région du Nord, Région Saharienne, Région des Montagnes atlasique, et la région d'Arganier).

L'analyse descriptive des profils obtenus a révélé un nombre d'allèles élevé chez 4 *loci* spécifiques à l'arganier (ASMS01, ASMS20 ; ASMS2012_34, ASMS2012_37) avec un maximum de 35 allèles (ASMS20) et un minimum de 6 allèles (ME05). Le nombre moyen d'allèles est de 18.84 allèles par locus.

Afin de s'assurer du bon choix des *loci* utilisés, leur fiabilité est testée par le calcul des indices de fixation et les fréquences des allèles nuls. Le seuil de fréquence de 0,19 est considéré pour expliquer la présence d'allèles nuls (Chapuis et al., 2008)

L'indice de fixation varie de 0.085 (ASMS01) à 0.400 (MH11) décrivant ainsi un déficit en hétérozygotie. La fréquence des allèles nuls pour l'ensemble des 13 *loci* varie de 0.025 (ASMS20) à 0.328 (MH08). On remarque que seul 3 *loci* non spécifiques de l'arganier (MH12, MH08, ME11) présentent des fréquences supérieures au seuil témoignant de la présence d'allèles nuls et ainsi expliquant les déficits en hétérozygotie observés.

L'indice de polymorphisme (PIC) varie de 0.488 (ME11) à 0.937 (ASMS01) témoignant du polymorphisme des *loci* microsatellites utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des populations étudiées.

Tableau 11: Nombre d'allèles par population et par locus

	Région 1										Région 2								Région 3			Région4		Nbr total d'allèles	
	RT	OH	JK	MR	RB	TS	NK	AI	TM	TO	OL	TZ	AD	MZ	AO	IZ	DT	AB	TA	LA	GU	AZ	OG		BS
ASMS01	7	10	13	14	13	11	14	11	8	12	9	9	7	10	12	11	13	9	12	11	6	10	9	8	29
ASMS20	17	12	11	14	10	10	7	11	9	9	8	10	8	6	10	9	6	12	11	12	1	11	10	9	34
ASMS ₂₀₁₂ 04	11	9	10	10	8	10	8	10	9	11	10	9	11	8	9	10	9	10	7	11	7	14	5	6	35
ASMS ₂₀₁₂ 34	14	13	8	11	10	11	9	10	12	10	9	13	10	11	7	7	7	10	9	13	3	11	7	6	34
ASMS ₂₀₁₂ 37	10	7	9	10	10	8	10	9	9	9	10	10	11	11	11	11	11	12	10	15	7	11	9	9	32
MH07	3	3	4	3	3	4	3	4	3	3	4	4	2	3	4	2	3	2	4	5	3	3	3	4	8
MH04	8	6	6	4	6	6	7	8	5	6	7	6	5	7	8	4	5	5	5	4	2	2	2	2	13
MH06	4	5	4	4	3	3	3	2	3	4	5	5	7	5	3	3	5	8	4	5	3	3	2	2	14
ME11	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	6	4	4	9
MH20	3	3	3	3	3	5	5	5	4	5	3	3	5	3	4	4	4	3	4	5	5	6	5	4	10
MH08	1	3	2	4	2	4	4	4	4	6	4	4	5	6	3	3	3	5	2	9	2	4	4	3	12
ME05	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	4	4	4	4	4	5	4	3	4	4	1	2	3	2	6
MH12	4	3	3	4	5	4	5	3	5	6	3	3	3	3	4	3	4	1	4	5	3	4	3	4	9
Nbr d'allèles total	88	80	79	87	102	82	80	82	75	86	78	82	79	79	81	74	76	82	78	79	46	85	66	63	
Moyenne	6.7692	6.153	6.076	6.692	3.076	6.3077	6.153	6.3077	5.769	6.6154	6	6.3077	6.076	6.0769	6.2308	5.6923	5.8462	6.3077	6	7.8462	3.5385	6.5385	5.0769	4.8462	18.8462
Ecat-type	4.952	3.738	3.707	4.404	3.707	3.2502	3.508	6.6144	3.296	3.3301	2.915	3.4733	3.277	3.148	3.419	3.449	3.3128	4.008	3.4157	4.099	2.0662	3.992	2.782	2.5445	11.7462

2. Analyse de la diversité au niveau intra et inter-populations

L'analyse des différents paramètres de diversité génétique au niveau intra et inter-population a été effectuée avec le Logiciel R. Il s'agit du nombre d'allèles moyen par locus (N_a), de l'estimation de la richesse allélique (R), de l'hétérozygotie observée et attendue (H_o et H_e) et aussi de l'indice de fixation (F_{is}). Les résultats obtenus sont résumés dans le (tableau 12).

Tableau 12: Estimation des indices de diversité génétique par marqueurs microsatellites

Régions	Populations	N	N_a	R	H_o	H_e	Ecart-type d' H_e	F_{is}
Région 1		100	6.292	6.469	0.701	0.769	0.142	0.089
	Retmana	10	6.769		0.715	0.738	0.260	0.031
	Ouled Lhaj	10	6.154		0.746	0.753	0.158	0.010
	Jbel Kourati	10	6.077		0.654	0.727	0.175	0.100
	Mramer	10	6.692		0.766	0.777	0.175	0.014
	Rbai	10	6.077		0.677	0.734	0.211	0.078
	Tamsart	10	6.308		0.685	0.706	0.216	0.031
	Neknafa	10	6.154		0.722	0.754	0.248	0.042
	Ait Issi	10	6.308		0.677	0.699	0.282	0.031
	Tamanar Nord	10	5.769		0.654	0.680	0.275	0.038
	Timzgidah Oufetass	10	6.615		0.654	0.721	0.267	0.094
Région 2		90	6.060	6.059	0.632	0.763	0.162	0.173
	Oulcadi	10	6.000		0.638	0.725	0.226	0.119
	Tizinit Est	10	6.308		0.669	0.752	0.145	0.110
	Admine	10	6.077		0.508	0.630	0.292	0.194
	Mnizla	10	6.077		0.646	0.743	0.157	0.130
	Aoulouz	10	6.231		0.738	0.756	0.162	0.023
	Imouzzer	10	5.692		0.585	0.728	0.157	0.196
	Doutana	10	5.846		0.631	0.702	0.202	0.101
	Ait Baha	10	6.308		0.592	0.679	0.306	0.127
	Tafraout	10	6.000		0.677	0.755	0.147	0.103
Région 3		30	5.974	5.384	0.5692	0.723	0.163	0.213
	Lakhssas	10	7.846		0.723	0.773	0.169	0.065
	Guelmim	10	3.538		0.392	0.511	0.287	0.233
	Assa Zag	10	6.538		0.592	0.722	0.204	0.179
Région 4		20	4.962	4.962	0.5346	0.6734	0.23	0.206
	Oued Grou	10	5.077		0.631	0.673	0.205	0.063
	Beni Znassen	10	4.846		0.438	0.645	0.250	0.320

N : nombre d'individus, N_a : Nombre d'allèles moyen par locus, R : Indice de richesse allélique, H_o : Hétérozygotie observée, H_e : Hétérozygotie attendue calculée à partir des fréquences alléliques/ $F_{is} = (H_e - H_o) / H_e$

Chapitre II

La diversité génétique allélique observée diffère aussi en fonction des groupes géographiques. Le nombre total d'allèles détectés va de 129 (Région4) à 818 (Région2) (Tableau 13). Cependant le nombre d'allèles est fortement dépendant de la taille des échantillons, qui varie en fonction du nombre d'accessions par région. La notion de richesse allélique, développée par El Mousadik et Petit (1996), permet de corriger ce biais par l'estimation du nombre d'allèles attendus dans un échantillon de taille donnée.

Dans notre étude, le nombre moyen d'allèles varie de 3.538 à Guelmim à 7.846 pour Rbai au niveau des populations et de 6.469 à 4.961 pour les régions.

Aussi, les valeurs obtenues du paramètre Fis qui mesure la réduction de l'hétérozygotie des individus à l'intérieur de leur population sont toutes positives, variant de 0.010 à 0.320. L'hétérozygotie observée est inférieure à l'hétérozygotie attendue selon les fréquences alléliques sous l'hypothèse de l'équilibre d'Hardy-Weinberg. Ce dernier repose sur les principes de la panmixie, c'est-à-dire la participation de tout individu de la population ou sous population à la procréation. Cet équilibre est observé si les Fis sont nuls. Or les valeurs Fis sont toutes positives et significatives pour toutes les populations, cela montre l'écart aux proportions de Hardy Weinberg.

Concernant les autres paramètres de diversité, les résultats obtenus pour l'hétérozygotie observée et l'hétérozygotie attendue entre les populations (H_e) varie de 0.511(GU) à 0.777 (MR) entre les populations et de 0.673 à 0.769 entre les régions. Alors que H_o varie de 0.392 à 0.766 pour les populations et de 0.534 à 0.701 pour les régions.

Aussi, les marqueurs SSR ont permis de détecter un certain nombre d'allèles privés, et ce dans différents groupes géographiques. Ainsi, un total de 67 allèles privés a été détecté chez 20 populations des quatre régions géographiques. La région d'arganier et particulièrement la population de Mramer a montré le nombre le plus élevé avec 12 allèles privés. Une description détaillée de ces allèles est résumé dans le tableau 13.

Tableau 13: Nombre d'allèles privés par locus et par région géographique

	Région1	Région2	Région3	Région4	Nombre Total d'allèles spécifiques
Nombre d'individu dans chaque Région	100	90	30	20	
ASMS01	4	1	0	1	6
ASMS20	5	0	1	2	8
ASMS ₂₀₁₂ 04	5	5	6	0	16
ASMS ₂₀₁₂ 34	1	6	1	2	10
ASMS ₂₀₁₂ 37	4	4	1	1	10
MH07	1	0	0	0	1
MH04	1	2	0	0	3
MH06	1	4	1	0	6
ME11	0	0	1	2	3
MH20	0	0	0	0	0
MH08	0	0	0	2	2
ME05	0	0	0	0	0
MH12	2	0	0	0	2
Nb_T d'allèles spécifiques dans chaque Région	24	22	11	10	67

3. Analyse de la différenciation génétique

La valeur de la différenciation génétique globale observée entre les populations est modérée et significative ($F_{st}=0.170$) et varie de 0.028 à 0.203 alors qu'au niveau des groupes géographiques les valeurs varient de 0.0172 à 0.0507 (Tableau 14).

Tableau 14: Différenciation génétique au sein de chaque paire de groupe géographique

	Région1	Région2	Région3	Région4
Région1	0			
Région2	0,0172	0		
Région3	0,0430	0,048	0	
Région4	0,0408	0,0507	0,0265	0

Tableau 15: Différentiation génétique entre paire de populations (Fst)

	RT	OH	JK	MR	RB	TSt	NK	AI	TM	TO	OL	TZ	AD	MN	AO	IZ	DT	AB	TA	LA	GU	AZ	OG	BS
RT	0																							
OH	0.058	0																						
JK	0.067	0.031	0																					
MR	0.060	0.031	0.026	0																				
RB	0.077	0.050	0.028	0.031	0																			
TSt	0.090	0.078	0.087	0.084	0.083	0																		
NK	0.091	0.084	0.098	0.090	0.095	0.044	0																	
AI	0.109	0.092	0.105	0.108	0.110	0.056	0.050	0																
TM	0.094	0.077	0.093	0.093	0.094	0.034	0.041	0.034	0															
TO	0.087	0.081	0.092	0.088	0.095	0.039	0.044	0.053	0.035	0														
OL	0.081	0.050	0.050	0.046	0.059	0.081	0.095	0.114	0.107	0.086	0													
TZ	0.066	0.040	0.048	0.038	0.057	0.066	0.077	0.096	0.078	0.072	0.031	0												
AD	0.123	0.091	0.088	0.088	0.091	0.094	0.112	0.132	0.112	0.097	0.060	0.074	0											
MN	0.081	0.051	0.058	0.043	0.059	0.089	0.084	0.113	0.095	0.077	0.047	0.047	0.073	0										
AO	0.073	0.038	0.063	0.050	0.070	0.087	0.085	0.105	0.091	0.074	0.057	0.044	0.083	0.047	0									
IZ	0.093	0.073	0.076	0.067	0.079	0.063	0.054	0.080	0.065	0.054	0.067	0.054	0.070	0.060	0.053	0								
DT	0.091	0.068	0.089	0.077	0.094	0.079	0.090	0.104	0.087	0.071	0.092	0.068	0.118	0.088	0.043	0.071	0							
AB	0.094	0.080	0.091	0.077	0.088	0.067	0.071	0.099	0.072	0.063	0.080	0.057	0.063	0.070	0.061	0.037	0.083	0						
TA	0.082	0.043	0.057	0.061	0.067	0.076	0.084	0.087	0.075	0.067	0.056	0.051	0.068	0.055	0.039	0.051	0.060	0.060	0					
LA	0.077	0.063	0.079	0.072	0.080	0.084	0.076	0.097	0.092	0.084	0.083	0.065	0.118	0.071	0.067	0.087	0.083	0.086	0.070	0				
GU	0.186	0.181	0.198	0.174	0.194	0.191	0.167	0.196	0.192	0.186	0.184	0.145	0.211	0.174	0.160	0.157	0.203	0.159	0.164	0.109	0			
AZ	0.110	0.107	0.111	0.103	0.110	0.113	0.100	0.129	0.122	0.113	0.127	0.099	0.156	0.117	0.109	0.114	0.124	0.112	0.117	0.050	0.127	0		
OG	0.094	0.097	0.113	0.104	0.122	0.126	0.115	0.146	0.137	0.126	0.128	0.101	0.164	0.118	0.105	0.137	0.128	0.133	0.122	0.043	0.158	0.054	0.000	
BS	0.132	0.131	0.141	0.126	0.135	0.127	0.120	0.145	0.138	0.131	0.142	0.112	0.174	0.138	0.129	0.133	0.146	0.124	0.134	0.060	0.124	0.041	0.070	0.000

Les résultats de l'analyse moléculaire de la variance (AMOVA) pour les marqueurs SSR sont hautement significatifs et ont montré que 10% de la variabilité a été attribuée entre les régions, 12% entre les populations dans les régions alors qu'une valeur de 78% est attribuée au niveau intra-populations.

Tableau 16: Analyse moléculaire de la variance parles marqueurs SSR

Sources	d.f	SS	Est. Var	%V	P-value
Inter-région	3	283,318	1,282	10%	0<0.001
Inter-population	20	528,503	1,628	12%	0<0.001
Intra-Population	216	2191,100	10,144	78%	0<0.001

df : degré de liberté ; *SS* : Somme des carrés ; *Est. Var* : Estimation de la variance ; *%V* : Pourcentage de variation.

4. Structuration de la diversité génétique

4.1. Classification hiérarchique

La construction de l'arbre UPGMA ci-après est faite à partir des valeurs *Fst* entre paires de populations. La matrice *Fst* a été utilisée comme distances génétiques.

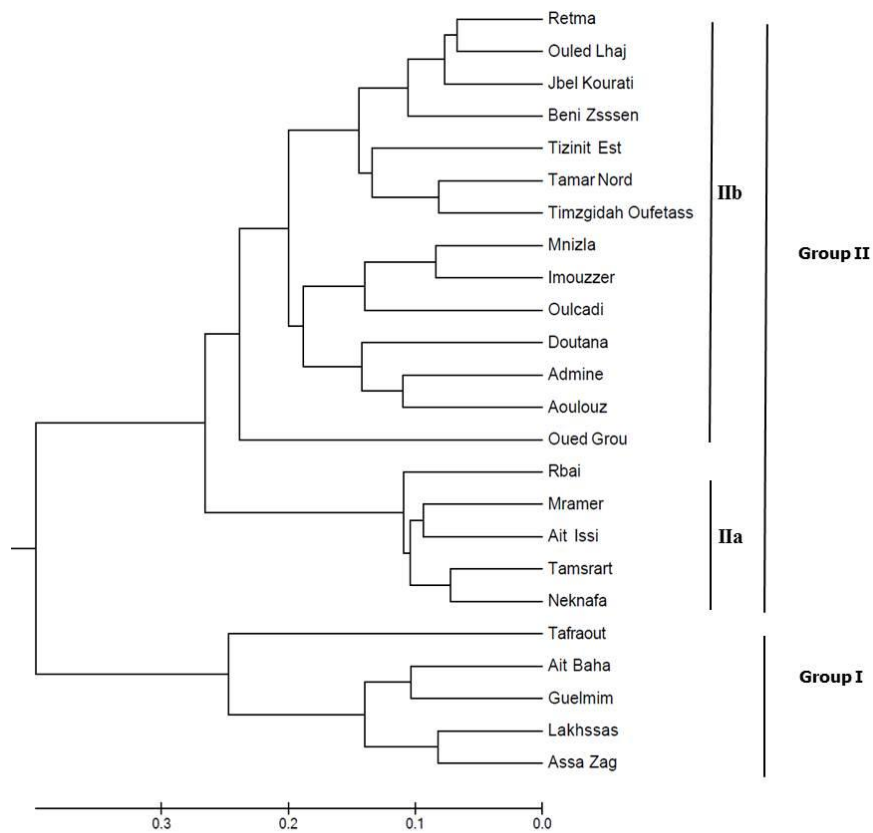


Figure 23: Classification UPGMA des 24 populations en se basant sur la matrice *Fst*

La classification hiérarchique UPGMA montre que les populations du Sud se montrent éloignées du point de vue distance génétique. Mais en général, les populations se regroupent selon leur région sauf pour la population de Beni Snassen qui se rapproche des populations de la région de l'arganier. La séparation entre la région Sud et le reste des populations peut être expliquée par les barrières géographiques qui les séparent induisant un faible flux de gènes entre les populations de ces régions (Figure 23).

4.2. Isolement génétique par la distance

L'analyse de la matrice de différentiation F_{st} a montré que les populations étudiées sont différenciées et surtout les populations du Sud. Cette différenciation peut être expliquée par la distance géographique des populations étudiées.

Dans cette partie, une corrélation entre les valeurs de F_{st} et les distances géographiques des populations étudiées, ceci en se basant sur la matrice F_{st} 2 à 2 entre les populations, et la matrice des distances géographiques a été établie. (Rousset, 1996).

Cela a été réalisé via le test de Mantel, qui révèle une corrélation positive et significative entre les populations génétiques et géographiques avec un coefficient de corrélation ($R_{xy}=0.241$) et une probabilité associée de 0.001. L'indice de différenciation augmente avec la distance (Figure 24).

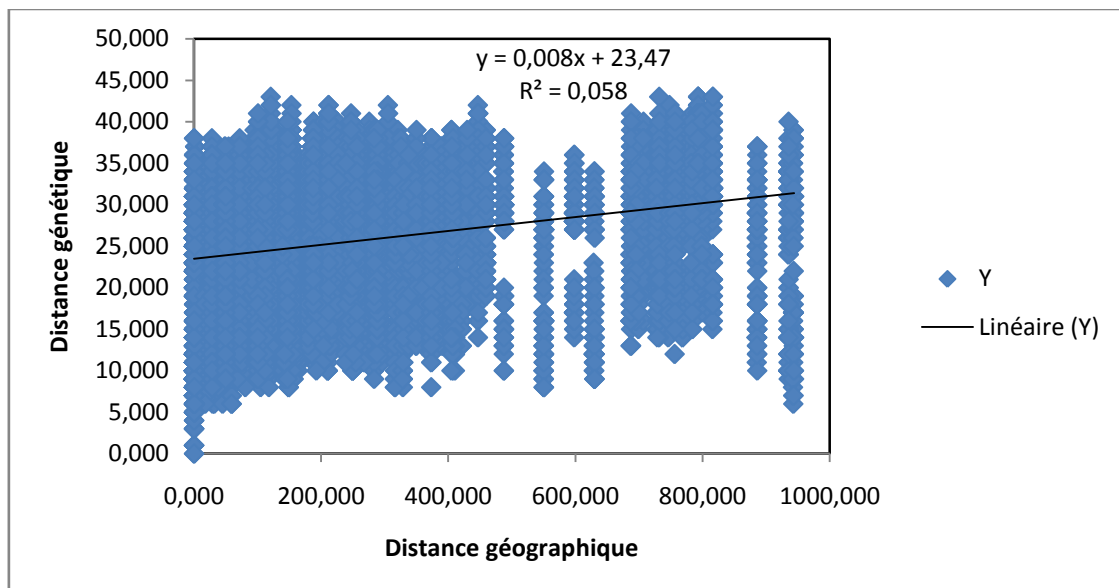


Figure 24: Test de Mantel pour les 24 populations par les marqueurs SSR.

4.3. Analyse des Composantes Principales

Cette analyse a été effectuée en prenant la matrice de Fst 2 à 2 comme distances génétiques entre populations et montre que 50.38% de la diversité est justifié par les deux premiers axes (Axe 1= 30.53%, axe 2= 19.85%). Cette projection est en parfait accord avec les résultats obtenus de la classification hiérarchique où les populations du Sud se montrent très différentes des autres populations par l'axe 2. Et les deux sous-groupes du groupe II sont séparés par l'axe 1 (Figure 25).

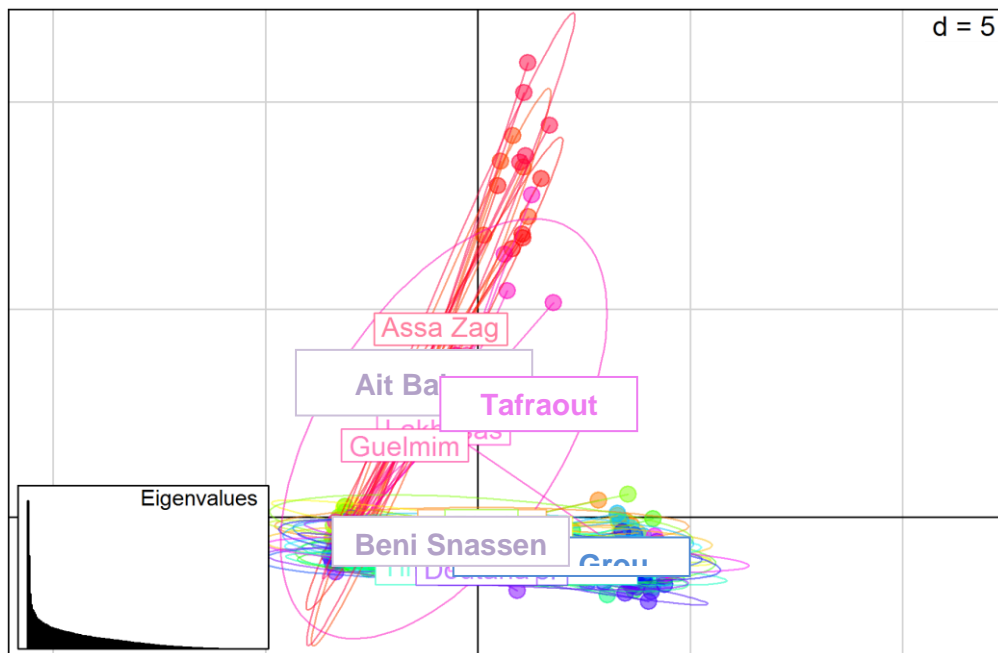
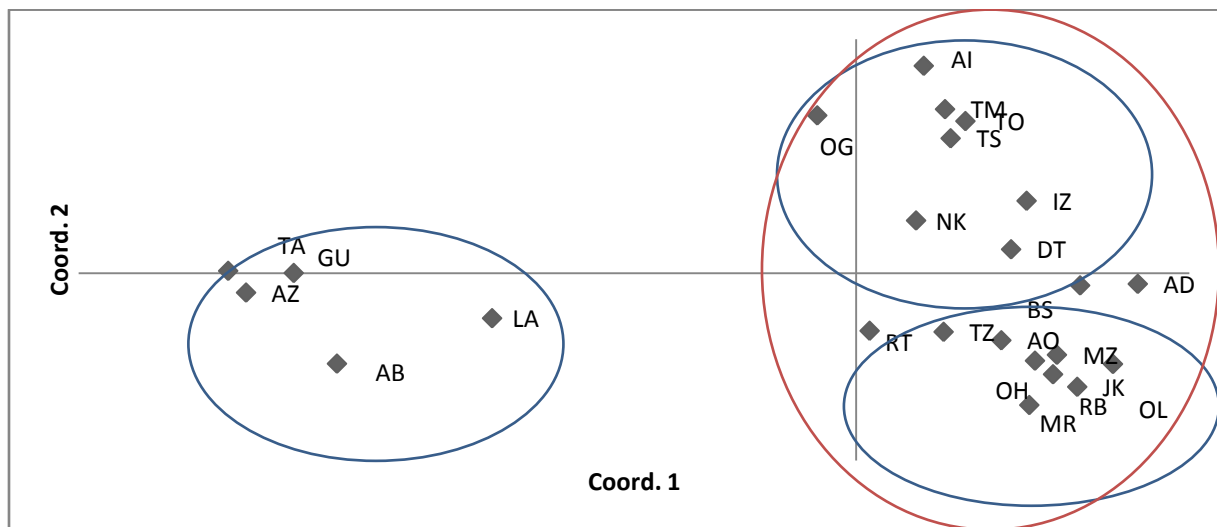


Figure 25: ACP représentant les populations échantillonnées par GenAlex et par le R.

4.4. Analyse Bayésienne de regroupement

L'analyse bayésienne a été conduite sur la base des 24 populations d'*Arganiaspinosa* L. La procédure d'Evanno (2005), qui permet d'évaluer le nombre probable K de cluster en se basant sur ΔK , montre que la structure génétique la plus représentative est obtenue avec K=2 ($\Delta K=334.2511$) et donc divise les populations en deux pools génétiques distincts confirmant ainsi les résultats obtenus par la classification hiérarchique.

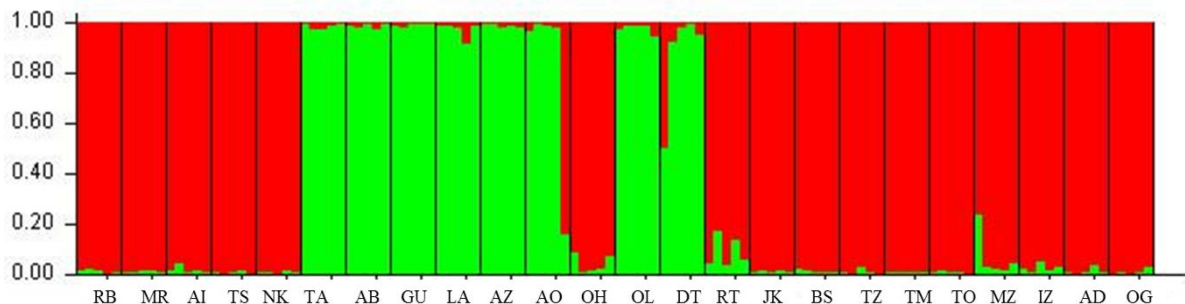
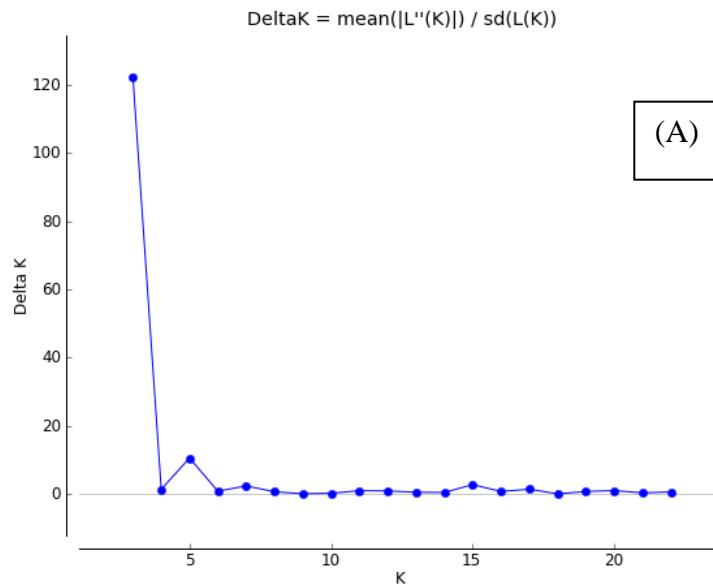


Figure 26: (A) : Différentes valeurs de ΔK pour déterminer le nombre de populations supposées (K) selon la méthode Evanno (2005) (B) : Histogramme des coefficients de membership pour les populations étudiées selon le logiciel STRUCTURE.

Le nombre de groupe K=2 a été choisi comme définissant le mieux la structure génétique des populations d'arganier, sur la base du paramètre ΔK d'Evanno. Avec ce modèle, les groupes sont les suivants :

- Cluster 1 « rouge » : renferme les population (Mramer, Rbai, Ait Issi, Tamestrat, Neknafa, Ouled Haj, Retmana, Jbek Kourati, Besni Snasse, Tiznit, Tamarr,

Timzghidah Oufetass, Mnizla, Imouzzer, Admine et Oued Grou, en gros ce cluster renferment les populations des régions 1 et 4. ;

- Cluser 2 « vert » : contient les populations de : Tafraout, Ait Baha, Guelmim, Lakhssas, Assa Zag, Aoulouz, Oulkdai, Et Doutana, donc les populations des régions 2 et 3.

L'analyse par le logiciel STRUCTURE suivant le modèle sans admixture a donné deux types de cluster. Ces clusters sont définis à priori par le modèle selon le principe des proportions de Hary-Weinberg sur les fréquences alléliques. La (Figure27) montre la tendance des probabilités pour chacun des individus des populations à appartenir à l'un des deux clusters (vert ou rouge) définis à posteriori.

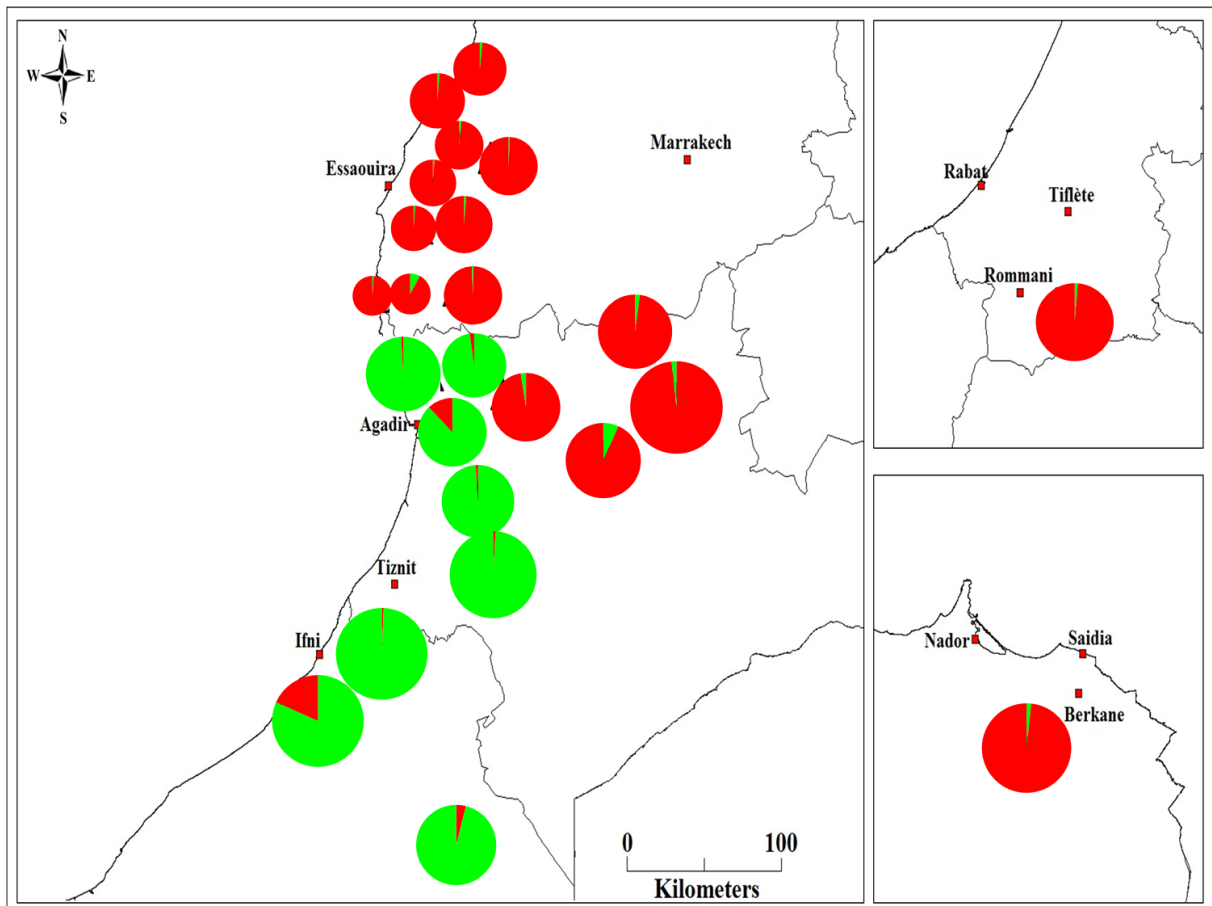


Figure 27:Répartition spatiale des populations d'*Argania spinosa* L. selon leur assignation à l'un des deux clusters.

On considère qu'une population est assignée à un cluster quand sa probabilité d'appartenance à ce cluster est supérieure à 0.70. Lorsque les probabilités d'affectation sont inférieure à cette valeur, on considère que les populations sont en « admixture » : le génotype

provient alors de recombinaisons entre plusieurs clusters. Au total, les 24 populations sont clairement assignées, affectées à un cluster, vue que leur probabilité d'assignation est supérieure à 0.70. Et donc, on remarque que les populations du Sud ont une forte probabilité d'appartenir au pool génétique vert contrairement aux populations de la région de l'arganier et de la régions Nord qui montre une forte tendance à appartenir au pool génétique rouge.

Discussion

Les études de diversité et de structuration génétique jouent un rôle très important dans l'établissement de stratégie de conservation effective. En effet, une grande diversité génétique permet une bonne adaptation à un nouvel environnement vue que les populations avec plus de variabilité ont tendance à posséder plus d'allèles capables de s'adapter à un changement environnemental (Groom et al., 2005; Hamrick and Godt, 1996b; Xing et al., 2014).

Depuis quelques années, les populations d'*argania spinosa* L. connaissent un déclin alarmant dans leur superficie et sont de plus en plus dégradées (le Polain de Waroux and Lambin, 2012). C'est l'un des facteurs qui a grandement influencé la structure et la répartition de la diversité génétique dans son aire de distribution naturelle.

Dans ce chapitre, treize paires de marqueurs SSR ont été utilisés sur un sous-échantillon de la collection totale précédemment évaluée par les marqueurs ISSR. Et donc cette fois, notre étude a concerné un total de 240 individus (à raison de 10 arbres sur les 24 populations précédemment étudiées et réparties sur 4 régions biogéographiques). Ces amorces ont permis l'amplification de 245 allèles dans les 4 régions biogéographiques avec une moyenne de 18.84 allèles/locus. Elles sont toutes hautement informatives avec des valeurs de PIC élevé témoignant de leur polymorphisme et dont 3 non spécifiques de l'arganier présentent des allèles nuls pouvant expliquer les déficits en hétérozygoties observés de ces *loci*.

Aussi, l'évaluation de la diversité génétique des populations d'*Argania spinosa* L. a montré, que les populations de la région 1 qui est aussi la région de l'arganier sont très diversifiées et renferment le taux le plus élevé des allèles uniques (12 allèles spécifiques à la région Rbai en particulier). Aussi, par rapport à d'autres espèces endémiques, notre espèce présente un taux de diversité élevé avec une hétérozygotie attendue (H_e) moyenne de 0.712 au niveau des populations et de 0.732 au niveau des régions géographiques, et une hétérozygotie observée (H_o) de 0.642 au niveau des populations. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus pour des espèces qui se trouvent dans des populations pas encore exploitées : cas de

Chapitre II

Swietenia macrophylla (Lemes et al., 2003) endémique de l'Amérique Centrale, de *Grevillea macleayana* (England et al., 2002) endémique de Queensland et aussi de l'espèce *Caryocar brasiliens* du Brésil (Collevatti et al., 2003).

L'indice de fixation est l'indice qui permet la mesure de l'écart entre la population d'individus trouvés à l'état hétérozygote (H_O) et l'état hétérozygote attendu (H_E). Pour la majorité des populations étudiées, elles présentent des indices de fixation (F_{IS}) positifs plus ou moins élevés compris entre ($F_{IS} = 0,010$) pour Ouled Haj et ($F_{IS} = 0,320$) pour Beni Snassen. Ces indices positifs traduisent aussi un déficit en hétérozygotes. Ce déséquilibre peut être due à l'existence d'allèles nuls (Jordana et al., 2003). Ces allèles ne donnant lieu par PCR à aucune amplification. Une délétion au niveau des amorces ou une mutation dans les séquences flanquantes du microsatellite pourraient entraîner la présence d'allèles nuls. L'indice moyen pour la population globale est de 0,170, indiquant un déficit d'hétérozygotes relativement modéré.

Au niveau de la différenciation génétique et en se basant sur l'indice de différenciation (F_{st}), nos résultats ($F_{st} = 0.17$) montrent moins de différenciation que ceux obtenus par (El Mousadik and Petit, 1996c) utilisant les izoenzymes ($F_{st} = 0.25$) sur 9 populations de la même espèce, ainsi qu'aux résultats obtenus aussi bien par Ait Aabid et al., (2015) que par notre précédente étude utilisant les marqueurs ISSR ($G_{st} = 0.35$). Mais, l'arganier reste parmi les espèces angiospermes les plus différenciées et donc la moyenne de différenciation est de ($F_{st} = 0.10$). Cette différenciation a aussi été confirmée par l'analyse moléculaire de la variance (AMOVA) qui montre que 12% de la variabilité totale est attribuée au niveau inter-populations et aussi au flux génique limité ($N_m = 1.29$).

Cette grande différenciation entre les populations peut être le résultat de la combinaison de plusieurs facteurs telle que la distribution géographique limitée, les barrières géographiques entre les populations étudiées limitant ainsi le flux de gènes malgré que les populations soient géographiquement proches, et la faible densité des populations d'Arganier particulièrement celles sous climat Saharien aride. Par conséquent, et malgré le déficit en hétérozygotie noté dans les populations, une forte divergence pourrait s'accumuler rapidement.

D'autant plus que le système de reproduction de l'arganier (Allogame entomophile) et la topographie de la répartition naturelle des populations peuvent expliquer cette structuration génétique très élevée des 24 populations.

Concernant les résultats observés sur la construction de l'arbre hiérarchique, on constate que les 24 populations sont regroupées selon les régions de provenances, sauf pour les populations du Nord (Oued Grou, Beni Snassen) dont la particularité a été déjà remarquée dans l'étude effectuée par marqueurs ISSR. En effet, la projection de l'ACP et la classification hiérarchique permettent de ressortir deux groupes selon la répartition géographique, un groupe avec les populations sous climat aride Saharien et un second groupe avec les populations restantes lui-même réparti en 4 sous-groupes. Ce qui a été aussi montré par l'analyse bayésienne où le nombre de population probable a été estimé à (K=2).

La projection de l'étude de coefficient d'appartenance des individus dans chaque population a permis de montrer clairement la structuration de la diversité génétique de chaque pool par rapport à l'aire de répartition naturelle. Les populations de la région 1 et 4 ont tendance à appartenir au même pool génétique et les populations des régions 3 et 4 ont tendance à appartenir à un autre pool génétique.

Globalement, la structure génétique dans l'aire de distribution naturelle est caractérisée par la différence entre populations du Sud et celle du Nord, ce qui doit être pris en considération lors que l'établissement des stratégies de conservation de cette espèce.

Conclusion

Dans ce chapitre, l'utilisation de marqueurs microsatellites nucléaires dans cette recherche, complémentaire avec l'étude antérieure effectuée sur la diversité globale de l'espèce *Argania spinosa* L. réalisée par le marquage moléculaire ISSR, a fourni davantage d'informations sur la structure de la diversité génétique à l'échelle de sa distribution naturelle, notamment au niveau des populations mais aussi au niveau des régions géographiques. Cela a permis de conclure que la région d'arganier est la région la plus différenciée contenant ainsi le plus grand nombre d'allèles spécifiques, ce qui fait que cette région doit être prioritaire pour l'établissement des stratégies de conservation. Aussi, il est à noter que la forêt d'arganier est une des forêts les plus différenciées des espèces angiospermes, avec un flux de gènes très limité entre les populations.

Egalement, suite à la classification hiérarchique, l'analyse des composantes principales ainsi que l'analyse de regroupement bayésienne, deux pools génétiques ont été distingués pour l'ensemble des populations étudiées ce qui montre la forte structuration de la diversité de cette espèce.

Chapitre II

Dans le cadre de la gestion des ressources génétiques de l'espèce, la sauvegarde du potentiel de diversité résiduelle est une étape importante face à la forte exploitation de cette forêt. Cela peut se faire en *ex situ* ou *in situ* via la core collection, d'où la nécessité de combiner les données des deux marqueurs (ISSR et SSR) en vue de construire une core collection afin d'assurer le maintien de cette diversité.

Chapitre III :

Construction d'une core collection sur la base des données moléculaires ISSR et SSR

Chapitre III : Construction d'une core collection sur la base des données moléculaires ISSR et SSR

Afin d'accroître l'efficacité de la caractérisation et de l'utilisation des ressources en matériel génétique, le concept de core collection a été introduit et se définit comme un sous-ensemble de la collection totale représentant la diversité génétique maximale contenue dans la collection entière avec un minimum de répétabilité. Une bonne core collection doit minimiser les entrées redondantes et être suffisamment importante pour fournir des conclusions fiables pour l'ensemble de la collection.

La core collection est généralement construite sur la base des caractères morphologiques. Mais avec les avantages de la stabilité, de la précision et de l'indépendance à l'environnement, les marqueurs moléculaires sont de plus en plus utilisés à cet effet (Lee et al., 2016; Ruiz Valcárcel et al., 2013). En adoptant les bonnes stratégies de collectes et les outils bioinformatique appropriés, une évaluation de la diversité génétique pourrait également s'accompagner de la construction d'une core collection.

Dans ce chapitre et après une évaluation et une structuration de la diversité génétique, les données moléculaires obtenues des deux marqueurs moléculaires ISSR et SSR vont être combinées, et une core collection de l'espèce *Arganiaspinosa* L. est obtenue par la stratégie de maximisation qui est la plus utilisée et ce en utilisant le logiciel PowerCore.

1. Homogénéisation des données

La construction de la core collection a été basée sur les données des marqueurs ISSR et SSR préalablement évalués.

Une homogénéisation des données s'est donc imposée, où on a transformé la matrice des données ISSR en une matrice de tailles de fragments avant de la combiner avec la matrice des données SSR. Aussi, nous avons utilisé un ensemble de 240 individus pour la collection initiale vu que les données SSR n'ont pas concerné les 480 individus.

Puis, nous avons évalué la core collection suivant les critères suivants :

- Le nombre de fragments obtenus par les marqueurs ISSR et SSR : C'est le pourcentage des bandes de marqueurs SSR et ISSR amplifiés au niveau de la core collection par rapport à la collection entière.

Chapitre III

- Le taux de coïncidence de l'indice de Shannon : C'est le rapport entre l'indice de Shannon dans la core collection par rapport à la collection entière.
- Le taux de coïncidence de l'indice de Nei : C'est le rapport entre l'indice de Nei dans la core collection par rapport à la collection entière.
- Aussi, la core collection doit renfermer au moins un total de 70% de la diversité génétique de la collection entière.

2. La core collection

En se basant sur la méthode de Maximisation, la core collection obtenue est composée de 66 individus et représentée dans le (Tableau 17).

Le Logiciel PowerCore permet de sélectionner les génotypes les plus diversifiés couvrant donc un maximum d'allèles existant dans la collection initiale. La Core collection obtenue est composée de 66 individus répartis sur 22 populations des 24 populations de la collection totale, soit donc 27% de la collection totale.

Tableau 17: Liste des 66 individus constituant la Core collection obtenus par le Logiciel PowerCore

Nom du Peuplement	Numéro de l'arbre	Longitude	Latitude	Altitude	Nombre de loci
Retmana	RT3	9° 19'28. 0"	32° 02'16. 8"	66	60
Retmana	RT5	9° 19'25. 9"	32° 02'18. 7"	70	64
Retmana	RT8	9° 19'24. 4"	32° 02'21. 0"	70	62
Retmana	RT10	9° 19'22. 1"	32° 02'23. 3"	70	55
Retmana	RT12	9° 19'21. 7"	32° 02'24. 7"	74	62
Ouled Lhaj	OH13	9° 24'04. 4"	31° 56'10. 6"	116	61
Ouled Lhaj	OH20	9° 23'56. 6"	31° 56'08. 8"	125	67
Jbel Kourat	JK5	9° 23'59.9"	31° 47'26. 2"	364	55
Jbel Kourat	JK11	9° 23'58.1"	31° 47'29. 1"	364	56
Mramer	MR4	9°10'03. 9"	31° 38'26. 5"	397	61
Mramer	MR15	9°09'58. 1"	31° 38'36. 8"	376	61
Mramer	MR17	9°09'55. 5"	31° 38'40. 4"	375	68
Rbai	RB1	9° 28'34. 4"	31° 32'07.8"	269	62
Rbai	RB3	9° 28'36. 2"	31° 32'07.9"	274	55
Rbai	RB5	9° 28'38. 6"	31° 32'08.4"	276	62
Rbai	RB12	9° 28'38. 4"	31° 32'03.0"	280	68
Tamesrart	TS8	9° 22'52. 9"	31° 21'34. 2"	550	62
Tamesrart	TS9	9° 22'52. 0"	31° 21'34. 7"	552	58
Tamesrart	TS15	9° 22'46. 3"	31° 21'37. 1"	559	61
Neknafa	NK11	9° 34'02. 8"	31° 19'16. 5"	261	55
Ait Issi	AI9	9° 22'25.1"	31°02'06.8"	989	56
Timzgidah Oufetass	TO2	9° 48'09. 6"	31°00'20."	226	66
Timzgidah Oufetass	TO8	9° 48'12. 6"	31°00'16.9"	204	67
Timzgidah Oufetass	TO12	9° 48'14. 5"	31°00'17.6"	189	67
Timzgidah Oufetass	TO13	9° 48'13. 9"	31°00'18.7"	194	69
Oulcadi	OL12	8° 29'14. 8"	30° 17'17. 7"	1248	67
Oulcadi	OL14	8° 29'17. 9"	30° 17'18. 5"	1238	69
Tizi Ntest	TZ4	8° 23'49. 2"	30° 48'54. 5"	1204	62
Tizi Ntest	TZ15	8° 23'42. 2"	30° 48'55. 2"	1189	68
Tizi Ntest	TZ17	8° 23'44. 2"	30° 48'54. 9"	1202	74
Tizi Ntest	TZ18	8° 23'44. 7"	30° 48'56. 4"	1206	68
Admine	AD6	9° 21'36. 6"	30° 19'57. 8"	83	58
Admine	AD10	9° 21'37. 9"	30° 19'59. 3"	75	63
Admine	AD12	9° 21'41. 3"	30° 20'01. 5"	82	62
Admine	AD17	9° 21'46. 4"	30° 19'59. 6"	90	58
MNIZLA	MZ2	9° 05'39. 7"	30° 33'43. 3"	256	68
MNIZLA	MZ7	9° 05'34. 9"	30° 33'41. 8"	248	61
MNIZLA	MZ16	9° 05'28. 8"	30° 33'49. 4"	249	60
AOULOZ	AO1	9° 06'35. 2"	30° 37'13.1"	804	73
AOULOZ	AO2	9° 06'36. 2"	30° 37'12.9"	803	69
AOULOZ	AO3	9° 06'37. 6"	30° 37'12.7"	803	57

IMOZZER	IZ2	9° 30'52. 3"	30° 39'01. 1"	1105	57
IMOZZER	IZ13	9° 30'48. 1"	30° 39'59. 7"	1110	57
IMOZZER	IZ15	9° 30'46. 2"	30° 39'59. 6"	1093	59
IMOZZER	IZ18	9° 30'44. 1"	30° 39'56. 7"	1050	65
IMOZZER	IZ20	9° 30'49. 6"	30° 39'56. 5"	1040	61
DOUTANA	DT6	9° 13'59. 4"	30° 43'37. 0"	794	63
DOUTANA	DT9	9° 13'59. 5"	30° 43'34. 6"	794	64
Ait Baha	AB8	9° 13' 42, 4"	30° 06' 29,1"	52	60
Tafraout	TA9	9° 03' 29, 7"	29° 42'48, 9"	852	53
Tafraout	TA12	9° 03' 33, 9"	29° 42'45, 1"	847	63
Tafraout	TA14	9° 03' 35, 7"	29° 42'43, 2"	848	53
Tafraout	TA20	9° 03' 31, 6"	29° 42'36, 6"	830	65
Lakhssas	LA2	9° 42' 50, 3"	29° 24' 11, 1"	975	66
Lakhssas	LA4	9° 42' 49, 8"	29° 24' 08, 3"	987	58
Lakhssas	LA6	9° 42' 46, 6"	29° 24' 07, 2"	994	58
Lakhssas	LA8	9° 42' 44, 0"	29° 24' 04, 0"	993	62
Lakhssas	LA13	9° 42' 38, 8"	29° 24' 06, 3"	969	48
Lakhssas	LA17	9° 42' 37, 7"	29° 24' 10, 5"	956	53
Lakhssas	LA20	9° 42' 43, 3"	29° 24' 13, 9"	955	53
Assa Zag	AZ12	9° 25'35, 7"	28° 25'47, 4"	337	57
Oued Grou	OG5	6°22'84.8"	33°27'45.3"	439	62
Oued Grou	OG12	6°22'96.4"	33°27'44.8"	407	57
Oued Grou	OG20	6°23'12.5"	33°27'48.8"	422	52
Benié Snassen	BS14	2°34'206"	34°35'240"	272	56
Benié Snassen	BS20	2°34'258"	34°35'200"	246	57

La distribution des accessions composant la core collection indique qu'il n'y a pas de relation géographique significative entre les accessions de la core collection et la distribution géographique des populations de la collection totale.

3. Evaluation de la core collection

Une évaluation de la diversité génétique de la core collection ainsi que celle de la collection entière ont été établies. Egalement, le rapport entre les deux a été calculé et le résultat est présenté dans le (Tableau 18).

Tableau 18: Mesure de la diversité génétique de la core collection et de la collection totale

Locus	Core Collection			Collection totale			Core/Totale		
	Shannon	Nei	Nbr Bandes	Shannon	Nei	Nbr Bandes	Shannon	Nei	Nbr Bandes
FL2	0.263	0.944	34	0.266	0.944	34	0.986	1.001	1
FL3	0.269	0.946	32	0.274	0.274	32	0.980	3.450	1
FL4	0.290	0.956	24	0.293	0.956	24	0.991	1.000	1
FL6	0.228	0.928	29	0.225	0.922	29	1.013	0.994	1
FL8	0.266	0.932	29	0.271	0.937	29	0.982	0.995	1
FL9	0.187	0.983	52	0.179	0.983	52	1.042	1.000	1
FL10	0.214	0.973	48	0.210	0.974	48	1.020	1.000	1
ASMS01	2.813	0.925	48	2.794	0.924	48	1.007	0.999	1
ASMS20	2.737	0.910	52	2.674	0.903	52	1.023	1.008	1
ASMS_{2012_04}	2.590	0.882	49	2.420	0.856	49	1.070	1.030	1
ASMS_{2012_34}	2.520	0.881	48	2.517	0.889	48	1.001	0.991	1
ASMS_{2012_37}	2.757	0.915	49	2.699	0.913	49	1.021	1.002	1
MH07	1.189	0.608	12	1.093	0.557	12	1.088	1.092	1
MH04	1.708	0.747	23	1.606	0.722	23	1.064	1.035	1
MH06	1.671	0.762	20	1.625	0.752	20	1.028	1.013	1
ME11	1.130	0.592	15	1.008	0.561	15	1.121	1.055	1
MH20	1.493	0.721	17	1.452	0.683	17	0.972	0.947	1
MH08	1.899	0.817	21	1.894	0.813	21	1.003	0.995	1
ME05	1.389	0.701	12	1.336	0.685	12	1.039	1.023	1
MH12	1.562	0.725	17	1.433	0.662	17	1.090	1.096	1
Moyenne	1.359	0.842	631.000	1.313	0.795	631.000	1.027	1.136	1

Une core collection est dite satisfaisante quand elle contient en moins 70% de la diversité contenue dans la collection entière, le (tableau18) expose le nombre d'allèles générés par l'ensemble des marqueurs SSR et ISSR au niveau de la core collection puis au niveau de la collection entière. Il indique que les deux collections présentent le même nombre de bandes amplifiées ce qui signifie que la core collection comporte le maximum d'allèles de la collection entière et donc 100% de la diversité contenue dans la collection totale.

L'indice de Shannon et l'indice de diversité de Nei ont été calculés pour les deux collections également. Quatre marqueurs ISSR (FL2, FL3, FL4, FL8) présentent des valeurs de l'indice de Shannon inférieures chez la collection entière par rapport à la core collection, soit donc un pourcentage de 20% de l'ensemble des marqueurs utilisées.

Chapitre III

Pour ce qui est de l'indice de Nei, 3 *loci*, 2 ISSR (FL8 et FL10) et 1 *loci* SSR (ASMS_{2012_34}) présentent des valeurs de diversité inférieures au niveau de la core collection comparée à la collection entière, soit un pourcentage de 19% des marqueurs utilisés.

Afin de confirmer d'avantage la fiabilité de notre core collection, une collection aléatoire formée de 123 accessions a été conçue en utilisant le même logiciel après 3 répétitions. Le coefficient de similarité entre les individus de la collection réelle et ceux de la collection aléatoire ont été estimés et comparés via le logiciel NTSYS-pc. (Tableau 19). Le coefficient de similarité entre les accessions de la collection réelle varie de 0.018 à 0.63 or chez la collection aléatoire, le coefficient de similarité varie de 0.02 à 0.77. Ceci indique que la diversité génétique chez la collection réelle est plus large que celle de la collection aléatoire confirmant ainsi la fiabilité de la core collection conçue pour cette étude.

Tableau 19: Coefficient de similarité de la collection entière et de la collection aléatoire

Collection	Max	Min
Vrai Core collection	0.63	0.018
Collection aléatoire	0.77	0.02

Discussion

L'analyse conjointe des données microsattellites et inter-microsattellites a permis de mettre en évidence l'existence de 2 ensembles génétiquement différenciés. Ces 2 ensembles constituent des unités de gestion potentielles. Chacune possède des caractéristiques génétiques qui lui sont propres et qui en font une zone d'intérêt pour la conservation. Cependant, dans notre contexte de conservation de populations à l'échelle de la distribution naturelle de notre espèce, il est important d'établir un ordre de priorité entre les zones à préserver. En effet, il est plus facile de concentrer les actions de conservation sur des accessions clés que de tenter de les rechercher sur toutes les forêts d'Arganier. Le problème se pose alors de savoir comment choisir les accessions à protéger en priorité, sachant que les unités de gestion mises en évidence constituent déjà une première structuration.

Le premier critère qui est en général évoqué est la contribution de cette unité à la diversité à la différenciation globale dans la région étudiée (**Petit et al., 1998**). En d'autres termes, il s'agit de donner la priorité aux unités possédant un maximum d'haplotypes et d'allèles spécifiques, et dans notre cas, il s'agit des populations de la région d'Arganier qui s'avère la région la plus diversifiée et qui peut être considérée comme un réservoir de la

Chapitre III

diversité. Aussi une particularité pour la population de Rbai, qui présente le plus grand nombre d'allèles spécifiques (Chapitre II).

D'un autre côté, étant donné que les ressources génétiques sont la base des recherches scientifiques, il est important d'élargir les connaissances sur les effets génétiques et de localiser les gènes d'intérêts cher l'arganier. Cependant, il est assez compliqué et coûteux de rechercher des gènes d'intérêt en raison du grand nombre d'accessions. Une collection de base représentative de l'intégralité de la diversité génétique peut donc améliorer l'efficacité de la recherche et limiter le temps.

C'est un travail qui a été effectué chez plusieurs autres plantes, par exemple, (Holbrook and Anderson, 1995) ont pu identifier les gènes responsables de la résistance aux tâches tardives chez l'arachide en se basant sur une core collection ce qui a nécessité deux fois moins de temps que s'ils avaient travaillé sur la collection entière. Aussi, (Hui-Fang et al., 2010) s'est basé sur une core collection pour identifier un germoplasme de cacahuètes résistant à *Aspargilus flavus*. Egalement, dans une étude comparative, (Belaj) et al., 2012 ont utilisé Mstrat et PowerCore pour établir une collection de base d'*Olea europaea* L., leurs résultats ont démontré l'efficacité de PowerCore et sa capacité à capturer tous les allèles présents dans la collection source.

La core collection développée dans cette étude pourrait être explorée de plus proche en utilisant les nouveaux outils technologiques tel que le séquençage à haut-débit couplé à l'évaluation phénotypique du matériel choisi afin de permettre l'étude du déterminisme génétique des caractères d'intérêt agronomique tels que : l'architecture de l'arbre, la régularité de production, le rendement, la tolérance aux agresseurs biotiques et abiotiques, la teneur et la qualité d'huile, etc...

• **La core collection et sa conservation à long terme**

La conservation à long terme d'espèces d'arbres d'importance économique et sociale visant à assurer une disponibilité de ses ressources génétiques est l'une des stratégies les plus urgentes et les plus difficiles. Dans ce chapitre, nous avons développé une core collection sur la base de la méthode de maximisation du logiciel PowerCore en se basant sur la combinaison des bases de données de marqueurs dominants (ISSR) et co-dominants (SSR).

L'objectif de l'étude était d'identifier une collection noyau contenant une diversité génétique représentative de la collection originale. Les traits agro-morphologiques ont été exclus comme critère de sélection car leur inclusion aurait eu une incidence sur le processus de sélection

Chapitre III

génotypique, ce qui pourrait affecter la représentation allélique optimale souhaitée. Malgré cette exclusion, la Core collection développée représente avec succès la collection originale en termes de répartition géographique, mais aussi d'affectation de groupes génétiques déterminés par analyse STRUCTURE. Toutefois, les cores collections spécifiques peuvent être conçues pour d'autres fins en fonction de différents critères de sélection.

Actuellement, notre core collection est maintenue sous formes d'arbres de terrain, référenciés et géo-localisés. Cette méthode de conservation *in situ* présente notamment des menaces en cas de catastrophes naturelles, vu que les ravageurs et les maladies sont inévitables. Bien qu'une approche de conservation de sauvegarde à long terme par le biais de la biosphère ait déjà été mise en œuvre, et qui bien entendu présente toujours un potentiel de conservation inestimable, il est primordial d'adopter d'autres solutions comme la conservation *ex-situ*. A titre d'alternatives, les progrès récents dans les techniques *in vitro* se sont révélés efficaces pour protéger les espèces par une approche biotechnologique ((Gonzalez-Arno et al., 2014)). En effet, la cryoconservation est une alternative efficace et moins coûteuse, et surtout quand elle est appliquée sur une core collection, garantissant le stockage et la préservation de matériel biologique.

Conclusion générale et Perspectives

Conclusion générale

Le présent travail traite de la variabilité génétique de l'espèce *Argania spinosa* L. Il a permis de répondre aux objectifs fixés au début de l'étude à savoir comprendre l'organisation de cette diversité à l'échelle de la distribution naturelle de l'arganier à l'aide de marqueurs moléculaires neutres et puissants de type ISSR et SSR; Et ce afin d'établir une base pour un éventuel programme de domestication et de gestion de la diversité de cette ressource génétique endémique du Maroc.

Les résultats obtenus se sont basés sur une méthode d'échantillonnage prospective à l'aide de la Direction régionale des Eaux et Forêts Marrakech. Ainsi, 24 provenances représentant toute l'aire de répartition de la forêt d'arganier ont été échantillonnées à raison de 20 arbres par site. Au meilleur de notre connaissance, notre travail est la première étude de diversité génétique à couvrir toute l'aire de distribution de l'arganier.

Dans le 1^{er} volet de cette étude, 7 marqueurs ISSR ont permis d'identifier un total de 305 allèles. Les résultats obtenus montrent que les populations de la région de l'Arganier sont les populations les plus diversifiées pour tous les paramètres génétiques, et particulièrement la population de Rbai. L'analyse des profils multilocus a montré une structuration génétique très élevée des 24 populations étudiées mais qui est positivement corrélée avec la distance géographique ($r=0.065$, $P=0.05$).

Dans le 2^{ème} volet, 13 marqueurs microsatellites nucléaires ont été déployés pour l'étude de la diversité génétique de l'espèce *Argania spinosa* L. Ce chapitre fournit davantage d'informations sur la structure de la diversité génétique à l'échelle de sa distribution naturelle, notamment au niveau des populations et aussi au niveau des régions géographiques. Également, et suite à la classification hiérarchique, l'analyse des composantes principales ainsi que l'analyse de regroupement bayésienne, deux pools génétiques ont été distingués pour l'ensemble des populations étudiées et ceux pour les deux marqueurs moléculaires utilisés, ce qui montre la forte structuration de la diversité de cette espèce.

Enfin, dans le 3^{ème} volet, une core collection a été constituée dans le cadre de la gestion des ressources génétiques de la forêt d'arganier. La Core collection développée représente avec succès la collection totale en termes de répartition géographique, mais aussi d'affectation de groupes génétiques déterminés par analyse STRUCTURE. Actuellement,

notre core collection est maintenue sous formes d'arbres de terrain, référenciés et géo-localisés.

En définitive, ce travail a permis de mieux comprendre à grande échelle comment se structure la diversité génétique de la forêt d'arganier et aussi la mise en place d'une core collection représentative de la diversité qui peut être considérée comme une base solide dans l'établissement de stratégie de conservation efficace pour la conservation de cette espèce endémique.

Perspectives

Les travaux de cette thèse sont un premier fondement pour la conservation *d'Argania spinosa L.* Ils ne visent pas la mise à disposition de connaissances figées dans le temps. L'utilisation et l'application des principaux résultats énoncés doivent se subordonner aux spécificités locales et aux nouvelles avancées de recherche à venir. Espérons qu'ils inciteront de nouvelles études dont les aboutissements permettront la réduction du déficit de connaissances actuel envers cette espèce. D'où l'importance de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser d'avantage nos investigations.

Il est intéressant de constater qu'à travers les indications de diversité, surtout de la différenciation génétique et la structuration de cette diversité, il y a des régions comme celle de Rbaii qui doivent être prioritaires dans les programmes de conservation. En effet, cette région représente un réservoir de la diversité. Egalement, la Core collection montre l'importance de l'échantillonnage adoptée selon un schéma spécifique et présente les géotypes à préserver et ou à conserver. Cette core collection doit être le point de départ dans la recherche des différents gènes d'intérêts impliqués aussi bien dans la productivité que dans l'adaptation aux stress biotiques et abiotiques.

Egalement, il serait utile d'exploiter les données de cette étude et les confronter aux données du milieu (données éco-géographiques) afin de comprendre les processus évolutifs menant à cette diversité et rechercher des signes d'adaptation. En effet, l'étude de la diversité et en particulier de l'adaptation dans le cadre des changements globaux est d'une grande importance quant au devenir des populations forestières et la conservation des écosystèmes.

Aussi, il est primordial d'investir dans un programme d'élaboration de la carte génétique de l'arganier permettant ainsi de mener des études d'associations avec des

caractères agronomiques, et procéder à la sélection de géotypes performants, dans le but d'encourager l'investissement dans la création de verger.

Cela doit se faire parallèlement aux projets de domestication avec des dispositifs expérimentaux appropriés. De tels objectifs devraient intégrer l'ensemble des acteurs gouvernementaux et non gouvernementaux, afin de mener à terme le défi de rendre l'arganier un vrai support de développement durable pour le Maroc.

Références Bibliographique

Références bibliographiques

- Abdul Kareem, V.K., Rajasekharan, P.E., Ravish, B.S., Mini, S., Sane, A., and Vasantha Kumar, T. (2012). Analysis of genetic diversity in *Acorus calamus* populations in South and North East India using ISSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 40, 156–161.
- Affre, L., Dutoit, T., Jäger, M., and Garraud, L. (2003). Écologie de la reproduction, de la dispersion et structure génétique chez les espèces messicoles: propositions de gestion dans le Parc naturel régional du Luberon. *Actes BRG 4*, 405–428.
- Ait Aabd, N., El Ayadi, F., Msanda, F., and El Mousadik, A. (2011). Evaluation of agromorphological variability of Argan tree under different environmental conditions in Morocco: Implication for selection. 73–82.
- Ait Aabd, N., Msanda, F., and EL MOUSADIK (2015). Genetic diversity of the endangered argan tree (*Arganis spinosa* L.) (sapotaceae) revealed by ISSR analysis. *Nasic Res. J.* 176–186.
- Alaoui, N.E. (1999). Paysages, usages et voyages d'*Argania spinosa* (L.) Skeels (IXe-Xe siècles). *J. Agric. Tradit. Bot. Appliquée* 41, 45–79.
- Alifriqui, M. (2004). L'Ecosystème de l'Arganier (Maroc: PNUD).
- Andrianoelina andrianaivo, O. (2009). Diversité génétique, physiologie de reproduction et étude d'impact de la fragmentation sur *Dalbergia monticola* de la forêt orientale de Madagascar. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques. Université D'antaananarivo.
- Auberville (1964). Sapotacées (*Adansonia*).
- Azevedo, V.C.R., Kanashiro, M., Ciampi, A.Y., and Grattapaglia, D. (2007). Genetic Structure and Mating System of *Manilkara huberi* (Ducke) A. Chev., a Heavily Logged Amazonian Timber Species. *J. Hered.* 98, 646–654.
- Bani-Aameur, F. (2001). Floraison et production de fruits de l'arganier. *Modèles Biol. À L'amélioration Plantes IRD* 174–179.
- Bani-Aameur, F., and Benlahbil, S. (2004). Variation in RAPD markers of *Argania spinosa* trees and their progenies. *For. Genet.* 11, 309.
- Bani-Aameur, F., Ferradous, A., and Dupuis, P. (1999a). Typology of fruits and stones of *Argania spinosa* (Sapotaceae). *For. Genet. Slovak Repub.*
- Bani-Aameur, F., Ferradous, A., and Dupuis, P. (1999b). TYPOLOGY OF FRUITS AND STONES OF ARGANZA SPZNOSA (SAPOTACEAE).
- Bani-Aameur, F. (2001). floraison et production de fruits de l'arganier. In *Modèles biologiques à l'amélioration des plantes, (IRD/AUF)*, pp. 173–179.
- van der Bank, H., van der Bank, M., and van Wyk, B.-E. (2001). A review of the use of allozyme electrophoresis in plant systematics. *Biochem. Syst. Ecol.* 29, 469–483.
- Barth, S., Melchinger, A.E., and Lübberstedt, T. (2002). Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Mol. Ecol.* 11, 495–505.

Références bibliographiques

- Battle, I., and Tous, J. (1997). Carob tree: *Ceratonia siliqua* L. - Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 17. (Rome, Italy: Bioversity International).
- Beckmann, J., and Soller, M. (1986). Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultural species. *Euphytica* 111–124.
- Belaj, A., Dominguez-García, M. del C., Atienza, S.G., Urdíroz, N.M., Rosa, R.D. la, Satovic, Z., Martín, A., Kilian, A., Trujillo, I., Valpuesta, V., et al. (2012). Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genet. Genomes* 8, 365–378.
- Bellefontaine, R., Ferradous, A., Alifriqui, M., and Monteuis, O. (2010). Multiplication végétative des l'arganier, *Argania spinosa* au Maroc: le projet John Goelet. *Bois For. Trop.* 47–59.
- Benabid, A. (1985). Les écosystèmes forestiers, préforestiers et prestépiques du Maroc : diversité, répartition biogéographique et problèmes posés par leur aménagement (Association Forêt Méditerranéenne, 14 rue Louis Astouin, 13002 MARSEILLE, France).
- Bendaanoun, M. (1994). Etude de la végétation (Analyse des facteurs écologiques, phytoécologiques et phytosociologiques et cartographie des groupements végétaux) de la Commune Rurale d' Ida ou Tghouma (Province d'Essaouira). AEFCSA Boulsassim SA 37.
- Bettencourt, S.X., Mendonça, D., Lopes, M.S., Rocha, S., Monjardino, P., Monteiro, L., and da Câmara Machado, A. (2015). Genetic diversity and population structure of the endemic Azorean juniper, *Juniperus brevifolia* (Seub.) Antoine, inferred from SSRs and ISSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 59, 314–324.
- Bezzala, A. (2005). Essai d'introduction de l'arganier (*Argania spinosa* (L) Skeels) dans la zone de M'doukel et évaluation de quelques paramètre de résistance à la sécheresse. Mémoire magistère. El Haj Lakhdar.
- BGCI (2016). Global Strategy of plant conservation.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314–331.
- Boudy, P. (1948). Économie forestière nord-africaine (Editions Larose).
- Boudy, P. (1952). Guide du forestier en Afrique du Nord (La Maison rustique).
- Bourbouze, A., El Aich, A., and Morand-Fehr, P. (2005). La chèvre dans l'Arganeraï (Rabat).
- Bousselmame, F., Kenny, L., and Chlyah, H. (2001). optimisations des conditions de culture pour l'enracinement in vitro de l'arganier (*Argania spinosa* L.). 995–1000.
- Brown, A.H.. (1995). The Core collection at the crossroads. In *Core Collections of Plant Genetic Resources*, pp. 3–19.
- Buth, D.G., and Murphy, R.W. (1999). The use of isozyme characters in systematic studies. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 117–129.

Références bibliographiques

- Camacho, F.J., and Liston, A. (2001). Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *Am. J. Bot.* 88, 1065–1070.
- Cardi, C., Vaillant, A., Sanou, H., Kelly, B.A., and Bouvet, J.-M. (2005). Characterization of microsatellite markers in the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C. F Gaertn) in Mali. *Mol. Ecol. Notes* 5, 524–526.
- Chao, S., Sharp, P.J., Worland, A.J., Warham, E.J., Koebner, R.M.D., and Gale, M.D. (1989). RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 78, 495–504.
- Chapuis, E., Martin, G., and Goudet, J. (2008). Effects of selection and drift on G matrix evolution in a heterogeneous environment: a multivariate Qst-Fst Test with the freshwater snail *Galba truncatula*. *Genetics* 180, 2151–2161.
- Charnane, H. (2001). Caractérisation biométrique, lipidique et phénotypique de la diversité phénotypique des fruits de l'arganier (*Argania spinosa* (L) Skeels). Thèse d'état. Université Caddi Ayyad.
- Charrouf, Z., and Guillaume, D. (1999). Ethnoeconomical, ethnomedical, and phytochemical study of *Argania spinosa* (L.) Skeels. *J. Ethnopharmacol.* 67, 7–14.
- Charters, Y.M., Robertson, A., Wilkinson, M.J., and Ramsay, G. (1996). PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5' -anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 92, 442–447.
- Chaussod, R., Adlouni, A., and Christon, R. (2005). The argan tree and argan oil in Morocco: Towards a deep change in a traditional agroforestry system. Economic and scientific challenges. *Cah. Agric.* 14, 351–356.
- Chriqi, A., Ballouk, A., Houjjaji, A., Adnan, A., Bacha, L., and Addebous, R. (2003). L'huile d'Argan: Un produit de terroir: quelle stratégie pour sa valorisation. *Terre Vie*.
- Collevatti, R.G., Grattapaglia, D., and Hay, J.D. (2003). Evidences for multiple maternal lineages of *Caryocar brasiliense* populations in the Brazilian Cerrado based on the analysis of chloroplast DNA sequences and microsatellite haplotype variation. *Mol. Ecol.* 12, 105–115.
- Corre, V.L., Machon, N., Petit, R.J., and Kremer, A. (1997). Colonization with long-distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees: a simulation study. *Genet. Res.* 69, 117–125.
- Crawford, D., Tago-Nakazawa, M., Stuessy, T.F., Anderson, G.J., Bernardello, G., Ruiz, E., Jensen, R.J., Baeza, C., Wolfe, A.D., and O, M.S. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) variation in *Lactoris fernandeziana* (Lactoridaceae), a rare endemic of the Juan Fernández Archipelago, Chile. *Plant Species Biol.* 16, 185–192.
- Dai, Z.-C., Si, C.-C., Zhai, D.-L., Huang, P., Qi, S.-S., Zhong, Q.-X., Hu, X., Li, H.-M., and Du, D.-L. (2013). Human impacts on genetic diversity and differentiation in six natural populations of *Madhuca hainanensis*, an endemic and endangered timber species in China. *Biochem. Syst. Ecol.* 50, 212–219.

Références bibliographiques

- Dumolin-Lapègue, S., Demesure, B., Fineschi, S., Come, V.L., and Petit, R.J. (1997). Phylogeographic Structure of White Oaks Throughout the European Continent. *Genetics* 146, 1475–1487.
- Dutech, C., Joly, H.I., and Jarne, P. (2003). Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guianan populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. *Heredity* 92, 69–77.
- El Aboudi, A. (1990). Typologie des arganeraies inframéditerranéennes et écophysilogie de l'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels) dans le Souss (Maroc). Thèse. Université Joseph Fourier.
- El Aboudi, A., Peltier, J.-P., and Doche, B. (1992). La carte de la végétation des Ait Baha (Anti Atlas occidental) et son intérêt pour l'édaphologie. *Feddes Rep.* 121–126.
- El Bahloul, Y., Dauchot, N., Machtoun, I., Gaboun, F., and Van Cutsem, P. (2014). Development and characterization of microsatellite loci for the Moroccan endemic endangered species *Argania spinosa* (Sapotaceae)1. *Appl. Plant Sci.* 2.
- El Mousadik, A., and Petit, R.J. (1996a). Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Mol. Ecol.* 5, 547–555.
- El Mousadik, A., and Petit, R.J. (1996b). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92, 832–839.
- El Mousadik, A., and Petit, R.J. (1996c). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92, 832–839.
- El Yousfi, M. (1988). Dégradation du couvert forestier dans le Sud Marocain: Cas de l'arganeraie d'Admine. Mémoire de 3ème cycle. Mohammed V- Souissi.
- Emberger, L. (1924). A propos de la distribution géographique de l'Arganier. 151–153.
- Emberger, L. (1925). Le domaine naturel de l'Arganier. *Bull. Société Bot. Fr.* 72, 770–774.
- Emberger, L. (1960). *Les végétaux vasculaires* (Paris: Guthier-Villars, Masson).
- England, P.R., Usher, A.V., Whelan, R.J., and Ayre, D.J. (2002). Microsatellite diversity and genetic structure of fragmented populations of the rare, fire-dependent shrub *Grevillea macleayana*. *Mol. Ecol.* 11, 967–977.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., and Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Faouzi, H. (2005). Exploitation du bois dans les argaeraies, Haut-Atlas Occidental. 12–31.
- Faouzi, H. (2006). Les bouleversements des arganeraies marocaines. 3–26.

Références bibliographiques

- Ferradous, A., Bani-Aameur, F., and Dupuis, P. (1996). Climat stationnel, phénologie et fructification de l'arganier (*Argania spinosa* L. Skeels). *Rev. Marocaine Sci. Agron. Vét.* 17, 51–60.
- Feyissa, T., Nybom, H., Bartish, I.V., and Welander, M. (2007). Analysis of genetic diversity in the endangered tropical tree species *Hagenia abyssinica* using ISSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 54, 947–958.
- Fontaine, C., Lovett, P.N., Sanou, H., Maley, J., and Bouvet, J.-M. (2004). Genetic diversity of the shea tree (*Vitellaria paradoxa* C.F. Gaertn), detected by RAPD and chloroplast microsatellite markers. *Heredity* 93, 639–648.
- Frankel, O.H. (1984). Genetic perspectives of germplasm conservation. *Genet. Manip. Impact Man Soc.* Ed. Werner Arber Al.
- Gilbert, J.E., Lewis, R.V., Wilkinson, M.J., and Caligari, P.D.S. (1999). Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1125–1131.
- Gnis (1999). Bienvenue sur Gnis Pédagogie | Centre de ressources pédagogiques sur les semences.
- Gonzalez-Arno, M.T., Martinez-Montero, M.E., Carlos A., C.C., and Engelmann, F. (2014). Advances in Cryogenic Techniques for the Long-term Preservation of Plant Biodiversity. In *Biotechnology and Biodiversity*, (Springer), p. 344.
- Goudet, J. (2002). FSTAT (Département of Biology & Evolution: Lausanne, Switzerland).
- Groom, M.J., Meffe, G.K., and Carroll, C.R. (2005). *Principles of Conservation Biology*, Third Edition (Sinauer Associates, Inc.).
- Gupta, A., Maurya, R., Roy, R.K., Sawant, S.V., and Yadav, H.K. (2013). AFLP based genetic relationship and population structure analysis of *Canna*—An ornamental plant. *Sci. Hortic.* 154, 1–7.
- Haig, S.M. (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology* 79, 413–425.
- Hamrick, J.L., and Godt, M.J.W. (1990). Allozyme diversity in plant species. 43–63.
- Hamrick, J.L., and Godt, M.J.W. (1996a). Conservation genetics of endemic plant species. In *Conservation Genetics*, (Springer), pp. 281–304.
- Hamrick, J.L., and Godt, M.J.W. (1996b). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 351, 1291–1298.
- HAWA, W. (2007). La gestion participative et le développement des PFNL comme moyen de réduction de la pauvreté féminine en zones rurales : cas du Maghreb et du sahel. Programme de Formation en Gestion de la Politique Economique (G.P.E). Université de Cocody, Côte d'Ivoire.

Références bibliographiques

- HCEFLCD (2012). Actualisation du programme d'action national de lutte contre la désertification (PAD LCD). Adaptation aux spécificité zonale (High Commission for Water, Forests and Desertification Control).
- Helentjaris, T., Slocum, M., Wright, S., Schaefer, A., and Nienhuis, J. (1986). Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* 72, 761–769.
- Holbrook, C.C., and Anderson, W.F. (1995). Evaluation of a Core Collection to Identify Resistance to Late Leafspot in Peanut. *Crop Sci.* 35, 1700–1702.
- Holubec, V., Vymyslicky, T., and Paprstein, F. (2010). Possibilities and Reality of On-farm Conservation. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 60–64.
- Hui-Fang, J., Xiao-Ping, R., Sheng-Yu, W., Xiao-Ji, Z., Jia-Quan, H., Bo-Shou, L., Holbrook, C.C., and Upadhyaya, H.D. (2010). Development and Evaluation of Peanut Germplasm with Resistance to *Aspergillus flavus* from Core Collection. *Acta Agron. Sin.* 36, 428–434.
- Jay, F., Blum, M., and Frichot, E. (2012). Modèles à variables latentes en génétique des populations. *J. Société Fr. Stat.* 152, 3–20.
- Jia, D. (2016). Survey and analysis of simple sequence repeats (SSRs) in three genomes of *Candida* species. *Gene* 584, 129–135.
- Jin, Z., and Li, J. (2007). Genetic differentiation in endangered *Heptacodium miconioides* Rehd. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. *For. Ecol. Manag.* 245, 130–136.
- Jordana, J., Alexandrino, P., Beja-Pereira, A., Bessa, I., Cañon, J., Carretero, Y., Dunner, S., Laloë, D., Moazami-Goudarzi, K., Sanchez, A., et al. (2003). Genetic structure of eighteen local south European beef cattle breeds by comparative F-statistics analysis. *J. Anim. Breed. Genet.* 120, 73–87.
- Kim, S.-C., Lee, C., and Santos-Guerra, A. (2005). Genetic analysis and conservation of the endangered Canary Island woody sow-thistle, *Sonchus gandogerii* (Asteraceae). *J. Plant Res.* 118, 147–153.
- Kramer, A., and Petit, R.J. (1993). Gene diversity in natural populations of oak species. *Ann. Sci. For.* 186s–202s.
- Kremer, A., Dupouey, J.L., Deans, J.D., Cottrell, J., Csaikl, U., Finkeldey, R., Espinel, S., Jensen, J., Kleinschmit, J., Dam, B.V., et al. (2002). Leaf morphological differentiation between *Quercus robur* and *Quercus petraea* is stable across western European mixed oak stands. *Ann. For. Sci.* 59, 777–787.
- Kurokawa, S., Shimizu, N., Uozumi, S., and Yoshimura, Y. (2003). ISSR variation in a worldwide collection of velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) and the genetic background of weedy strains mingled in grains imported into Japan. *Weed Biol. Manag.* 3, 179–183.
- Lafhaili (2012). Actualisation du programme d'action national de lutte contre la désertification (PAD LCD). Adaptation aux spécificité zonale (High Commission for Water, Forests and Desertification Control).

Références bibliographiques

- Lagudah, E., Appels, R., and McNeil, D. (1991). The Nor-D3 locus of *Triticum tauschii*: natural variation and genetic linkage to markers in chromosome 5 - Genome. *Génome* 387–395.
- Lee, H.-Y., Ro, N.-Y., Jeong, H.-J., Kwon, J.-K., Jo, J., Ha, Y., Jung, A., Han, J.-W., Venkatesh, J., and Kang, B.-C. (2016). Genetic diversity and population structure analysis to construct a core collection from a large *Capsicum* germplasm. *BMC Genet.* 17.
- Lefort-Buson, M., and Vienne, D. (1985). *Les Distances génétiques: estimations et applications* (Institut National de la Recherche Agronomique).
- Lefort-Buson, M., Rodolphe, F., and Charcosset, A. (1990b). De nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatives: La sélection assistée par marqueurs. *Biofutur* 30–37.
- Lefort-Buson, M., Rodolphe, F., and Charcosset, A. (1990a). De nouvelles perspectives pour m'analyse génétique des caractères quantitatives (Ière partie): A la recherche des locus importants. *Biofutur* 30–37.
- Lemes, M.R., Gribel, R., Proctor, J., and Grattapaglia, D. (2003). Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Mol. Ecol.* 12, 2875–2883.
- Liu, B., and Wendel, J.F. (2001). Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Mol. Ecol. Notes* 1, 205–208.
- Liu, Y., Zhang, J., Wang, X., Liu, F., and Shen, Z. (2013). Genetic diversity in *Vicia amoena* (Fabaceae) germplasm resource in China using SRAP and ISSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 51, 86–93.
- Lopes, M.S., Mendonca, D., Bettencourt, S.X., Borba, A.R., Melo, C., Baptista, C., and da Camara Machado, A. (2014). Genetic diversity of an Azorean endemic and endangered plant species inferred from inter-simple sequence repeat markers. *AoB PLANTS* 6, plu034-plu034.
- Majourhat, K., Jabbar, Y., Araneda, L., Zeinalabedini, M., Hafidi, A., and Martínez-Gómez, P. (2007). Karyotype characterization of *Argania spinosa* (L.) Skeel (Sapotaceae). *South Afr. J. Bot.* 73, 661–663.
- Majourhat, K., Jabbar, Y., Hafidi, A., and Martínez-Gómez, P. (2008). Molecular characterization and genetic relationships among most common identified morphotypes of critically endangered rare Moroccan species *Argania spinosa* (Sapotaceae) using RAPD and SSR markers. *Ann. For. Sci.* 65, 805–805.
- Mantel, N. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer Res.* 27, 209–220.
- Martins-Lopes, P., Gomes, S., Lima-Brito, J., Lopes, J., and Guedes-Pinto, H. (2009). Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. “Cobrançosa” by molecular markers. *Sci. Hortic.* 123, 82–89.
- Matheron, G. (1965). *Les Variables régionalisées et leur estimation: une application de la théorie des fonctions aléatoires aux sciences de la nature* (Masson et Cie).

Références bibliographiques

- Maxted, N., Ford-Lloyd, B.V., and Hawkes, J. (1997). Contemporary conservation strategies. *Plant Genomic Conserv. Situ Approach* 20–55.
- Maxted, N., Guarino, L., Myer, L., and Chiwona, E.A. (2002). Towards a methodology for on-farm conservation of plant genetic resources. *Genet. Resour. Crop Evol.* 49, 31–46.
- McPherson, M.J. (1991). Videotape review: DNA sequencing program. *Biochem. Educ.* 19, 94–94.
- Mensier, P.H. (1957). *Dictionnaire des huiles végétales* (Paris: P. Lechevalier).
- Mhirit, O., and Blerot, P. (1999). *Le grand livre de la forêt marocaine* (Editions Mardaga).
- M'Hirit, O., Benzyane, M., Benchekroun, F., El Yousfi, S.M., and Bendaanoun (1998). *L'arganier : une espèce fruitière-forestière à usages multiples* (Sprimont: Mardaga).
- Mousadik, A.E., and Petit, R.J. (1996). High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92, 832–839.
- Msanda, F. (1993). *Ecologie et cartographie des groupement végétaux d'Anzi (Anti-Atlas occidental, Maroc) et contribution à l'étude de la diversité génétique de l'Arganier*. Thèse. J. Fourier.
- Msanda, F., Aboudi, A.E., and Peltier, J.-P. (2005). Biodiversité et biogéographie de l'arganeraie marocaine. *Cah. Agric.* 14, 357–364.
- Nanson, A. (2004). *Génétique et amélioration des arbres forestiers* (Presses Agronomiques de Gembloux).
- Nei, M. (1973). Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70, 3321–3323.
- Nei, M. (1978). Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance from a Small Number of Individuals. *Genetics* 89, 583–590.
- Nelson, J.C., Sorrells, M.E., Deynze, A.E.V., Lu, Y.H., Atkinson, M., Bernard, M., Leroy, P., Faris, J.D., and Anderson, J.A. (1995). Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7. *Genetics* 141, 721–731.
- Newton, null, Allnutt, null, Gillies, null, Lowe, null, and Ennos, null (1999). Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends Ecol. Evol.* 14, 140–145.
- Nouaim, R. (1994). *écologie microbienne des sols d'arganeraies. Activités microbiologiques des sols et rôle des endomycorhizes dans la croissance et la nutrition de l'Arganier*. Thèse d'état. Université Ibn Zohr.
- Nouaim, R., and Chaussod, R. (1993). L'arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Le flamboyant. *Bull. Liaison Memb. Réseau Arbres Trop.* 50–64.

Références bibliographiques

- Peakall, R., and Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 28, 2537–2539.
- Peltier, J.-P. (1982). La végétation du bassin versant de l'oued Souss (Maroc). Thèse Doctorat Es Sciences. Université des sciences médicales.
- Petit, R.J., Pineau, E., Demesure, B., Bacilieri, R., Ducouso, A., and Kremer, A. (1997). Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 9996–10001.
- le Polain de Waroux, Y., and Lambin, E.F. (2012). Monitoring degradation in arid and semi-arid forests and woodlands: The case of the argan woodlands (Morocco). *Appl. Geogr.* 32, 777–786.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Radi, N. (2003). L'Arganier: arbre du Sud-Ouest MArocaïn, en péril, à protéger. Doctat d'état en pharmacie. Université de Nantes.
- Reidacker, A., Dreyer, E., Pafadnam, C., and Bory, G. (1990). Physiologie des arbres et arbustes des zones arides et semi-arides. Groupe d'étude de l'Arbre. Observatoire du Sahara et du Sahel. (Paris-Nancy).
- Rousset, F. (1996). Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* 142, 1357–1362.
- Ruiz Valcárcel, M., Giraldo Carbajo, P., Royo, C., and Carrillo Becerril, J.M. (2013). Creation and Validation of the Spanish Durum Wheat Core Collection. *Crop Sci.* 53, 2530–2537.
- Sbabou, L., Brhada, F., Alami, I.T., and Maltouf, A.F. (2010). Genetic diversity of Moroccan Lupinus germplasm investigated using ISSR and AFLP markers. *Int. J. Agric. Biol.* 12, 26–32.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T., and Smith, W.A. (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Mol. Ecol.* 7, 465–474.
- Schoen, D.J., and Brown, A.H. (1993). Conservation of allelic richness in wild crop relatives is aided by assessment of genetic markers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 10623–10627.
- Sica, M., Graziella, G., Montieri, S., Gaudio, L., and Aceto, S. (2005). ISSR markers show differentiation among Italizn populations of *Asparagus acutifolius* L. *Genetics* 1–7.
- Slatkin, M. (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236, 787–792.
- Sokal, R.R., and Oden, N.L. (1978). Spatial autocorrelation in biology: 1. Methodology. *Biol. J. Linn. Soc.* 10, 199–228.
- Stuessy, T.F. (2009). *Plant Taxonomy: The Systematic Evaluation of Comparative Data* (Columbia University Press).

Références bibliographiques

- Swenson, U., and Anderberg, A.A. (2005). Phylogeny, character evolution, and classification of Sapotaceae (Ericales). *Cladistics* 21, 101–130.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17, 6463–6471.
- Thierry, L. (1987). L'arganier au Maroc : sa description, ses méthodes de multiplication et son application en reforestation. Thèse d'ingénieur technique. Institut provincial d'enseignement supérieur agronomique et techniques.
- Van Der Nest, M.A., Steenkamp, E.T., Wingfield, B.D., and Wingfield, M.J. (2000). Development of simple sequence repeat (SSR) markers in Eucalyptus from amplified inter-simple sequence repeats (ISSR). *Plant Breed.* 119, 433–436.
- Vienne, D. de (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales (Editions Quae).
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., and Kuiper, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23, 4407–4414.
- Weir, B.S., and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38, 1358–1370.
- Whitmore, T.C. (ed), (iucn), W.C.U., Eng, G. (Switzerland), and Sayer, J.A. (ed) 170666 (1992). Tropical deforestation and species extinction.
- Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15, 323–354.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the Genetics of Populations, Volume 4: Variability Within and Among Natural Populations* (University of Chicago Press).
- Xing, R., Gao, Q., Zhang, F., Li, Y., Fu, P., Zhang, J., Wang, J., Khan, G., and Chen, S. (2014). Genetic diversity and population structure of *Armillaria luteo-virens* (Physalacriaceae) in Qinghai-Tibet Plateau revealed by SSR markers. *Biochem. Syst. Ecol.* 56, 1–7.
- Yeh, F., Yang, R.-C., and Boyle, T.J.B. (1999). the user-friendly shareware for population genetic analysis.
- Zahidi, A. (1997). Phénologie, typologie et variabilité génétique de la ramification et de la foliation de l'Arganier (*Argania spinosa* (L.) Skeels). Thèse de Diplôme des études supérieures de 3e cycle (DES). Université Ibn Zohr.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics* 20, 176–183.
- Zine El Abidine, A. (2003). Le dépérissement des forêts au Maroc: Analyse des causes et stratégies de lutte. *Sécheresse* 209–218.

Références bibliographiques

Zugmeyer, L. (2006). Projet de développement sylvo pastora de l'Arganeraie marocaine (Commune Rurale de Tiout, Taroudant, Maroc). Université Mohammed V.

Annexes

Annexe 1: Exemple de fiche descriptives remplie lors des prospections (Population Oued Grou)

Provenance : Oued Grou code : Date : 01/03/013

Descriptif des arbres sur le terrain

Identification	Longitude (N)	Latitude (E)	Alt (m)	Forme arbre	Rameaux âgés d'1 an	Rameaux jeunes	Etau/ arbre	Clinomètre Haut. Biom-circonf	Nbre Tiges/ circonférence	Fruit sur arbre	Couleur feuilles	FLoraison/ FRuctification
1	6° 22' 7.68"	33° 27' 27.6"	380	I	NE	NE	T	6,80	5/47/109	O	C	FL+/FR+
2	6 22 7 81	33 27 27 7	380	D	NE	NE	N	5,40	1/39/122	O	I	FL+/FR+
3	6 22 8 42	33 27 45 4	430	D	IE	ME	T	5,50	2/30/94	F	I	FL+/FR+
4	6 22 8 42	33 27 45 5	433	I	IE	ME	T	5,70	6/34/107	O	I	FL+/FR+
5	6° 22' 8.48"	33° 27' 45.3"	439	D	E	E	N	5,40	1/50/138	O	C	FL+/FR+
6	6° 22' 9.02"	33° 27' 44.2"	422	I	E	E	N	4,50	1/44.5/140	A	I	FL+/FR+
7	6° 22' 9.13"	33° 27' 44.1"	420	I	E	E	N	5,10	2/32.5/102	O	I	FL+/FR+
8	6° 22' 9.29	33° 27' 44.2	417	D	NE	NE	N	4,80	1/24.5/77	O	F	FL+/FR+
9	6° 22' 9.34	33° 27' 44.5	412	D	NE	NE	N	5,10	2/40.5/127	A	C	FL+/FR+
10	6° 22' 9.45	33° 27' 44.3	403	P	NE	NE	N	5,20	2/32/100	O	I	FL+/FR+
11	6 22 9 4 7	33 27 4 4 5	408	I	NE	NE	N	4,70	2/35.5/112	O	I	FL+/FR+
12	6 22 9 6 4	33 27 4 4 8	407	P	NE	NE	N	5,50	2/45/142	0 Ap.	F	FL+/FR+
13	6 22 9 7 8	33 27 4 6 6	415	I	NE	NE	N	5,40	3/47/152	O	I	FL+/FR+
14	6 22 9 9 7	33 27 4 5 4	411	P	E	NE	T	5,70	1/35/110	O	I	FL+/FR+
15	6 23 0 2 1	33 27 4 5 0	408	P	NE	NE	N	4,70	2/52/164	O	F	FL+/FR+
16	6 23 0 3 1	33 27 4 5 0	409	P	NE	NE	N	5,90	2/42/132	-	C	FL+/FR-
17	6 23 0 5 2	33 27 4 5 1	407	I	E	NE	N	5,20	3/32/100	O	I	FL+/FR+
18	6 23 1 1 5	33 27 4 6 2	408	I	NE	NE	N	5,10	3/40/125	O	I	FL+/FR+
19	6 23 1 2 4	33 27 4 6 8	412	I	E	E	N	4,50	4/28/90	O	I	FL+/FR+
20	6 23 1 2 5	33 27 4 8 8	422	I	NE	NE	N	4,70	1/64/201	O	C	FL+/FR+
PRV1...PRV20				D : Dressé P : Pleureur I : intermed	E : Epineux NE : Non épin IE : intermed	E : Epineux NE : Non épin IE : intermed	T : taillis/ Non			Arrondie Ovale Fusiforme Autre	FFoncée FClaire Flinterm/	FL+/FL/ FR+/FR/

En qlq lignes au verso de chaque fiche prov. : Description générale du peuplement : (Etat, terrain, densité, phénologie, biodiversité etc.)

Arbres 3 et 4 : très proches
Observat: d'un fruit (ancien) à 4 Carpelles

Annexe 2: Protocol d'extraction de l'ADNg par le KIT BIOLINE

1. Mettre 50mg - 100mg de la poudre des feuilles dans un microtube de 2 ml qui contient 400 µl de Tampon de Lyse (Lysis Bufer) puis mélanger au vortex pendant quelques Secondes) ensuite, incubater dans un Bain-Marie à 65°C pendant 30min.
2. Ajouter 100µl de Tampon de Précipitation (Precipitation Buffer), et incuber pendant 5 min dans la glace puis centrifuger pendant 5 min à une rotation maximale (15000 g).
3. Transférer le surnageant dans la Spin Column PD1 et centrifuger à 10000 g pendant 1 min.
4. Jetter les PD1, en gardant l'éluât dans les tubes de 2 ml, ajouter ½ de volume de tampon (Binding Buffer), mélanger par micropipette et transférer l'ensemble dans la Spin Column PD2 placés dans des tubes de 2 ml, centrifuger à 10000 g pendant 2 min.
5. Effectuer deux lavages successifs, en ajoutant deux fois 700 µl de Tampon de Lavage (Wash Buffer), centrifuger à 10000 g pendant une min pour le premier lavage, centrifuger à rotation maximale (150000 g) pendant 2 min pour le seconde lavage.
6. Placer les PD2 dans des tubes de collection de 1,5ml, ajouter 100 µl de Tampon TE (Elution Buffer), incuber à température ambiante penadant une min, centrifuger à 10000 g pendant une min.
7. Conserver l'ADN isolé à -20°C.

Tableau 20 : Liste des réactifs du Kit Bioline

REAGENT	50 MINIPREPS
Lysis Buffer D	25 ml
Binding Buffer D	15 ml
Proteinase K	1.5 ml
Wash Buffer	24 ml
Elution Buffer	25 ml
Spin Column D	50
Collection Tube	2 * 50
Elution Tube	50
Product Manual	1
Bench Protocol Sheet	1

Annexe 3: Exemples des valeurs de dosage d'ADN extraits

<i>Identifiant,</i>	<i>Concentration en Acides Nucléiques</i>	<i>rapport DO 260/280</i>	<i>Rapport DO 230/260,</i>
3	96	2,02	1,71
4	131,6	1,93	1,62
5	97,8	1,63	1,62
6	158,3	2,01	1,69
7	79	1,98	1,57
8	74,4	1,9	1,7
10	124	1,67	1,54
11	169,7	2,05	2
12	157,4	1,92	1,88
16	110,4	1,69	1,73
31	175,4	1,67	1,68
32	549,2	1,78	1,64
33	199	2,07	1,92
34	72,5	1,96	1,85
35	219,1	1,52	1,55
36	199,7	2,03	1,76
37	169,5	2,02	1,78
38	131,3	1,97	1,64
43	134,8	2,06	1,56
44	72,7	2,04	1,94
45	75,1	2,06	1,73
48	122,7	1,75	1,76
51	503,5	1,78	1,52
53	163,5	1,55	1,55
55	115,3	1,63	1,62
56	357,5	1,78	1,97
57	323,2	1,76	1,87
123	245,1	2,03	1,73
125	370,7	1,7	1,88
130	233,6	2,03	1,81
131	113,3	1,95	1,49
132	373,8	2,07	2,04
133	330	2,05	1,98
134	333,1	2,07	2,02
135	213,9	2,05	1,95
139	44,1	1,86	1,58
140	272,6	2,07	2,04
143	206,9	2,01	1,75
144	172,2	2,02	1,68
146	56,3	1,96	1,74
147	75	1,99	1,62
148	213,6	2,03	1,69
149	100,9	1,98	1,48
156	134,3	2,04	1,79
157	92,8	2,01	1,73