

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de Batna 2
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Ecologie et Environnement



Thèse

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

***Contribution à la caractérisation et à l'identification
des écotypes d'olivier *Olea europaea*. L dans la région
des Aurès***

Présentée par : ABDESSEMED SANNA

Devant le jury

Président : Abdelmalek CHORFI	Professeur	Université de Batna -2-
Rapporteur : Halima BENBOUZA	Professeur	Université de Batna -1-
Examineurs :		
Lakhdar KHELIFI	Professeur	ENSA
Djamel FAHLOUL	MCA	Université de Batna -1-
Ismail CHAFAA	MCA	Université de Batna -2
Abdelkade BENBELKACEM	Directeur de recherche	INRAA

Année universitaire : **2016-2017**

Dédicaces

Je dédie ce travail à

*Mes parents, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes sincères
sentiments, pour leur patiente illimitée, leur encouragement, leur
aide, et leurs grands sacrifices.*

*Ma profonde reconnaissance à mon cher époux SOFIANE pour
son soutien sans faille, sa grande indulgence, sa compréhension
et surtout sa contribution dans le partage de stress de la
recherche et de la vie quotidienne.*

*Mon chère frère ALA, Mes sœurs SAFA et Souhila pour leur
grand amour et soutien*

*Mes nièces Nour El Yakine et ALA Tasnime et mon petit neveu
Mohamed*

*Mes chère amis Rima Hind, Samira, Seloua, Hesna et Kenza qui
sans leur encouragement ce travail n'aurais jamais vue le jour
A tous ceux que j'aime.*

Avant-propos

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire de de Biologie Moléculaire et le laboratoire de Qualité Analyse du Centre de rechercher en Biotechnologie.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Mme. BENBOUZA Halima, Professeur à l'Université de Batna -1- Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour l'intérêt porté pour à mon sujet de recherche. Ses apports scientifiques et logistiques ainsi que ses rapports humains dans le suivi et la réalisation de mes travaux de recherche ont été d'une qualité supérieure et fructueuse.

Mes remerciements les plus chaleureux et fraternels au président du jury, le Professeur Abdelmalek CHORFI, enseignant à l'Université de Batna -2- d'avoir accepté, malgré ses préoccupations et ses tâches d'enseignement et d'encadrement de présider cette thèse.

Mes remerciements vont aussi à Mr Lakhdar KHELIFI, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieur d'Agronomie, d'avoir eu l'amabilité d'accepter volontairement et aimablement de critiquer et de juger ce travail. Je suis particulièrement reconnaissante et honoré par sa participation au jury de cette thèse.

Je tiens à remercier également Mr Abdelkrim BENBELKACEM, Directeur de Recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique, d'avoir accepté, malgré ses préoccupations, de lire et de juger ce travail. Qu'il trouve ici mes sincères sentiments de gratitude et de respect.

Que Mr Ismail CHAFAA, Maitre de conférence à l'université de Batna 2, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mr Djamel FAHLOUL, Professeur à l'université de Batna -1- d'avoir accepté, de lire et de juger ce travail.

Je tiens à remercier vivement mon maître de formation Dr Bernard CHINA pour m'avoir initié à la biologie moléculaire, pour le temps passé ensemble et le partage de son expérience au quotidien. Grâce aussi à sa confiance j'ai pu m'accomplir totalement dans mes missions. Il fut d'une aide précieuse dans les moments les plus délicats. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Au Directeur Générale de l'Institut technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne « ITAFV » Mr Mahmoud MENDIL, Mr Sebai, Mme Kessiri pour leur support et orientation.

A tous les personnels du CRA-Oli, Federia, Alba et Savino qui ont rendu mon séjour en Italie si agréable, plein d'encouragement, d'espoir et de compréhensions. Au Dr. Innocenzo Muzzalupo et Dr. Enzo Péri que je remercie beaucoup pour leur chaleureux accueil.

Mes sentiments les plus profonds et remerciements infinis à mes collègues et amis du Centre de Recherche en Biotechnologie, pour les relations amicales, conviviales, fraternelles et professionnelles qu'ils ont su tisser en dehors et au sein du laboratoire. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Boudchicha Rima hind, Boughedda Samira, Boumegoura Ali, Belabed Zoubida, Amamra Imen, Bourasse Ali, Belaidi Amine, Boukebousse Khaled, Ouffroukh Karima et Derdour Mouna, pour leur soutien et les aides prodigués.

Je tiens également à remercier tout particulièrement ma famille pour leur soutien inconditionnel tout au long de ce doctorat. Merci tout spécialement à mon frère et mes sœurs pour leur soutien durant toutes ces années.

Un grand merci à vous, maman et papa, beaucoup de ce que je suis devenu dépend de vous. Je suis très fier de vous avoir comme parents et je m'en trouve chanceuse.

Je terminerai par remercier du fond du cœur celui qui a été à mes côtés aux moments les plus durs ainsi qu'aux plus beaux. Un grand merci à toi Sofiane pour m'avoir soutenu par ta présence et ton aide au cours de ces dernières années.

Sommaire

Introduction générale

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I. Présentation Générale

1. Origine et historique de l'olivier.....	4
2. Description botanique	5
2.1 Famille des <i>Oleacea</i>	5
2.2 Le taxon <i>Olea europaea</i> subsp <i>europae</i>	7
2.3 Caractéristiques morphologiques.....	7
2.4 Caractéristiques physiologiques.....	9
2.5 Cycle évolutif annuel.....	10
3. Exigence de l'olivier.....	12
3.1 Exigences climatiques.....	12
3.2 Exigences édaphiques.....	13
4. Importance économique et social.....	13

II. Origine et intérêt de l'étude de la diversité génétique

1. Diversité de l'olivier dans le monde.....	16
2. Diversité de l'olivier en Algérie.....	18
3. Polymorphisme de plante.....	20
3.1 Polymorphisme phénotypique.....	21
3.2 Polymorphisme biochimique.....	22
3.3 Polymorphisme moléculaire.....	23
3.3.1 Les Microsatellites « SSRs ».....	25

III. L'huile d'olive : étude physico-chimique et organoleptique

1. Classification et composition de l'huile d'olive.....	29
2. Caractéristiques de l'huile d'olive.....	30

2.1 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile monovariétale.....	30
3. Composition chimiques.....	30
3.1 Fraction saponifiable.....	31
3.2 Fraction insaponifiable.....	31
4. Caractéristiques organoleptiques.....	32

Chapitre II : Matériels et méthodes

1. Etude du polymorphisme phénotypique chez l'olivier	34
1.1 Echantillonnage.....	34
1.2 Méthodologie.....	35
2. Descripteurs de l'huile d'olive.....	41
2.1 Récolte et extraction de l'huile.....	41
2.2 Détermination des indices de qualité de l'huile d'olive.....	42
2.3 Détermination des biophénols totaux.....	44
2.4 Identification des acides gras dans l'huile d'olive par GC/MS.....	44
3. Etude du polymorphisme génotypique.....	45
3.1 Matériel végétal.....	45
3.2 Les marqueurs moléculaires.....	45
3.3 Méthode.....	46
3.3.1 Extraction de l'ADN.....	48
3.3.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) et révélation du polymorphisme.....	48
3.3.3 Méthode pour l'analyse de fragments d'ADN (taille et quantification).....	49
4. Méthodes d'analyse des données.....	51
4.1 Les données morphologiques.....	51
4.2 Les données moléculaires.....	51

Chapitre III : Résultats et discussions

I. Caractérisation morphologique

1. Les caractères morphologiques qualitatifs.....	53
1.1 Observation de l'aspect de l'arbre.....	53
2. Les caractères morphologiques quantitatifs.....	54
2.1 Analyse statistique descriptive : facteur années.....	54
2.1.1 Caractères des feuilles.....	55
2.1.2 Caractères des fruits.....	55
2.1.3 Caractères des endocarpes.....	56
2.2 Analyse de la variance.....	57
2.2.1 Longueur de la feuille « LF ».....	57
2.2.2 Longueur du fruit« L Fr ».....	58
2.2.3 Caractères de l'endocarpe.....	58
2. 3 Analyse en composante principale (ACP).....	61
2.4 Classification ascendante hiérarchique (CAH).....	66

II. Caractérisation moléculaire

1. Extraction de l'ADN génomique de l'olivier.....	69
2. Mise au point et optimisation de la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR/SSR).....	71
3. Caractérisation des amorces SSRs.....	72
3.1 Evaluation du polymorphisme des SSRs.....	72
3.2 Classification et identification des profils génétiques.....	75
3.3 Structure génétique des cultivars d'olive étudiés.....	76
3.4 Diversité génétique intra et interspécifique.....	82

III. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile monovariétale

1. Indices de qualité de l'huile d'olive.....	83
1.1 Acidité.....	83
1.2 Indice de peroxyde.....	84
1.3 Absorbance dans l'ultraviolet.....	85

2. Composition chimique de l'huile d'olive.....	86
2.1 Détermination des phénols totaux par Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance (HPLC).....	86
2.2 Composition en acides gras des huiles par GC/MS.....	89
3. La classification ascendante hiérarchique des huiles.....	92
Synthèse des résultats et discussion générale	
1. Synthèse de la caractérisation morphologique.....	94
2. Synthèse de la caractérisation biochimique.....	94
3. Synthèse de la caractérisation moléculaire.....	95

Liste des figures

Figure N°1 : Distribution naturelle du complexe *Olea europaea* dans le monde (Rubio de Casas *et al.*, 2006)

Figure N°2 : Cycle de développement annuel de l'olivier (Maillard, 1975)

Figure N°3 : Production oléicole mondiale : estimations pour la saison 2010/2011 (données du Conseil oléicole international)

Figure N°4 : Carte oléicole de l'Algérie (Source : ITAFV, 2008)

Figure N°5 : Schéma résumant le développement, la distribution, les fonctions et applications des microsatellites

Figure N°6 : Variations des moyennes arithmétiques de la longueur de la feuille (mm) sur trois années.

Figure N°7 : Variations des moyennes arithmétiques de la longueur du fruit (mm) sur trois années.

Figure N°8 : Cercle de corrélation des 11 variables morphologiques (F1 et F2)

Figure N°9 : Projection des cultivars sur le plan factoriel (1-2)

Figure N°10 : Projection en biplot (cultivars-caractères morphologiques) sur le plan factoriel 1-2

Figure N°11 : Dendrogramme pour les 7 cultivars par la méthode CAH

Figure N°12 : Profils génomique SSR générés par les amorces GAPI59, UDO28, UDO A2 et GAPI 101 de 12 cultivars algériens

Figure N°13 : Fréquence allélique pour l'amorce GAPI59

Figure N°14 : Fréquence allélique pour l'amorce GAPI103A

Figure N°15 : Représentation graphique des différents indices génétiques

Figure N°16 : Pourcentage des loci polymorphes

Figure N°17 : Dendrogramme des relations génétiques entre les 26 cultivars d'olivier analysés sur la base des données moléculaires SSR utilisant la matrice de similarité de l'indice SM et l'algorithme UPGMA

Figure N°18 : Relation entre K (nombre présumé de cluster) et delta K

Figure N°19 : Structure des cultivars et de ces accessions d'oliviers inférer à (K = 9)

Figure N° 20 : Pourcentage de la variance moléculaire

Figure N°21 : Acidité des différents échantillons d'huiles

Figure N°22 : Indices de peroxyde des différents échantillons d'huiles

Figure N°23 : Coefficient d'extinction spécifique à 270 nm et 232nm des différents échantillons d'huiles

Figure N°24 : HPLC type des Biophénols totaux

Figure N°25 : Teneurs en polyphénols totaux des différents échantillons d'huiles

Figure N° 26 : Chromatogramme type des esters méthyliques des acides gras

Figure N°27 : Dendrogramme pour les 7 cultivars par la méthode CAH pour les paramètres de l'huile

Figure N°28 : Représentation graphique des caractéristiques des 3 classes engendrées par la CAH

Liste des TABLEAUX

Tableau 1 : Les principales variétés cultivées dans le monde (COI, 201

Tableau 2 : Applications des marqueurs moléculaires basées sur l'ADN dans les études de l'olivier (Bracci et al. 2011)

Tableau 3 : Principales caractéristiques des différents types de marqueurs moléculaires (Rajwant et al., 2010)

Tableau 4 : Classification des microsatellites (Kalia et al, 2010)

Tableau 5 : Les différentes catégories d'huile d'olive et leurs critères de qualité (COI, 2003)

Tableau 6 : Les fractions saponifiable et insaponifiable de l'huile d'olive et grignons d'olive (ONUDI : organisations des nations unis pour le développement industriel, 2007)

Tableau 7 : Nom du Cultivar, synonymes, origine, diffusion et utilisation (Mendil et Sebai, 2006)

Tableau 8 : Caractéristiques agronomiques connues des variétés (Mendil et Sebai, 2006)

Tableau 9 : Les loci microsatellites sélectionnés pour la caractérisation moléculaire

Tableau 10 : Nom du Cultivar, nombre d'arbre, synonymes, origine, diffusion et utilisation (Mendil

Tableau 11 : Description de l'aspect générale des 7 cultivars étudiés

Tableau 12 : Moyennes arithmétiques des trois caractères (Longueur, largeur et forme) évalués de la feuille chez pour la période (2011-2013)

Tableau13 : Moyennes arithmétiques des quatre caractères (Longueur, largeur, forme et poids) évalués du fruit pour la période (2011-2013)

Tableau14 : Moyennes arithmétiques des quatre caractères de l'endocarpe (Longueur, largeur, forme et poids) évalués du fruit pour la période (2011-2013)

Tableau 15 : Moyenne de la longueur de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Tableau 16 : Moyennes de la largeur de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Tableau 17 : Forme de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Tableau 18 : Moyennes du poids de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Tableau 19 : Résultats de l'analyse ACP sur les 2 axes principaux (F1, F2)

Tableau20 : Résultats de la classification ascendante hiérarchique

Tableau 21 : Qualité et quantité de l'ADN à partir des feuilles sèches utilisant le protocole de Benbouza et *al.*, 2006

Tableau22 : Paramètres génétiques pour les 11 marqueurs SSRs

Tableau 23 : Paramètres génétiques pour les onze SSR estimés pour les 9 clusters identifiés par STRUCTURE

Tableau 24 : composition des clusters obtenus par le logiciel STRUCTURE

Tableau 25 : Matrice des distance génétique de Nei's entre les 9clusters

Tableau 26 : Valeurs moyennes des acides gras totaux des huiles des variétés (en % des acides gras totaux)

Liste des abréviations

% : Pourcentage.

°C : Degré Celsius.

μl : Microlitre.

ACM : Analyse des Correspondances Multiples.

ACP : Analyse en Composantes Principales.

ADN : acide désoxyribonucléique.

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism.

AMOVA : Analyse de la variance moléculaire.

ANOVA : Analyse de la variance.

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique.

mm : millimètre.

COI : Conseil Oléicole International.

dNTP : Désoxyribo-nucléotide triphosphate.

Fa: Fréquence allélique.

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

Fis : indice de fixation.

He : hétérozygotie attendue.

Ho : hétérozygotie observée.

mg : Milligramme.

Na : le nombre d'allèles détectés.

Pb : paire de base.

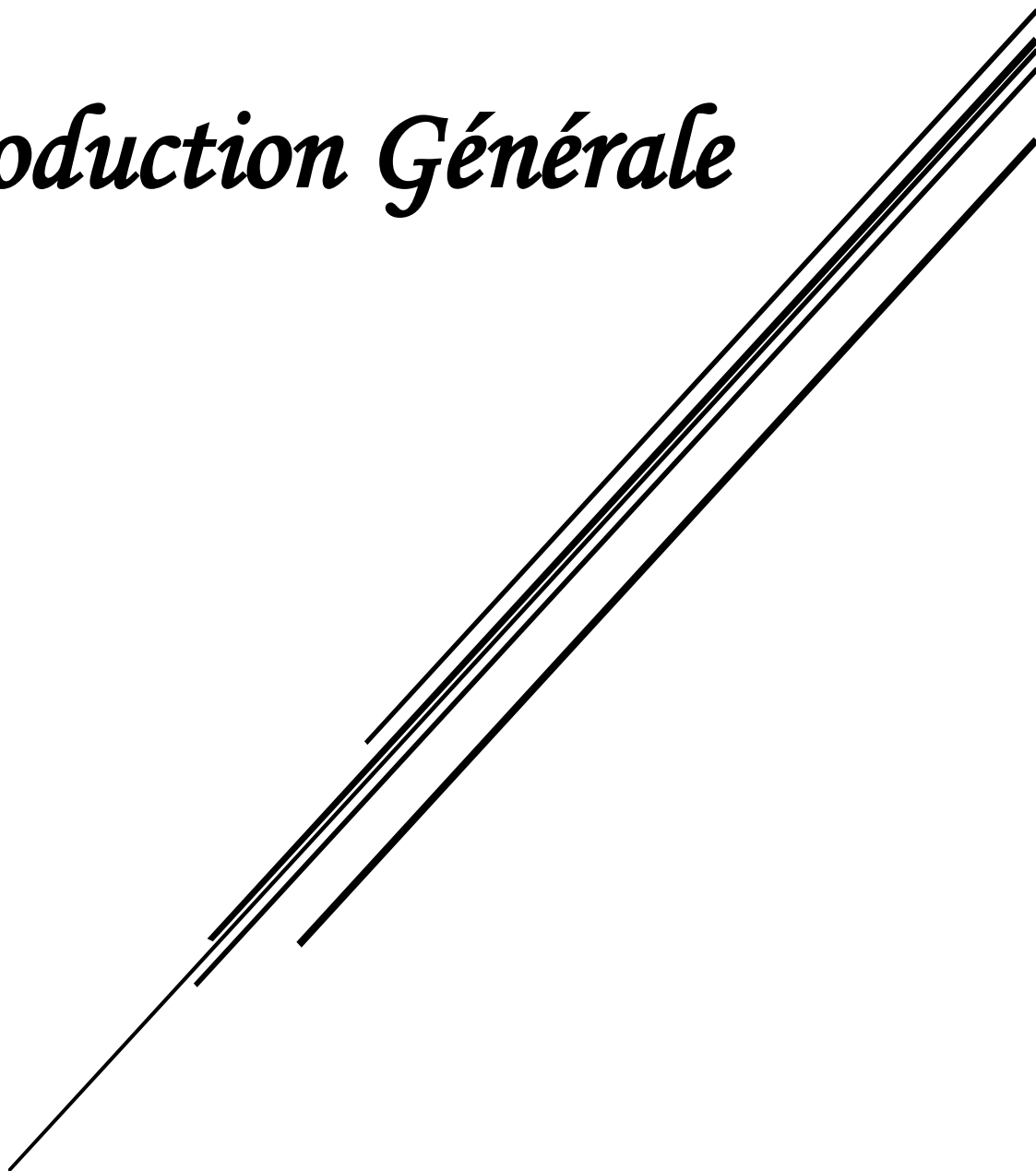
PCR : Polymerase Chain Reaction.

PD : le pouvoir de discrimination.

SSR_s : Simple Sequence Repeat.

UPGMA : Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averaging.

Introduction Générale



L'olivier l'arbre qui traverse les temps

Introduction

La diversité génétique pour l'alimentation et l'agriculture, incluant les espèces sauvages apparentées, constitue une ressource fondamentale pour l'amélioration continue des variétés et des races, nécessaire pour faire face aux changements (FAO, 2016). Ces ressources génétiques pour l'alimentation et l'agriculture (RGAA) – végétaux, animaux, ressources aquatiques, forêts, microorganismes et invertébrés, dans toute leur diversité – constituent un vivier stratégique dont tous les systèmes de production alimentaire sont tributaires. La variabilité génétique permet aux végétaux, aux animaux, aux microorganismes et aux invertébrés de s'adapter et de survivre à l'évolution de leur environnement. Conserver et utiliser des ressources extrêmement diverses, tant au niveau des espèces qu'à l'intérieur de celles-ci, revient donc à sauvegarder notre capacité de surmonter les difficultés à venir (FAO, 2016). L'olivier présente deux formes, une sauvage qui se nomme oléastre « *Olea europaea subsp. europaea var. sylvestris* » et l'autre cultivée, olivier « *Olea europaea subsp. europaea var. sativa* ». En fait, le patrimoine génétique oléicole mondial est très riche en variétés. Il est constitué par plus de 2,600 variétés différentes (Muzzalupo et al, 2014). En Algérie, le patrimoine oléicole national est répartie sur une superficie d'environ 328.884 hectares (FAOSTAT, 2013) L'oléiculture algérienne est située principalement dans la partie nord du pays, où la plupart des vergers (80%) sont situés dans des zones montagneuses avec des sols pauvres. D'après Chaouki et al (2006) rajoute, il existerait plus de 150 cultivars d'oliviers cultivés. Mais, les nouvelles prospections semblent indiquer l'existence de nouveaux cultivars non inventoriés. Cependant, la caractérisation et la classification de ces cultivars est confrontées à d'énormes problèmes de synonymie, d'homonymie et de confusion qui règnent dans leurs appellations (Ouazzani et al., 1995).

Actuellement, Il est admis que l'utilisation de la biodiversité dans le cadre de l'amélioration végétale présuppose, entre autres, une connaissance des géotypes existants localement et adaptés à des environnements particuliers. Alors que pour le cas de l'olivier en Algérie, à part quelques travaux, nous avons constatés un manque considérable d'informations et de travaux de recherche que ça soit pour la caractérisation variétale, la conservation ou la valorisation du germoplasme. En effet, l'identification des cultivars de l'olivier est basée souvent sur des descripteurs morphologiques, biochimiques et agronomiques qui sont influencés par les facteurs environnementaux. Une identification précise et non ambiguë des cultivars permettra de surmonter ce problème. Cela est possible moyennant l'utilisation des marqueurs moléculaires, qui est incontournable, non seulement pour l'identification ; mais aussi pour la

préservation et la valorisation de la diversité génétique de nos ressources génétiques lors de la planification de nouvelles aires de culture et la réalisation des programmes d'amélioration.

C'est dans ce cadre et dans la perspective de contribuer à l'amélioration et à la gestion de cette ressource génétique importante que notre étude s'inscrit. En effet, ce travail de doctorat a fait l'objet d'un projet de recherche dans le cadre du Programme Nationale de Recherche de Biotechnologie (PNR Biotechnologies). Les principaux objectifs fixés au départ pour ce projet de recherche étaient de :

1. Etudier la diversité de certains cultivars d'olivier algérien par différentes approches à savoir phénotypiques et moléculaires.
2. Constituer une base de données, notamment moléculaire, pour les cultivars inventoriés.
3. Contribuer à l'élaboration d'un catalogue national des cultivars algériens.
4. Participer avec les partenaires dans le processus création d'un label pour l'huile d'olive algérienne.

A cette fin, nous avons réalisé des prospections et nous avons optés pour l'étude de cultivars d'olivier de la collection de Sidi Aiche, avec notre partenaire l'ITAFV, et de la commun Sofian à Batna, avec un partenaire privé. Tout d'abord, nous avons procédé à la caractérisation morphologique sur base des descripteurs du Conseil oléicole international (COI, 1997). Parallèlement, nous avons effectués une caractérisation moléculaire à l'aide de marqueurs d'ADN de type microsatellites, qui sont plus utilisés et considérés comme les plus discriminants pour le génotypage aussi bien de l'olivier que d'autres espèces (Diaz et *al.*, 2006 Sarri et *al.*, 2006; Baldoni et *al.*, 2009; Bracci et *al.*, 2009; Erre et *al.*, 2010; Díez et *al.*, 2011; Fendrin et *al.*, 2014; Linos et *al.*, 2014).

Nous avons également utilisés des marqueurs biochimiques pour caractériser l'huile d'olive monovariétale, il s'agit de la détermination des indices de qualité de l'huile d'olive, la composition en acides gras par GC/MS et le dosage des composés phénoliques par HPLC.

Ce document décrit notre travail et s'articule comme suit :

- ✓ Une première partie relative à l'étude bibliographique comprenant trois chapitres dont le premier est une présentation générales de l'olivier, c'est-à-dire son origine, historique une description botanique de cette variété et ces exigences et enfin son importances sur le plan international et national. Une deuxième partie décrit l'importance de l'étude de la diversité génétique ainsi que les outils utilisés pour terminer avec un dernier chapitre sur le produit noble de l'olivier qui est l'huile d'olive est les différentes méthodes pour la classification des huiles.

✓ Une deuxième partie présentant le matériel végétal utilisé, les techniques et les méthodes utilisées pour la caractérisation phénotypiques, moléculaire et biochimiques de l'huile d'olive ainsi que les méthodes d'analyses statistiques des données.

✓ Une troisième est dernière partie concernant les résultats obtenus, leurs analyses et leurs discussions.

Enfin une synthèse générale des résultats obtenus, puis une conclusion résumant les différents résultats obtenus et les perspectives de ce travail.

Chapitre I :

Synthèse Bibliographique



L'olivier l'arbre qui traverse les temps

I. Présentation Générale

1. Origine et historique de l'olivier

L'olivier (*Olea europaea* L.) est l'un des plus anciennes cultures de la région méditerranéenne où il a occupé depuis la préhistoire une place majeure dans la culture de cette région. Les analyses de la diversité morphologique et génétique ont démontré que la ségrégation de la population sauvage de l'olivier s'étend sur un axe est-ouest ce qui reflète sa division bio-géographique dans le bassin méditerranéen où les régions orientales et occidentales sont séparées par une ligne Mer Adriatique et le désert de Libye (Blondel et Aronson et *al.*, 1995; Besnard et *al.*, 2000. 2002a,b; Lumaret et *al.*, 2004).

La culture de l'olivier est introduite au proche orient au début de l'Âge de Bronze suite à la découverte d'ancienne huilerie, de grains de pollen, de bois et de noix d'olivier dans les sédiments (Zohary and Spiegel-Roy, 1975 ; Liphshitz et *al.* 1991). Alors, que pour la région nord-ouest, les processus de domestication et l'émergence de l'agriculture et des pratiques de sélection ont été reconnus à partir du Chalcolithique Âge du Bronze suite à l'analyse des noyaux d'olives archéologiques et modernes (Terral, 2000 ; Terralet *al.*, 2004). De nos jours, l'olivier a largement diffusé au-delà de son aire d'origine suite à sa dispersion par l'homme aux Etats Unis, en Australie, à la Nouvelle Zélande et même dans les Iles du Pacifique (Green, 2002 ; Besnard et *al.*, 2007).

Dans l'Afrique du nord, l'oléastre y existait probablement bien avant le XII^e millénaire et le terme « Azemmour » qui désigne l'olivier dans la langue berbère, ne peut se rattacher à aucune racine sémitique, suggérant par-là que la culture de l'olivier était antérieure à l'arrivée des Phéniciens (XI^e siècle avant J.C) (ChabourM., 2003). Camps-Fabrer, 1984, confirme que dès le Villafranchien, *Olea europaea* L. apparaît dans de nombreux sites sahariens et les analyses de charbon et de pollens conservés dans certains gisements ibéromaurusiens (Taforalt, Grotte Rassel, Courbet) ou capsien (Ouled Djellal, Relilaï) attestent que l'oléastre existait en Afrique du Nord dès le XII^{ème} millénaire et certainement bien avant.

A l'arrivée des Romains en Afrique du Nord, les Berbères savaient greffer les oléastres, alors que dans le territoire occupé par les Carthaginois une véritable culture avait commencé à se répandre. Rome allait donc profiter de l'expérience punique pour étendre la culture de l'olivier à tout le territoire occupé par elle. En Algérie, la culture de l'olivier remonte à la plus haute antiquité. Nos paysans s'y consacraient avec art durant plusieurs siècles (Alloum., 1974).

2. Description botanique

2.1. Famille des *Oleaceae*

L'olivier appartient à la famille des *Oleaceae*, sub-famille *Oleideae*. Les récents travaux de Wallander et Albert (2000), Green (2004) basée sur des données moléculaire (phylogénie basée sur des séquences de l'ADN plastidique) et non moléculaires (nombre chromosomique, anatomie du bois et des fruits et critères biochimiques) ont démontré que cette famille est subdivisée en 5 tribus :

- ✓ *Myxopyreae* (qui regroupe les genres *Myxopyrum*, *Nyctanthes* et *Dimetra*),
- ✓ *Fontanesieae* (genre *Fontanesia*),
- ✓ *Forsythieae* (genres *Abeliophyllum* et *Forsythia*),
- ✓ *Jasmineae* (genres *Jasminum* et *Menodora*),
- ✓ et *Oleeae* (qui était appelée précédemment *Oleoideae*).

Avec près de 24 genres et 6000 espèces, le genre *Olea* comprend 33 espèces et 9 sub-espèce classer dans 3 sub-genre *Olea*, *Paniculatae* et *Tetrapilus* (Green, 2002 ; Besnard et al. 2009). Le sub-genre *Olea* lui-même est subdivisé en deux sections : *Olea*, composé exclusivement par le complexe (*Olea europaea*) et *Ligustroides*. Dans *Olea europaea*, six sous-espèces ont été identifié, de l'Afrique du Sud à la Chine, à travers les montagnes du Sahara, la Macaronésie et le bassin Méditerranée (Vargas et al., 2001; Green, 2002; Doveri and Baldoni, 2007; Besnard et al., 2009). La figure 1 illustre la distribution des formes natives du complexe *O. europaea* (Besnard et al., 2007) dans le monde.

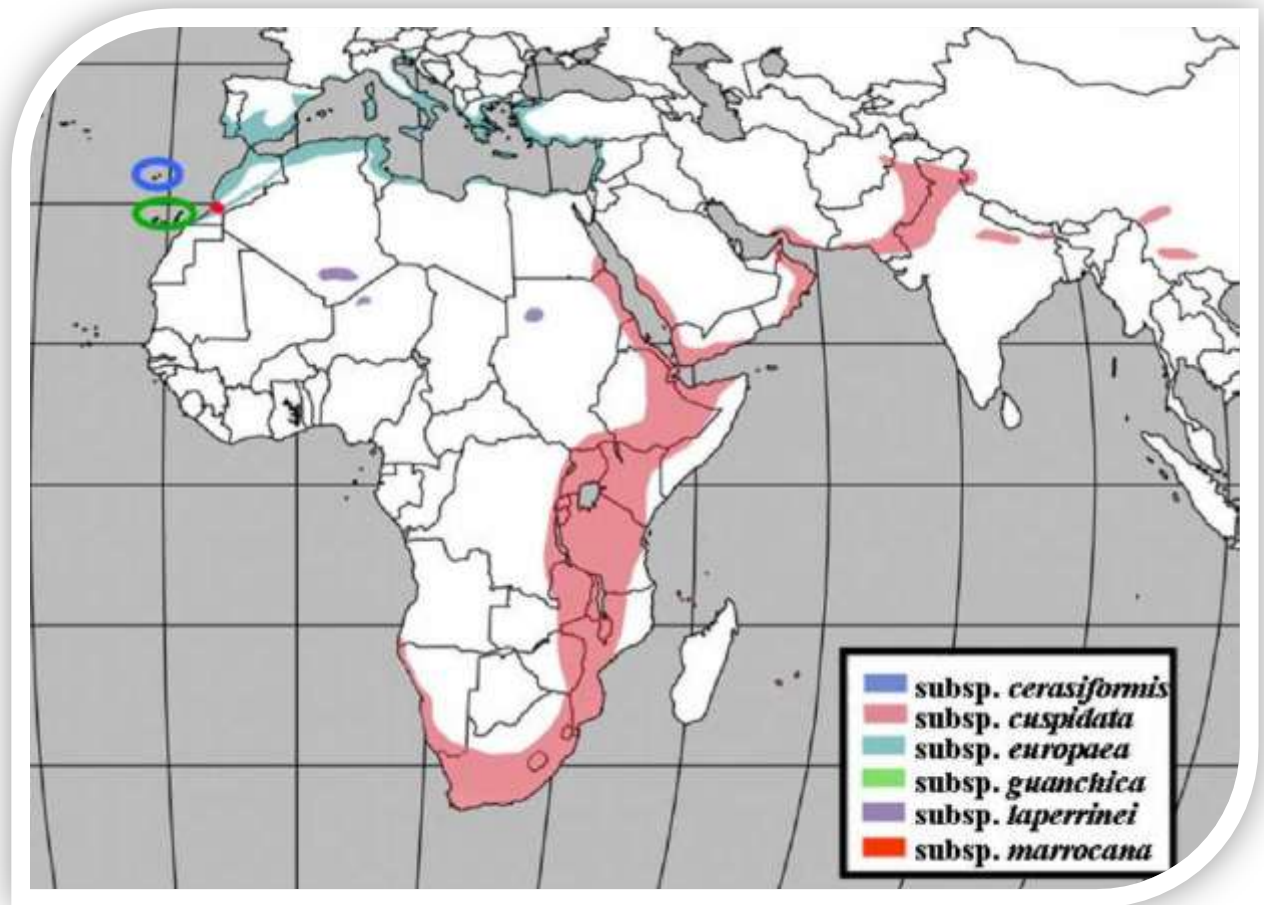


Figure 1 : Distribution naturelle du complexe *Olea europaea* dans le monde (Rubio de Casas et al., 2006)

- (1) Subsp. *europaea* : comprend deux variétés *europaea* (olive cultivé) et *sylvestris* (olive sauvage) : présent dans le bassin Méditerranéen ;
- (2) Subsp. *cuspidata* : s'étend du sud-est de l'Asie au sud-ouest de la Chine, et de la péninsule arabique à travers l'Afrique de l'Est et du Sud ;
- (3) Subsp. *laperrinei*: uniquement dans la région du Sahara;
- (4) Subsp. *marroccana*: uniquement au Maroc;
- (5) Subsp. *cerasiformis*: uniquement dans l'île de Madère;
- (6) Subsp. *guanchica*: dans les îles Canaries.

Les études du niveau de ploïdie spécifique pour ces 6 sous-espèces par la combinaison entre analyses moléculaire et cytométrie ont révélé qu'il sont tous diploïde à l'exception de *cerasiformis* (4x), *maroccana* (6x) ; avec des cas de triploïdie chez *laperrinei* (Besnard *et al.*, 2008).

2.2. Le taxon *Olea europaea subsp europaea*

Ce taxon regroupe les formes cultivées (var *europaea*) et les formes sauvages (var *sylvestris*= Oléastres). C'est des espèces arborescentes à feuilles persistantes, à pollinisation anémophile, et thermophile. Les différences morphologiques entre forme sauvage et cultivées sont dues essentiellement à des environnements différents. Avec un nombre chromosomique de 23, une multiplication par voie végétative et une durée de vie excédent 500ans avec des arbres exceptionnels âgés de plus de 2.000 ans enregistrés dans divers pays.

Au moins, 1250 variétés sont conservées dans plus de 100 collections. Ils ont été décrites et répertoriés dans la base de données de la FAO, beaucoup d'autres variétés et d'écotypes locaux issus d'hybridation et de mutation contribue à la richesse du patrimoine génétique de l'olivier (Bartolini *et al.*, 2008; Cantini *et al.*, 1999).

2.3. Caractéristiques morphologiques

L'olivier est une espèce vivace à feuillage persistant dont la croissance est rythmée dans les régions tempérées, il se distinguant par sa pérennité et sa grande longévité. Aussi, il est réputé pour sa grande rusticité et sa plasticité lui permettant de se développer dans différentes conditions environnementales. Il n'est pas rare de voir de vieux oliviers dépasser 15 à 20 mètres de hauteur, avec un tronc de 1,5 à 2 mètre de diamètre.

2.3.1 La partie aérienne

❖ Le tronc

C'est le principale support de l'arbre, qui va du collet au niveau du sol jusqu'au point d'insertion de la première branche. Il est d'aspect et de couleur variable selon l'âge. Chez les jeunes arbres, le tronc est droit, circulaire, lisse de couleur gris-verdâtre. En vieillissant, il devient noueux, crevasse, élargi à la base en prenant une couleur grise foncée presque noire. D'après Loussert et Brousse (1978), en Kabylie, la variété Chemlal était traditionnellement conduite sur un tronc élevé de 2 ou 3m du sol. Toutefois, dans la plupart des vergers, cette hauteur se situe entre 0,8 et 1,2m ce qui facilite la récolte. En Andalousie (Espagne) les vieilles plantations sont constitué d'oliviers conduits à trois troncs ayant soit le même système racinaire, soit trois plants séparés (Maillard, 1975 ; Loussert et Brousse, 1978).

❖ Les charpentières

Les charpentières maîtresse ou branches mères prennent naissance sur le tronc. Elles donnent la forme de l'arbre et le développement de la frondaison. Les sous charpentières se développent sur les charpentières est c'est à partir de leur nombreuses ramifications que la couronne de l'arbre se développera. Elles portent les rameaux feuillus et fructifères.

❖ Les rameaux

Les jeunes pousses ont une écorce claire avec une section quadrangulaire mais elles s'arrondissent en vieillissant et leur couleur passe au vert-gris puis au gris-brun. Il existe trois types de rameaux selon leur localisation sur l'arbre et leur emplacement sur le rameaux principal : les rameaux à bois, les rameaux mixtes et les rameaux à fruits.

Selon Lousert et Brousse (1978), le port de l'arbre qui est un caractère variétal dépend de la croissance de ses rameaux:

- ✓ il est érigé si les rameaux poussent verticalement,
- ✓ il est pendant, voir pleureur, si les rameaux se développent horizontalement.

❖ Les feuilles

La feuille de l'olivier est simple, entière, à pétiole court et à limbe lancéolé qui se termine par un mucron (Ruby, 1918 ; Argenson et *al.*, 1999). Les feuilles sont opposées et persistantes, leur durée de vie est de l'ordre de 3 ans. Elles possèdent des formes et des dimensions très variables suivant les variétés. Elles peuvent être ovales, ovales oblongues, lancéolées et parfois presque linéaires. Les dimensions peuvent varier de 3 à 8 cm de long et de 1 à 1,25 cm de large (Lousert Brousse 1978).

❖ L'inflorescence et les fleurs

L'inflorescence est une panicule (Chol et *al.*, 2005), constituée de grappes longues et comporter de 10 à 40 fleurs (Lousert et Brousse, 1978), d'après Ouksili (1983), ce nombre est un caractère variétal. Petites et d'un blanc jaune verdâtre. Les fleurs sont régulières, hermaphrodites avec une formule florale très simple : 4 sépales, 4 pétales, 2 étamines, 2 carpelles (Argenson et *al.*, 1999).

Suivant les variétés, les pièces florales peuvent subir des malformations: atrophie des étamines, des carpelles ou déformation du style, ce qui peut entraîner des cas de stérilité. En générale, les variétés s'autofécondent mais on a à la fois fécondation croisée et autofécondation, parfois aussi parthénocarpie suivant les variétés.

❖ Le fruit

Le fruit est une drupe à mésocarpe charnu, riche en lipide, de diamètre compris entre 1 et 3 cm (Argenson et *al.*, 1999). L'endocarpe ou noyau est dur, généralement fusiforme portant une série sillons longitudinaux. Il renferme une graine à albumen : l'amandon (Loussert et Brousse, 1978). La couleur de l'épiderme et les formes du mésocarpe et de l'endocarpe sont des caractères variétaux (Chol et *al.*, 2005). A maturation, l'épicarpe passe de la couleur vert tendre (olive verte), à la couleur violette ou rouge (olive tournante) et enfin à la couleur noirâtre (olive noire) (Loussert et Brousse, 1978).

2.3.2 La partie racinaire

Le système racinaire est fonction des conditions du sol et du mode de multiplication. Il est pivotant s'il est issu de semis et dans des terres légères, fasciculé s'il est obtenu par bouturage et dans des terres lourdes. Selon Ben Rouina (2001), le nombre de racines et leur étendu à différentes profondeurs de sol sont fortement dépendants de la nature du sol. Il reste généralement localisé à une profondeur de 50 à 70cm. Ce système racinaire puissant forme sous le tronc une souche ligneuse très importante dans laquelle s'accumulent des réserves, surtout quand les conditions d'alimentation sont difficiles. On appelle cette souche la « matte » (Loussert et Brousse, 1978).

2.4 Caractéristiques physiologiques

Les propriétés biophysiques de l'olivier constituent, après le relief et le climat, un troisième facteur avec lequel l'oléiculteur doit composer. Espèce sempervirent, est arbre dont les dimensions, la forme et la production varient avec les conditions météorologiques, l'exposition, la nature du sol, les cultivars et, évidemment, les soins qui lui sont apportés (Kayoukdjian, 1989).

Dans la vie de l'olivier on peut distinguer quatre grandes périodes. Selon Maillard (1975), ces périodes suivent les conditions suivantes:

- ❖ La période de jeunesse : de 1 à 7 ans ; installation improductives.
- ❖ La période d'entrée en production : de 7 à 35 ans ; croissance avec augmentation progressive de la production.
- ❖ La période adulte : de 35 à 150 ans ; maturité et pleine production.
- ❖ La période de sénescence : au de-là de 150 ans ; sénescence, rendement décroissants et inconstants, alternance marquée des récoltes, réduction progressive de la charpente.

La sélection clonale et les méthodes culturales modernes ont largement avancé la mise à fruits des variétés d'olivier les plus précoces qui peuvent produire 2Kg d'olive dès la troisième année de plantation.

Il est aussi à noter que l'olivier ne produit convenablement qu'une année sur deux voire sur trois et ce phénomène est nommé par les producteurs "l'alternance de l'olivier". Ce fait observable et encore inexpliqué est accentué par deux autres particularités botaniques dont les conséquences peuvent être plus ou moins atténuées par les oléiculteurs. Une première particularité concerne le fait que l'olivier ne porte ses fruits que sur les rameaux ayant poussé l'année précédente, «les aoutés», d'où l'importance que revêt la taille. La deuxième particularité a trait à une induction florale tardive qui semble - selon les recherches agronomiques récentes - jouer un rôle dans la fructification. Un même bourgeon peut devenir un rameau et donc faire du bois et devenir une fleur et donc produire des olives. Sur l'olivier ce phénomène dépend de la température : plus il fera chaud, plus il produira du bois. L'intervention de l'oléiculteur sur ce point est limitée mais il peut toutefois en atténuer les effets par des amendements appropriés.

2.5 Cycle évolutif annuel

Selon Benttayeb, 1993, le cycle évolutif annuel des arbres fruitiers concerne l'ensemble des processus et des changements que subit la plante durant une année. Ces changements sont de natures biologiques, biochimiques et morphologiques et dépendent dans une large mesure des conditions externes, notamment d'aléas climatiques. Il ajoute que la réaction de l'arbre aux conditions du climat sont ainsi différentes et saisonnières et s'extériorisent visiblement par deux grandes phases : la phase de dormance ou repos et la phase d'activité. Ces deux phases sont bien apparentes et bien distinctes chez les espèces à feuilles caduques et le sont peu ou pas chez ceux à feuilles persistantes.

La figure 2 résume les étapes du cycle de développement de l'olivier (Maillard, 1975).

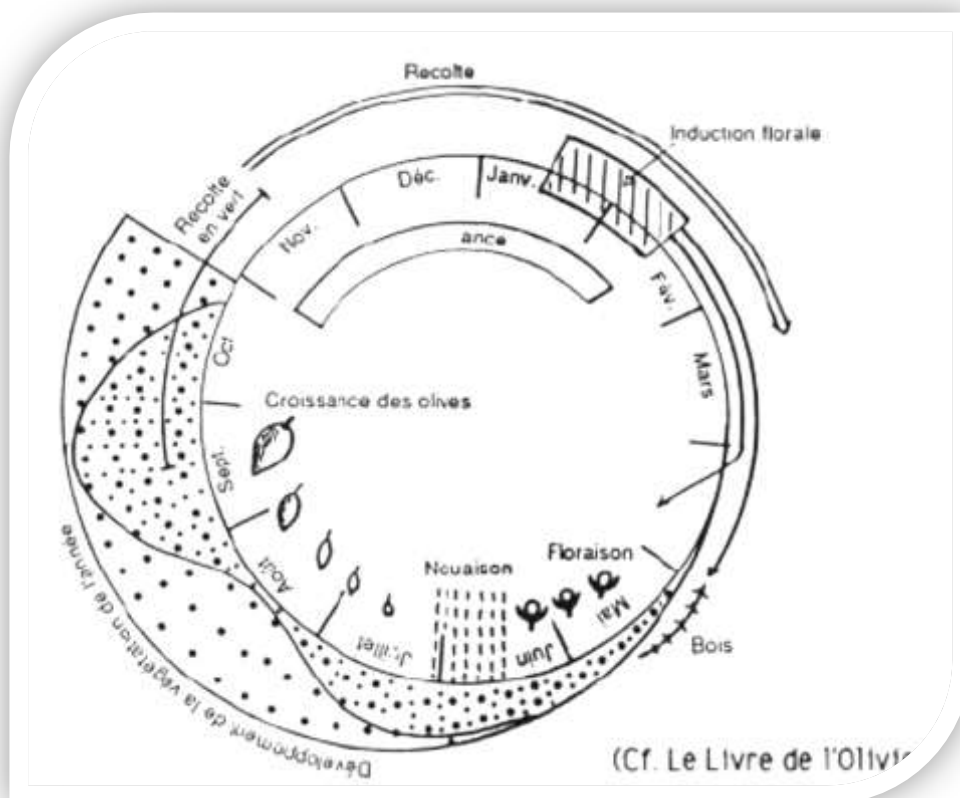


Figure 2: Cycle de développement annuel de l'olivier (Maillard, 1975)

2.5.1 La reproduction : Phénomène de stérilité et d'incompatibilité

Chez l'olivier, l'inter pollinisation ou fécondation croisée est souvent de règle. C'est une pollinisation anémophile. En effet, les cultivars d'olivier ne sont pas toutes autos fertiles, des cas de stérilité féminine donnent lieu à une proportion variable d'avortement ovarien ou bien un développement anormal du sac embryonnaire. Cette stérilité touche presque tous les cultivars (Moutier et *al.*, 2006).

Selon Villemeur et Delmas (1981), le taux d'avortement est lié aux variétés, au milieu et aux techniques culturales notamment l'irrigation. Aussi, Fontanazza (1998) indique que les températures élevées et les déficits hydriques entraînent des taux d'avortement élevés. Toutefois, son contrôle est génétique, car son degré est relativement constant pour chaque cultivar (Morettini, 1951 in Lousert et Brousse, 1978). De plus, selon Ouksili (1983), le taux d'avortement est plus fréquent chez les variétés à huile que chez les variétés d'olives de table, il a pu confirmer aussi que les fleurs situées sur les extrémités des axes de l'inflorescence sont plus fertiles que les autres.

Petri (1929 in Amirouche, 1977) attribue la dégénérescence de l'ovaire à une insuffisance de matières azotées dans les rameaux florifères. De même, Boulouha (1995) note qu'une richesse des rameaux en éléments azotés et phosphopotassiques favoriserait l'obtention d'un taux de fleurs parfaites élevé.

Au niveau de l'organe male, la stérilité revête un caractère ponctuel et ne concerne qu'un petit nombre de cultivars. L'absence de pollen a été observée chez les variétés Chemlal, Hamra et Aharoun (Chaux, 1955 in Lousert et Brousse, 1978). En 2000, Besnard *et al* a associé cette stérilité avec des polymorphismes RFLP particuliers chloroplastiques et mitochondriaux.

Pour le phénomène d'incompatibilité Herve *et al.* (1984, in Nouri et Rezzouk, 1991), stipule qu'il s'agit d'interaction pollen-style sans formation de zygote, bien que les gamètes femelles et mâles soient potentiellement fertiles. D'après Ouksili (1983), Il existe plusieurs possibilités selon l'origine respective de l'ovule et du pollen :

- ✓ **Auto-compatibilité** : variétés chez lesquelles la fécondation des ovules d'une fleur peut être assurée par le pollen de la même fleur ou par celle de même variété.
- ✓ **Auto-incompatibilité** : l'incompatibilité se produit entre le pollen et le stigmate d'une même fleur ou d'une même variété.
- ✓ **Inter-incompatibilité** : se produit lorsque le pollen d'une variété est incapable de féconder les ovules d'une autre variété.
- ✓ **Inter-compatibilité** : le pollen d'une variété est capable de féconder les ovules d'une autre variété.

Selon ce même auteur, les variétés *Azeradj* et *Frantoio* peuvent être considérées comme des bons pollinisateurs pour la variété *Chemlal*.

3. Exigence de l'olivier

3.1 Exigences climatiques

On a noté déjà que la culture de l'olivier était associée à la zone du climat méditerranéen, que ce dernier se caractérise par la douceur de l'hiver qui est la saison humide et un été chaud pratiquement sans pluie correspondant à une saison sèche. Les printemps et les automnes sont peu marqués (Lousert et Brousse, 1978). Selon le climagramme d'EMBERGER l'olivier à l'état spontané se trouve à la zone subhumide méditerranéenne.

Il redoute la très grande sécheresse qu'il trouve sur la zone subhumide qui fait tomber ses fruits avant maturation, il n'aime pas, non plus, les grosses pluies et comme trop d'humidité diminue la quantité et la qualité de l'huile : il craint les vents du sud chauds qui dessèchent les branches et peuvent causer des brûlures sur les arbres (Seroco en Algérie).

Mais ce que l'arbre craint le plus c'est le froid rigoureux de certains hivers, une température de -12°C à -14°C pendant plusieurs jours consécutifs qui le fait périr. Il a aussi besoin d'une moyenne annuelle de $+12^{\circ}\text{C}$ à 22°C , c'est un arbre avide de lumière, il donnera les meilleurs résultats sur les coteaux bien exposés au soleil (Loussert et Brousse, 1978).

3.2 Exigences édaphiques

L'olivier ne donnera de bons résultats que si son puissant système racinaire peut se développer non seulement en largeur mais aussi en profondeur. Donc, une profondeur minimale de 1 m à 1,5 m. Comme la plupart des arbres fruitiers, l'olivier, craint la présence de nappe phréatique peu profonde. Il est aussi réputé pour sa rusticité qui permet la mise en valeur de terrains extrêmement pauvres voire dégradés. Les deux facteurs de réussite de l'oliveraie en zone aride sont une faible densité de plantation et une grande profondeur du sol exploitable par les racines. Il supporte assez bien des teneurs élevées en calcaire actif, au point de vue PH il préfère les sols légèrement alcalins (PH 7,5) à alcalins (PH 8 et 8,5). Il faut s'abstenir de planter l'olivier où la teneur en NaCl dépasse 1 g/Kg de terre (Loussert et Brousse, 1978).

4. Importance économique et sociale

L'olivier a façonné, au fil des millénaires, les paysages, l'histoire, la culture et la gastronomie du bassin méditerranéen qui est encore aujourd'hui le cœur productif et commercial de l'huile d'olive. L'olivier est aujourd'hui cultivé dans toutes les régions du globe se situant entre les latitudes 30 et 45 des deux hémisphères, des Amériques (Californie, Mexique, Brésil, Argentine, Chili), en Australie et jusqu'en Chine, en passant par le Japon et l'Afrique du Sud. On compte actuellement 10,2 millions ha d'oliviers cultivés à travers le monde (FAO, 2012) mais le bassin méditerranéen est resté sa terre de prédilection, avec près de 95 % des oliveraies mondiales. Cette arbre marque les économies agraires traditionnelles et reste de 1^{ère} importance dans les pays méditerranéens, vu son adaptation particulière à ce milieu (Angles et al., 2001).

La production de l'olivier se concentre beaucoup plus dans l'Europe du sud près de 79% de la production mondiale avec l'Espagne et l'Italie comme leaders ensuite vient la Grèce, le Portugal et la France (Figure 3).

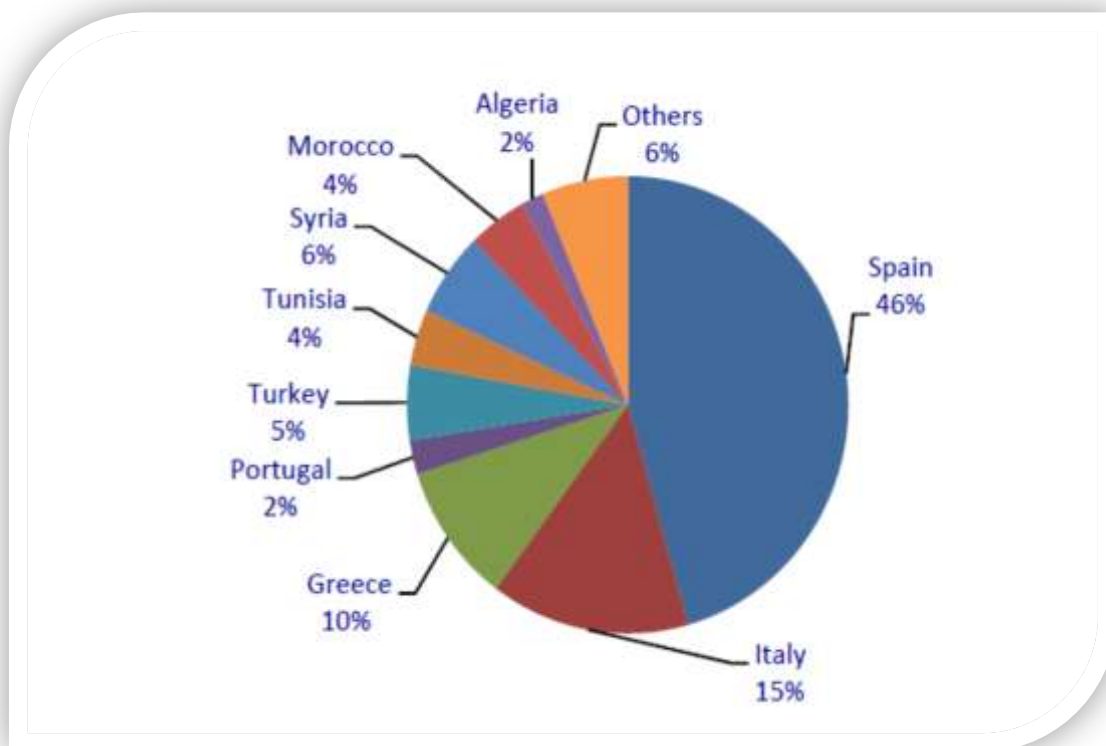


Figure 3: Production oléicole mondiale: estimations pour la saison 2010/2011 (données du Conseil oléicole international)

En Algérie l'olivier est une des principales essences fruitières, en superficie il s'étend sur plus du 1/3 (près de 34,09%) de l'espace dévolu aux cultures fruitières arborescentes, avec 32 millions d'arbres répartis sur une superficie d'environ 328 884 ha (FAOSTAT, 2013). D'après Chaux in Sekour, 2012 la culture de l'olivier se concentre dans trois principales régions : la région Centre avec 54%, l'Est 29% et l'Ouest 17%. Il ne faut pas oublier le Sud avec ces 18 000 arbres (statistique du ministère de l'agriculture, 2005). Le massif kabyle et le plus grand noyau de notre production oléicole, 90% des plantations appartiennent à une population berbère dont l'attachement à l'arbre est devenu légendaire. La Kabylie est le pays de l'olivier sauvage, qui est à la base de la création des olivettes, soit par greffage sur place soit par transplantation des semis naturels. Il existe aussi deux grandes taches oléicoles secondaires, l'une à Guelma, l'autre à Tlemcen.

Les olivettes européennes forment 40% des olivettes algérienne, principalement en dehors de la Kabylie, centre de Maillot, la Mitidja et Chleff (28%), dans le Constantinois de 63% à 70% et de 80% à 98% dans l'Oranie où elles sont les plus présentes.

La filière oléicole nationale est en grande partie dominée par le secteur privé, elle constitue une source de revenu significative pour la population rurale et offre en moyenne 55 000 emplois permanents (Benderaji et al., 2007). L'oléiculture algérienne est en grande partie à caractère familiale où l'autoconsommation est privilégiée, cela fait que la vente d'huile d'olive n'est pas assez développée. En matière d'exportation, l'Algérie exporte de modeste quantité vers le Canada, la France et la Jordanie. Le chiffre d'affaire de la filière de l'huile d'olive s'élève à 1,5 milliard de dinars et 900 millions de dinars pour l'olive de table. Les capacités de transformation pour l'olive à l'huile sont de 1,705 huilerie dont 85% sont des huileries traditionnelles et 10% des huileries modernes (Kacem., 2014).

L'olivier est l'un des principales cultures source d'aliments sains. Bien que 90% de la production d'olive est utilisée pour l'extraction d'huile (Almagro et al., 2001), la consommation d'olives de table est en augmentation dans le monde entier. Les olives contiennent des antioxydants en abondance (jusqu'à 16g / kg) de plus l'huile d'olive contient des composés considérés comme des agents anticancéreux, par exemple : terpénoïdes et le squalène (Owen et al. 2003, 2004). L'intérêt de l'olivier ne se limite plus à la seule production de l'huile et l'olive de table, puisque le grignon et le noyau sont devenus une source importante de matière première alimentaire pour les animaux.

II. Origine et intérêt de l'étude de la diversité génétique

La diversité génétique est la source fondamentale de la biodiversité. En 1989 le fond mondial pour la vie sauvage (WWF) définit la biodiversité comme: «la richesse de la vie sur terre - des millions de plantes, d'animaux et de micro-organismes, y compris les gènes qu'ils portent et les écosystèmes complexes qui créent l'environnement ». La FAO a inclus la question de la conservation, l'évaluation et l'utilisation des ressources génétiques dans ses domaines d'intérêt depuis 1970 (Mahmut Çalışkan, 2012).

La diversité génétique décrit la variabilité des gènes entre ou à l'intérieur des espèces et de leurs populations. 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 agricoles 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. Il est admis que plus la diversité est grande dans un groupe d'individus (sous-population, population, espèce) plus il sera facile pour certains individus de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. En plus de permettre une plus grande adaptabilité des individus, elle permettra également de réduire la dépression de consanguinité et diminuera ainsi le risque d'extinction (Frankham 2003, 2005). L'étude de la diversité génétique à différents niveaux hiérarchiques d'organisation peut apporter une aide précieuse à la biologie des populations et à la biologie évolutive ; deux disciplines importantes pour la biologie de la conservation. La diversité génétique est alors devenue un outil primordial pour définir des buts, des méthodes et des priorités dans des programmes de conservation (Stockwell *et al.* 2003).

1. Diversité de l'olivier dans le monde

La culture de l'olivier depuis son installation sur le pourtour méditerranéen sous ses formes sylvestres et cultivées, a été l'objet de sélections naturelle et humaine. Comme pour toutes espèces fruitières dont la culture est très ancienne l'olivier présente un nombre considérable de variétés. Cette espèce présente un grand polymorphisme dû aux influences du sol et du microclimat qui sont susceptible d'apporter des modifications qui peuvent être phénotypique et/ ou génotypique (Ouzzani *et al.*, 1995 ; Trujillo *et al.*, 1995; Belaj *et al.*, 2001). Cette richesse du matériel génétique est notamment due à la grand longévité de l'arbre, à son histoire séculaire et à la nature de sa pollinisation (Cantini *al.*, 2008 ; Bracci *al.*, 2009 ; Bracci *al.*, 2001).

L'olivier à développer une plate-forme variétale caractéristique pour chaque aire de culture, près de 1250 variétés cultivée dans 54 pays sont conservées dans près de 100 collections, et qui ont été incluses dans la base de données du germoplasme de l'olivier de la FAO (Bartolini 2008). Ce nombre est certainement plus élevé à cause du manque d'informations pour beaucoup de cultivars locaux et écotypes (Cantini *et al.*, 1999 ; Muzzalupo *et al.*, 2014). La plus grande partie de ces cultivars vient des pays de l'Europe méridionale tels que l'Italie avec 610 cultivars, l'Espagne 280 cultivars, la France 100 cultivars, la Grèce 101 cultivars et la Tunisie 70 cultivars (Corrado *et al.*, 2010 ; Linos *et al.*, 2014). Les principales variétés cultivées dans le monde sont portées dans le tableau 1.

Tableau 1: Les principales variétés cultivées dans le monde (COI, 201

Pays	Principales variétés
Albanie	Kaliniot
Algérie	Chemlal ; Sigoise ; Azeradj ; Limli ; Blanquette de Guelma
Argentine	Arauco
Chili	Azapa
Croatie	Lastovka ; Levantinka ; Oblica.
Chypre	Ladoelia
Egypte	Aggezi Shami ; Hamed ; Toffah
Espagne	Alfafara ; Aloreña ; Arbequina ; Bical ; Blanqueta ; Callosina ; Carasqueno de la Sierra ; Castellana ; Changlot Real ; Cornicabra ; Empiltra ; Farga ; Gordal de Granada ; Gordal Sevillana ; Hojiblanca ; Lechin de Granada ; Lechin de Sevilla ; Loaime ; Lucio ; Manzanilla cacereña ; Manzanilla Prieta ; Manzanilla de Sevilla ; Mollar de Ceiza ; Morisca ; Morona ; Morrut ; Palomar ; Picual ; Picudo ; Rapasayo ; Royal de Gazorla ; Sevillena ; Verdial de Badajoz ; Verdial de Huevar ; Verdial de Velez-Málaga ; Verdiell ; Villalonga.
France	Aglandau ; Bouteillan ; Grossane ; Lucques ; Picholine Languedoc ; Salonenque ; Tanche.
USA	Mission
Grèce	Adramitini ; Amigadalolia ; Chalkidiki ; Kalamone ; Conservolia ; Koroneiki ; Mastoidis ; Megaritiki ; Valanlia.
Italie	Ascolana Tenera ; Biancolilla ; Bosana ; Canino ; Carolea ; Casaliva ; Cassanese ; Cellina di Nardo ; Coratina ; Cucco ; Dolce Agogia ; Dritta ; Frantoio ; Giarraffa ; Grignan ; Itrana ; Leccino ; Majatica di Ferrandina ; Maraiolo ; Nocellara del Belice ; Nocellara Etnea ; Olierola Barese ; Oliva di Cerignola ; Ottobratica ; Pendolino ; Oisciotana ; Pizz'e Carroga ; Rosciola ; Sant Agostino ; Santa Caterina ; Taggiasca.
Jordanie	Rasi'i
Liban	Soury
Maroc	Haouzia ; Menara ; Meslala ; Picholine Marocaine
Palestine	Nabali Baladi
Portugal	Nabali Baladi
Slovénie	Bianchera

Syrie	Abou-Satl ; Doeblé ; Kaissy ; Sorani ; Zaity
Tunisie	Chemlali de Sfax ; Chétoui ; Gerboui ; Meski ; Oueslati
Turquie	Ayvalik ; çekiste ; çebebi ; Domat ; Erkence ; Gemlik ; Izmir Sofralik ; Memecik ; Uslu.
Yugoslavie	Zutica.

Vue cette richesse du patrimoine oléicole plusieurs banques de germoplasmen vue le jour pour des fin de conservation et d'utilisation. Parmi les plus importantes on peut citer : OWGB « Olive World Germoplasm Bank » à Cordoba en Espagne qui a été créer initialement en 1970 par FAO-INIA et COI, elle comprend 499 accessions (Trujillot et al., 2014) . Celle de Marrakech au Maroc crée en 2003 avec 561 accessions (Houane et al., 2011), à Sfaxe en Tunisie crée en 1990 avec plus de 120 accessions, en Italie à Cosenza avec plus de 500 accessions, plus précisément au département d'agriculture de Davis, Californie contenant 108 accessions (Koehmstedt et al., 2011).

2. Diversité de l'olivier en Algérie

L'olivier est principalement cultivé sur les zones côtières du pays à une distance de 8 à 100 km de la mer où il trouve les conditions favorables pour son développement. Il occupait, en 2009, une superficie de 310 000 hectares (Khoumeri, 2009), qui se répartie sur tout le territoire comme le montre la figure 4.

Les principaux est les plus anciens vergers oléicoles se trouvent dans les régions montagnardes et les collines recouvrant une surface de 195 000 hectares (Khoumeri, 2009), ainsi que dans les plaines occidentales du pays (Mascara, Sig, Relizane..) et dans les vallées comme la Soummam. Cette superficie a bien nettement augmenté par la mise en place d'un programme national pour le développement de l'oléiculture intensive dans les zones steppiques, présahariennes et sahariennes (Msila, Biskra, Ghardaïa...). La carte si dessous montre la nouvelle distribution oléicole, il est net expansion des superficies vers les zones steppiques, présahariennes et même sahariennes.

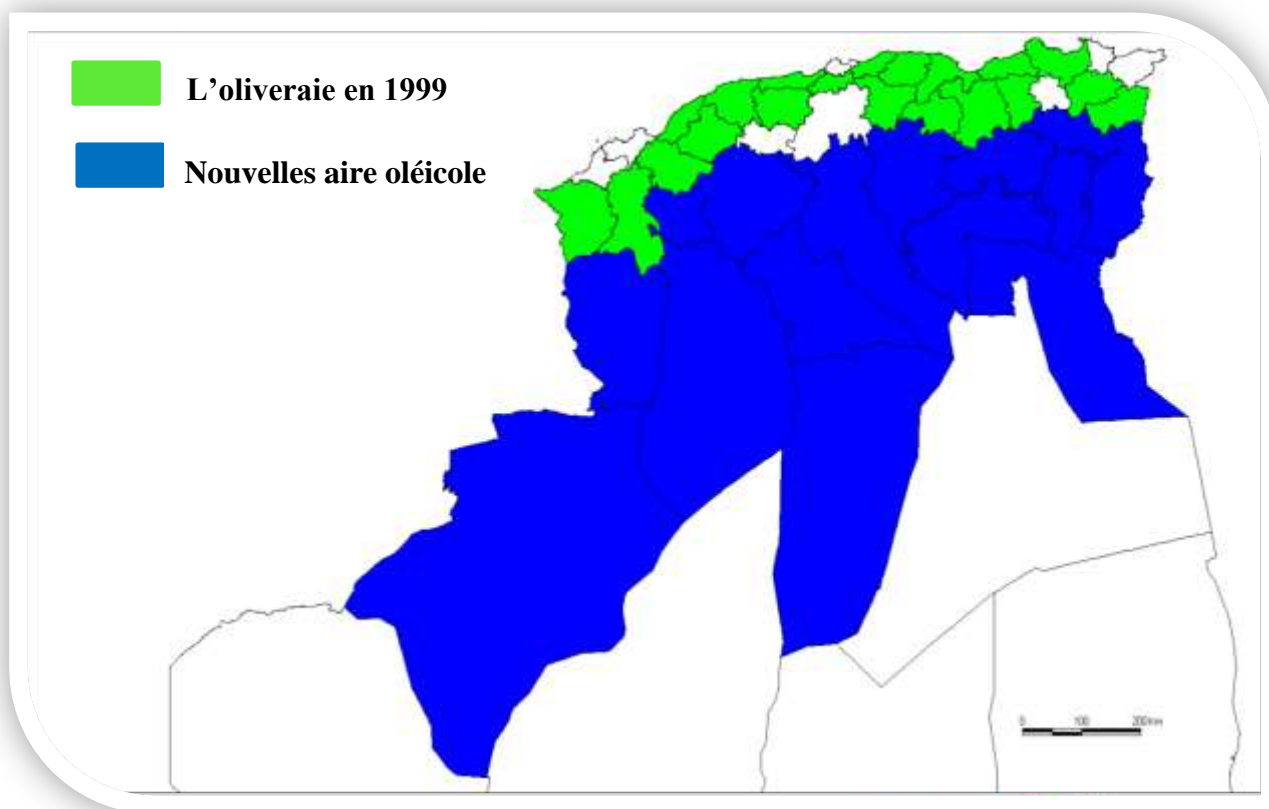


Figure 4: Carte oléicole de l'Algérie (Source : ITAFV, 2008)

Le verger oléicole algérien comprend une diversité variétale, selon les travaux réalisés par Hauvill (1953), il existe 150 variétés d'olivier plus au moins cultivé. En plus des variétés locales nous avons des variétés introduites. Uniquement 36 variétés ont été identifiées sur la base de discriminateurs morphologiques. Nous citons ci dessous les variétés locales les plus cultivées.

Chemlal : Il ne s'agit d'une variété mais d'une population, elle constitue plus de 40% du verger oléicole national (Pagnol, 1985). Les fruits relativement petits de 2,5 g avec un rendement en huile de l'ordre de 14 à 16%. Elle est autostérile par absence de pollen. Il existe plusieurs types de Chemlal : Chemlal de Tizi-Ouzou; Chemlal précoce de Tazmalt; Chemlal de l'Oued-aissi; Chemlal blanche d'Ali-cherif; Petite Chemlal pendante.

Azeradj : Représente 10% des oliviers cultivés en Algérie. Elle se trouve localisée en Kabylie souvent en mélange avec la variété « Chemlal » dont elle est le pollinisateur. Variété à double aptitude, auto fertile avec un fruit assez gros (3 à 5 g) avec un rendement en huile entre 24 à 28 %. Il existe également plusieurs types locaux de cette variété : Azeradj de Seddouk, Azeradj de Beni-Bou-Melek, Grosse Azeradj d'Ali-Cherif

Limli : Cette variété est localisée dans la vallée de l'Oued Soummam. Elle représente 8 % du verger oléicole algérien. Ses fruits sont petits (1 g à 2g) et sa teneur en huile est de 15% on lui reproche une huile légèrement acide, sa maturité et assez précoce.

Sigoise : Elle est surtout cultivée dans l'Ouest du pays, en Oranie, et plus particulièrement dans la plaine du Sig. Elle représente 20 % des oliviers cultivés en Algérie. Auto-fertile, fruit moyen, d'un poids de 3 à 3,5 g. Rendement en huile de 18 à 20 %. Cette variété est utilisée principalement pour la production d'olives de table en vert ou en noir.

Rougette de la Mitidja : elle est fréquente dans la plaine de la Mitidja et sur le piémont de l'Atlas, à faible altitude, c'est une variété à huile.

Rougette et Blanquette de Guelma : ce sont deux variétés à huile et se trouvent en mélange dans les régions de l'Est du pays (Constantinois).

Bouchouk : Variété cultivée surtout dans la basse vallée de l'Oued Soummam, en petite Kabylie. Mais on la trouve également en grande Kabylie en mélange avec « Chemlal », et dans l'Est de pays (Constantinois). Les fruits sont assez gros (3-5 g) et donnent un rendement moyen en huile de 16 à 20 %, la variété est toutefois orientée vers la conserve.

Blanquette: Très voisine de la Chetoui de Tunisie à fruit assez gros à noyau pointu, huile fruitée infigeable.

3. Polymorphisme de plante

Le nombre si élevé de cultivars constituant le patrimoine variétale oléicole, les nombreux cas de synonymie et d'homonymie semblables rendent la classification et l'identification variétale difficile. L'étude du polymorphisme est une caractéristique souvent abordé en biologie. Que ce soit pour différencier des populations d'organismes, déterminer les pathvars, cibler des populations naturelle (cas de l'olivier) pour en apprécier les relations et donc les distances génétiques ou déterminer l'écotype (Bertheau et al., 1993). Les critères utilisés peuvent être phénotypiques, biochimiques (isoenzyme) ou moléculaire. Cette étude de polymorphisme permettra une meilleur identification, caractérisation et inventaire des différents cultivars ce qui est indispensables, d'une part, pour la diminution des problèmes de confusion d'appellation (Idrissi et Ouazzani, 2003) et pour maximiser l'efficacité de la conservation du matériel génétique, sa gestion, et les activités d'amélioration d'autre part (Carriero et al., 2002).

).

3.1. Polymorphisme phénotypique

Les caractéristiques phénotypiques constituent un outil incontournable, à nos jours, elles continuent d'être utilisées (Stuessy, 1990). D'après Rallo et Cidraes (1995), les méthodes d'identification basées sur les critères phénotypiques sont importantes, sous réserve que le nombre de caractères considéré soit suffisamment élevé et que les limites de variation soient bien définies. Leur valeur est même très appréciable pour la ségrégation de variétés de zones distinctes, en particulier lorsqu'on utilise les caractères qualitatifs peu fluctuants. Les marqueurs morphologiques ont été employés depuis plusieurs années pour l'identification et la caractérisation des génotypes de différentes espèces. D'ailleurs, elles continuent à être la première étape, incontournable, pour la description, la caractérisation et la classification de n'importe quel matériel génétique, de plus, elles sont considérées comme un outil utile pour examiner les accessions de n'importe quelle collection (Cantini et al., 1999).

Ils 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 et d'autre part des données qualitatives. Elles concernent l'arbre dans son ensemble, la feuille, la fleur et surtout le fruit et l'endocarpe (Dosba et Saunier, 1998).

C'est en 1918, que les premiers travaux de caractérisation morphologique ont été décrits pour 103 variétés d'olivier en France. Plusieurs travaux ont suivi, dont ceux de Barranco et Rallo Romero, 1984, en utilisant des descripteurs propres à des variétés espagnoles. C'est uniquement en 1997, que le projet « ressources génétiques de l'olivier » s'est fixé comme objectif principal l'uniformisation des descripteurs des variétés d'olivier dans tous les pays oléicoles (COI, 2000).

Vingt-trois caractères morphologiques sont actuellement utilisés pour la caractérisation primaire des variétés d'olivier (COI, 1997). Après une étude portée sur le pouvoir discriminant des principaux caractères morphologiques actuellement utilisés, Idrissi et Ouzzani (2003) affirment que les 23 descripteurs morphologiques étudiés et principalement ceux ayant fait preuve d'un grand pouvoir discriminant se sont révélés suffisants pour discriminer un nombre important de variétés d'olivier.

Des travaux basés sur les caractères morphologiques ont permis l'identification et la classification d'un grand nombre de cultivars d'Andalousie en Espagne (Lansari et al., 1996), de 29 variétés réponsus en Turquie (Haluk et Nurhayat, 1994). En plus de ces descripteurs

morphologiques ou primaires, nous avons une deuxième catégorie de descripteurs qui est prise en compte, il s'agit des descripteurs secondaires tels les descripteurs phénologiques, comme l'époque de floraison ou de maturité, et les descripteurs agronomiques (Dosba et Saunier, 1998).

Ces caractères agronomiques, à immense intérêt, sont généralement quantitatifs, à contrôle mono ou polygénique et à explications complexe. Ils sont souvent soumis aux besoins et choix commerciaux et peuvent être regroupés en plusieurs catégories : caractère lié à la production (précocité, rendement), vigueur de plante, qualité de fruit, résistance aux stress biotiques (maladies et parasites) et abiotiques (stress hydrique, thermique, salinité).

3.2 Polymorphisme biochimique

Les marqueurs enzymatiques sont considérés généralement comme neutres vis-à-vis des conditions environnementales (Ouazzani et *al.* 1993). Les études qui ont concerné le polymorphisme enzymatique du pollen (Loukas et Krimbas, 1983 ; Trujillo et Rallo, 1995 in Ouazzani et *al.* 1995) et le polymorphisme alloenzymatique des feuilles (Ouazzani et *al.* 1993) ont révélé une variabilité génétique très importante.

En effet, l'électrophorèse d'isozymes, en permettant d'étudier les produits primaires de gènes de structure, est une technique particulièrement adaptée à l'identification variétale chez plusieurs espèces fruitières (Torres, 1989 ; Weeden, 1989 in Ouazzani et *al.* 1995).

Toutefois, ces marqueurs ont montré leurs limites pour l'identification des variétés étroitement apparentées (Ouazzani et *al.* 1995). Les marqueurs biochimiques sont des protéines produites par l'expression de gènes et qui peuvent être séparées par électrophorèse afin d'en identifier les allèles (Ghalmi, 2011). Les isoenzymes sont les marqueurs biochimiques les plus largement utilisés en amélioration végétale (Bednorz et *al.*, 2004 et Voylovok et Priyatki, 2004 in Dominguez-Garcia, 2012). Elles ont été très utilisées pour l'identification variétale chez l'olivier. La méthodologie nécessaire pour le développement et l'utilisation de ce type de marqueurs est relativement simple, rapide et économique (Trujillo et *al.*, 1995).

Cependant, ces marqueurs présentent certains inconvénients. Ils ont un faible niveau de polymorphisme et dépendent du type de l'organe analysé et du stade de développement de la plante (de Vienne, 1998). Ils peuvent aussi avoir une expression différentielle suivant des facteurs environnementaux et le type de tissu (Dominguez-Garcia, 2012).

3.3. Polymorphisme moléculaire

L'importance des variations génétiques a depuis longtemps été reconnu comme un moyen qui facilite la sélection des plantes et / ou des stratégies de conservation (Sehgal et Raina 2008). Les marqueurs moléculaire sont des outils utiles et efficaces pour l'étude de la variation génétique, ils permettent la liaison entre phénotype et variation génotypique (Varshney et *al.*, 2005a). Ce sont des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme. Ils permettent à la fois un diagnostic extrêmement fin de la variabilité et la mise en place de stratégies très rapides de création et sélection variétale (Adam et Dron, 1993). Ils renseignent sur le génotype d'un individu, ils ne sont pas modifiés par l'environnement et peuvent être utilisés tout au long d'une expérimentation car ils sont observables à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe (l'information génétique de la plante est contenue en totalité dans toutes les cellules). Au cours des dernières années, les progrès réalisés dans le développement des marqueurs moléculaires à base d'ADN ont contribué à une meilleure compréhension des ressources génétiques. Ces marqueurs moléculaires sont classer comme suit : (i) sur base de l'hybridation : restriction fragment length polymorphisms(RFLP), (ii) marqueurs à base de PCR : random amplification marker (RAPD), (AFLP), entre simples répétitions de séquences (ISSR) et microsatellites ou répétitions de séquences simples (SPR), et (iii) la séquence à savoir des marqueurs à base de polymorphismes mono nucléotidiques (SNP) (Varshney et *al.*, 2007 ; Sehgal et Raina2008). Les principales caractéristiques des différents marqueurs d'ADN sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Principales caractéristiques des différents types de marqueurs moléculaires
(Rajwant et al., 2010)

Fonctionnalités	Marqueurs moléculaires			
	EST-SSR _s RAPD _s /AFLP _s /ISSR _s	SSR _s	RFLP _s	
Besoin de données de séquence	Indispensable	Indispensable	Pas besoins	Pas besoins
Niveau de polymorphisme	Faible	Elevé	Faible	Faible à modérer
Dominance	Co-dominant	Co-dominant	Co-dominant	Dominant
Cessibilité interspécifique	Elevé	Faible à modérer	Moyen à élevé	Faible à modérer
Utilité dans la sélection assistée par marqueurs	Elevé	Elevé	Moyen	Faible à modérer
Coût et travail à investir	Faible	Elevé	Elevé	Faible à modérer

Chez l'olivier, les marqueurs d'ADN étaient largement utilisés à la fois dans des domaines de recherches théoriques et pratiques, comme la révision de l'espèce *Olea europaea*, la caractérisation de l'immense gémoplasme de l'olivier, les programmes de sélection et la traçabilité des cultivars de l'huile d'olive. Une description des principaux marqueurs génétiques utilisées et leur intérêt se trouve dans le tableau 2.

Tableau 2: Applications des marqueurs moléculaires basées sur l'ADN dans les études de l'olivier (Bracci et al. 2011)

Marqueurs	Développeurs	Applications
RAPD	Williams et al. 1990	Empreintes génétiques des cultivars. Correspondance génétique du matériel végétal des pépinières. Détection de la variabilité intra-cultivar. Construction de carte de liaison. Traçabilité des cultivars dans l'huile d'olive. Etudes phylogénétiques.
AFLP	Vos et al. 1995	Empreintes génétiques des cultivars. Détection de la variabilité intra-cultivar. Etudes phylogénétiques. Traçabilité des cultivars dans l'huile d'olive. Construction de carte de liaison.
SCAR	Paran et Michelmore, 1993	Empreintes génétiques des cultivars. Traçabilité des cultivars dans l'huile d'olive
SSR	Morgante et Olivieri, 1993	Empreintes génétiques des cultivars. Construction de carte de liaison. Analyses de paternité. Traçabilité des cultivars dans l'huile d'olive. Etudes phylogénétiques.
ISSR	Zietkiewicz et al. 1994	Etudes phylogénétiques. Détection de la variabilité intra-cultivar. Traçabilité des cultivars dans l'huile d'olive.
SNP	Wang et al. 1998	Empreintes génétiques des cultivars.
Polymorphisme de l'ADN ribosomale : RFLP	Botstein et al. (1980)	Etudes phylogénétiques.
Polymorphisme de l'ADN chloroplastique et mitochondrial :RFLP	Botstein et al. (1980)	Etudes phylogénétiques. Analyses de la stérilité mâle

Comme mentionner si dessus il existe plusieurs types de marqueurs moléculaires, mais ce chapitre sera consacré aux microsatellites SSR_s.

3.3.1 Les Microsatellites « SSRs »

✓ Généralité et caractéristiques

Les microsatellites ont acquis une importance considérables dans la génétique et l'amélioration des plantes en raison des nombreux attributs à savoir l'hyper-variabilité, la nature multi-allélique, la codominance, la reproductibilité, une relative abondance, une large couverture du génome (y compris les génomes des organites), un emplacement spécifique sur les chromosomes et une aptitude à l'automatisation et le génotypage à haut débit (Parida et al., 2009). Ces marqueurs ont plusieurs nomination : microsatellites (Litt et Luty, 1989), courtes répétitions en tandem (STR_s, Edwards et al. 1991), répétitions de séquences simples (SSR_s, Jacob et al. 1991) ou simple séquence de longueur polymorphe (SSLP, Tautz 1989). Ce sont des répétition en tandem de motifs d'une taille de 1-6 pb avec une occurrence fréquente dans tous les génomes procaryotes et eucaryotes (Zane et al., 2002).

L'existence de microsatellites a été démontrée par Hamada et al. (1982) dans divers eucaryotes allant des levures aux vertébrés. Des études ultérieures de Delseny et al. (1983) et Tautz et Renz (1984) confirme l'abondance des microsatellites dans les plantes et dans de nombreux autres eucaryotes. En manière générale le génome des plantes est riche en motif répétée « AT », alors que chez les animaux le motif répétée le plus commun est « AC ». Ce caractère semble être une caractéristique distinctifs entre le génomes des plantes et celui des animaux (Powell et al., 1996). Ils sont présents à la fois dans les régions codantes et non codantes à travers tous le génome nucléaire. On peut également les trouvés dans l'ADN chloroplastique (Provan et al., 2001 ; Chung et al., 2006) et mitochondrial (Soranzo et al., 1999 ; Rajendrakumar et al., 2007). Les microsatellites se caractérisent par un faible degré de répétition par locus (5-100), une dispersion aléatoire d'environ (10^4 - 10^5) à travers le génome (Tautz 1993) et un polymorphisme de longueur très élevé (Zane et al., 2002).

✓ Classification

On peut les classés de diverse manière, en fonction de leur taille, du type du motif répété et leur localisation. En fonction du nombre de nucléotide par unité de répétition, les SSR_s sont classer comme mono-, di- ; tri- ; tetra- ; penta- ou hexanucléotide (tableau 04). En fonction de l'arrangement de nucléotides dans les motifs répétés Weber et al, 1990 a utilisé les termes) a utilisé les termes parfait, imparfait et microsatellites composés. Tandis que Wang et al. (2009a) les classe comme parfait simple, simple imparfait, parfait composé. Les répétitions parfaites sont la répétition d'un seul motif, alors que dans l'imparfait les répétitions parfaites sont interrompus par des motifs non-répétées à certains endroits.

Dans les microsatellites composés, nous avons deux motifs de répétition de base qui sont présents ensemble dans diverses configurations. Jarne et Lagoda (1996) ont inventé les termes pur et interrompu pour les répétitions parfaites ou répétitions imparfaites, respectivement, comme indiqué dans le tableau 4.

Tableau 4: Classification des microsatellites (Kalia et al, 2010)

(A) En fonction du nucléotide répété	
Mononucléotide (A) _n	
Dinucléotide (CA) _n	
Trinucléotide (CGT) _n	
Tetranucléotide (CAGA) _n	
Pentanucléotide (AAATT) _n	
Hexanucléotide (CTTTAA) _n	
(B) En fonction de arrangement des nucléotides dans le motif répété (Weber 1990 ; Jarne and Lagoda 1996 ; Wang et al 2009a)	
Pure, parfait ou simple parfait (CA) _n	
Simple imparfait (AAC) _n ACT(AAc) _n	
Composé ou simple composé (CA) _n (GA) _n	
Imparfait ou composé imparfait (CCA) _n TT (CGA) _n	
(C) En fonction de la localisation du SSR dans le génome	
Nucléaire (nuSSRs)	
Chloroplastique (cpSSRs)	
Mitochondriale (mtSSRs)	

✓ Distribution et applications

La plupart des SSR génomiques sont nucléaires, cependant, ils sont également rencontrés dans l'ADN mitochondriale ou chloroplastique. Sur la base de leur emplacement dans le génome, les microsatellites peuvent être classés comme nucléaire (nuSSR), mitochondrial (mtSSR) ou chloroplastique SPR (cpSSR). Weising et Gardner (1999) ont découvert pour la 1^{ère} fois des (cpSSR) chez *Nicotiana*, alors que (mtSSR) ont été découverts par Soranzo et al (1999) chez les espèces *Pinus*. De nombreuses sources de données ont démontré que les microsatellites constituent une fraction importante de l'ADN non codant. Toutefois, de récents travaux ont affirmé la présence de SSRs dans des régions transcritibles du génome (Figure 5), comprenant des gènes codant pour des protéines et des (ESTs) « expressed sequence tags » (Mogante et al. 2002 ; Li et al. 2004).

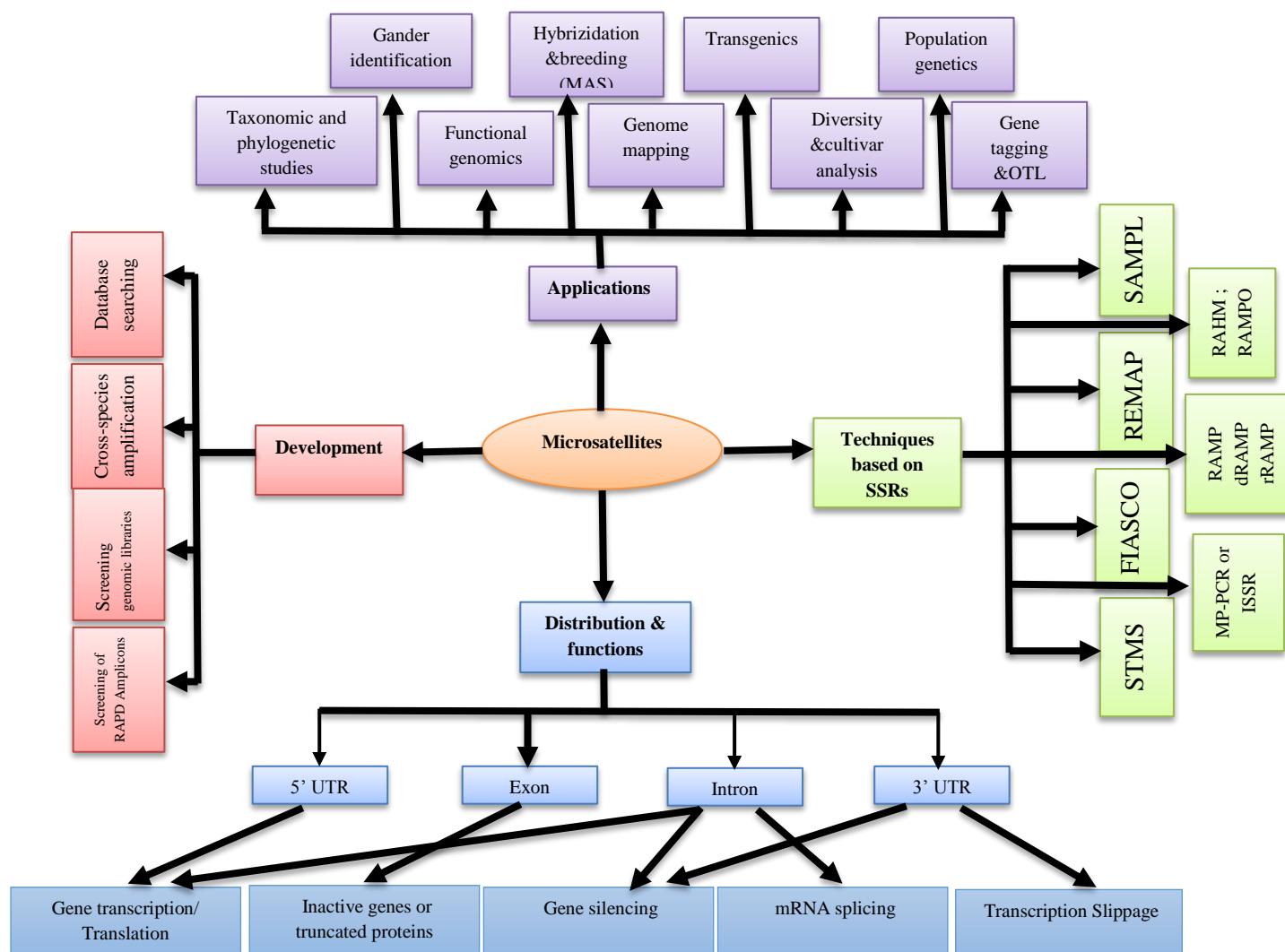


Figure 5 : Schéma résumant le développement, la distribution, les fonctions et applications des microsatellites

Par exemple, dans les céréales (maïs, blé, orge, le sorgho et le riz), seulement 1,5-7,5% SSR sont localiser dans des ESTs (Kantety et al. 2002 ; Thiel et al. 2003). Les répétitions de dinucléotides sont les plus courantes dans de nombreux espèces, ils sont beaucoup moins fréquents dans la région codante que dans les régions non codantes (Li et al. 2002; Wang et al.1994).Chez de nombreuses espèces, les exons sont riche en SSR tri-nucléotidique que d'autres répétitions (Morgante et al 2002;. Li et al. 2004). Cette dominance en répétitions de triplets sur d'autres répétitions dans les régions codantes peuvent être expliqués sur la base de la suppression de la SSR non-trimères dans les régions codantes éventuellement due au changement de cadre de lecture avec une augmentation ou diminution en nombre d'unités de répétition. Chez les plantes, la tri nucléotide la plus fréquente est AAG (Li et al., 2004), bien

que, dans les céréales, la plus commun est GCC (Cordeiro et al.2001; Varshney et al. 2002; Thiel et al. 2003).

L'abondance de la répétition GCC est une caractéristique spécifique des monocotylédones qui peut être expliquée par le contenu accru en GC (Morgante et al., 2002), ou la fréquence élevée de certains acides aminés. En général la fréquence des microsatellites est inversement proportionnelle à la taille du génome dans les plantes, mais le pourcentage de l'ADN répétitif semble rester constant dans les régions codantes (Morgante et al., 2002) avec chez les dicotylédones des mono-nucléotide répétées et des répétitions de tri-nucléotides chez les monocotylédones (Lawson et Zhang 2006). La fonction des gènes contenant des SSR ainsi que leur rôle pour les végétaux sont moins étudiés et reste mal compris (Varshney et al., 2005a). Fujimori et al. (2003) ont suggéré que les microsatellites situés à haute fréquence dans les régions 5'UTR des gènes de plantes flanquant peuvent potentiellement agir comme des facteurs dans la régulation de l'expression génique. Dans le cas du riz, la teneur en amylose a été corrélée avec la variation du nombre de GA ou CT répète dans le 5'UTR du cireux gène (Bao et al., 2002). Dans un autre exemple, ils ont trouvé que (GCC) n dans le 5'UTR des gènes de la protéine ribosomique du maïs est impliqué dans la régulation de la fertilisation (Dresselhaus et al., 1999).

Ces marqueurs sont adaptés aux études de populations étroitement apparentées et permettent même les comparaisons entre individus ou cultivars (Takezaki et Nei, 1996 ; Hokanson *et al.*, 1998; Westman et Kresovich, 1997). Grâce à leur grand contenu informatif, 10 à 20 loci suffisent pour distinguer des génotypes très proches. Ils ont été utilisés aussi bien dans l'étude de la diversité génétique que dans l'élaboration des cartes génétiques du blé, de l'orge et du soja (Röder *et al.*, 1995; Peakall *et al.*, 1998; Ramsay *et al.*, 2000). En plus, ce sont de marqueurs multi-alléliques d'où leur usage dans les études phylogénétiques et de l'évolution des espèces. Ainsi, Mhameed *et al.*, (1997) utilisant ces marqueurs ont pu établir un arbre phylogénétique composé de *Persea americana* et ses espèces sauvages.

III. L'huile d'olive : étude physico-chimique et organoleptique

L'huile d'olive est un produit polyvalent, elle est l'une des principales composantes du régime dit « méditerranéen », préconisée par de nombreux diététiciens, elle acquit par ailleurs une place essentielle dans la recherche de ses propriétés médicinales et cosmétiques. Elle est caractérisée par sa composition particulière en acides gras, en composés mineurs appartenant à la fraction insaponifiable des huiles végétales. Ses caractéristiques physicochimiques et organoleptiques sont définies par la norme commerciale du Conseil Oléicole International (COI, 2009) et au niveau européen, par l'annexe I du règlement (CEE) n° 2568/91 (CEE, 1991). La variété influence principalement les caractéristiques organoleptiques de l'huile d'olive (Psyllakiset *al.*, 1980). La production d'olive et la qualité d'huile extraite dépendent très fortement du cultivar (Ouaouich et Chimi, 2007). Chaque variété donnera une huile d'olive avec un profil sensoriel qui lui est propre (Demnati, 2008).

1. Classification et composition de l'huile d'olive

Huiles d'olive vierges sont des huiles obtenues à partir du fruit de l'olivier, uniquement par des procédés mécaniques ou d'autres procédés physiques dans des conditions, thermiques notamment, qui n'entraînent pas l'altération de l'huile, et n'ayant subi aucun traitement autre que le lavage, la décantation, la centrifugation et la filtration. Elles font l'objet du classement et des dénominations ci-après : vierge extra, vierge fine, vierge courante, vierge lampante. Ces diverses catégories qui correspondent à une certaine qualité sont définies en fonction de l'acidité de l'huile, de son indice de peroxyde ainsi que d'autres critères chimiques et qualités organoleptiques (Perrin, 1992). Les différentes catégories d'huile d'olive ainsi que les limites des critères de qualité établies par le COI (2003) sont représentées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Les différentes catégories d'huile d'olive et leurs critères de qualité (COI, 2003)

Catégorie	Acidité (%)	Indice de peroxyde (mEq O ₂ /Kg)	Extinction spécifique dans l'UV			Caractéristiques Organoleptiques	
			270nm	ΔK	232nm	Médiane du défaut	Médiane du fruité
1-Huile d'olive vierge extra	$\leq 0,8$	≤ 20	$\leq 0,22$	$\leq 0,01$	$\leq 2,5$	Me = 0	Me > 0
2-Huile d'olive vierge fine	$\leq 2,0$	≤ 20	$\leq 0,25$	$\leq 0,01$	$\leq 2,6$	$0 < Me \leq 2,5$	Me > 0
3-Huile d'olive vierge courante	$\leq 3,3$	≤ 20	$\leq 0,30$	$\leq 0,01$	—	$2,5 < Me \leq 6$	—
4-Huile olive vierge lampante	$> 3,3$	Non limité	—	—	—	Me > 6	—

2. Caractéristiques de l'huile d'olive

2.1 Caractéristiques physico-chimiques de l'huile monovariétale

Acidité

C'est un indicateur permettant d'évaluer l'altération de la matière grasse. Il est exprimé en pourcentage d'acide oléique. Ce critère conduit à la classification des huiles vierges comme mentionner dans le tableau 5.

Indice de peroxyde

L'altération chimique des corps gras provoquée par l'oxygène de l'air débute par la formation d'un peroxyde. La norme internationale pour les huiles d'olives, fixe le minimum de cet indice à 20meq d'oxygène actif par Kg d'huile.

Spectre en lumière ultra-violet

Il est utilisé pour détecter les composées oxydées dans une huile d'olive vierge. Cette huile accuse un pic d'absorption à 230-208nm et est transparente au-delà de 210nm. Les composés provenant de son oxydation présentent des absorptions de longueurs d'ondes suivantes :

- 232nm pour les hydroperoxydes
- 270nm pour les composés carbonylés
- 260, 268, 280, nm pour les triènes conjugués

Ces trois paramètres permettent d'évaluer le degré de dégradation de l'huile d'olive.

3. Composition chimiques

Comme tout huiles végétales, l'huile d'olive est composé d'une fraction saponifiable (triglycérides, phospholipides,...) constituée d'acides gras et de leurs dérivés, et d'une fraction insaponifiable (composantes mineurs) qui comprend les stérols, les alcools aliphatiques, les pigments, les hydrocarbures, les composés aromatiques, les tocophérols et les composés phénoliques (Berra, 1998). La composition chimique de l'huile d'olive dépend largement de la variété du fruit, des conditions agronomiques, du degré de maturité, des procédés d'extraction et des conditions de stockage (Dugoet *al.*, 2004). Le tableau 6 indique ces différents constituants.

3.1 Fraction saponifiable

La fraction saponifiable représente environ 99 % de la composition de l'huile d'olive. Elle se compose essentiellement de :

a) Les glycérides

Les triglycérides sont les majoritaires de l'huile d'olive (95,4 %), les diglycérides ne représentent qu'environ 1-2,8 % (Zarrouk *et al.*, 1996; Boskou *et al.*, 2006a).

b) Les acides gras

La composition en acide gras de l'huile d'olive est dominée par l'acide oléique (C18 :1), l'acide linoléique (C18 :2), l'acide palmitique (C16 :0) et l'acide stéarique (C 18 :0) (Ryan *et al.*, 1998). L'acide oléique, présent en grande quantité, distingue l'huile d'olive des autres huiles alimentaires (Visioli et Galli, 1998 ; Ait Yacine *et al.*, 2002).

3.2 Fraction insaponifiable

Dénommés constituants mineurs de l'huile d'olive, ils représentent environ 2% de l'huile d'olive où ils sont introduits plus de 230 composés différents (Visioli et Galli, 1998; Ramírez-Tortosa *et al.*, 2006). Ce sont des composés phénoliques, des stérols, des composés aromatiques, des pigments (chlorophylle et caroténoïdes) et des tocophérols (vitamine E) qui ont un rôle important dans la stabilisation de l'auto-oxydation, et constituent une source alimentaire importante.

Tableau 6 : Les fractions saponifiable et insaponifiable de l'huile d'olive et grignons d'olive (ONUDI : organisations des nations unies pour le développement industriel, 2007)

Composants	Teneurs
1/ Acide gras	
✓ Acide myristique	≤0,05%
✓ Acide palmitique	7.5-20%
✓ Acide palmitoléique	0.3-3.5%
✓ Acide heptadécanoïque	≤0,3%
✓ Acide héptadécénoïque	≤0,3%
✓ Acide stéarique	0.5-5.0%
✓ Acide oléique	55.0-83.0%
✓ Acide linoléique	3.5-21.0%
✓ Acide linolénique	≤1,0%
✓ Acide arachidique	≤0,6%
✓ Acide gadoléique	≤0,4%
✓ Acide béhénique	≤0,2%
✓ Acide lignocérique	≤0,2%
2/ Acide gras trans	
✓ C18 :1T	≤0,05%
✓ C18 :2T+C18 :3T	≤0,05%
3/ Stérols et dialcols triterpéniques	

✓ Desméthylstérols	≤0,05%
-Cholestérol	≤0,1%
-Brassicastérol	≤4,0%
-Campestérol	/
-Stigmastérol	≤0,5%
-Delta-7stigmastérol	≥93.0%
-Bétasistérol+delat-5avénostérol+delat-5-23-stigmastadiénol+clérostérol+sistostanol+delta delat-5-24- stigmastadiénol.	≥1000mg/kg
✓ Stérols totaux	≤4,5%
✓ Erythrol et uvaol (%des stérols totaux)	
4/ Cires : C40+C42+C44+C46	≤ 250mg/kg
5/ Stigmastadiènes	≤ 0,5mg/kg
6/Acides gras en position2 dans les triglycérides : Somme des acides palmitique et stéarique (% des acides gras en position2)	≤ 1,5%
7/ Insaponifiable	≤ 15g/kg

4. Caractéristiques organoleptiques

L'huile d'olive est un liquide limpide, transparent ; jaune ou jaune vert, d'odeur caractéristique, pratiquement insoluble dans l'alcool, miscible à l'éther diéthylique et à l'éther de pétrole. Ces attributs sensoriels d'une huile ont été classés en deux catégories : les attributs positifs et les défauts.

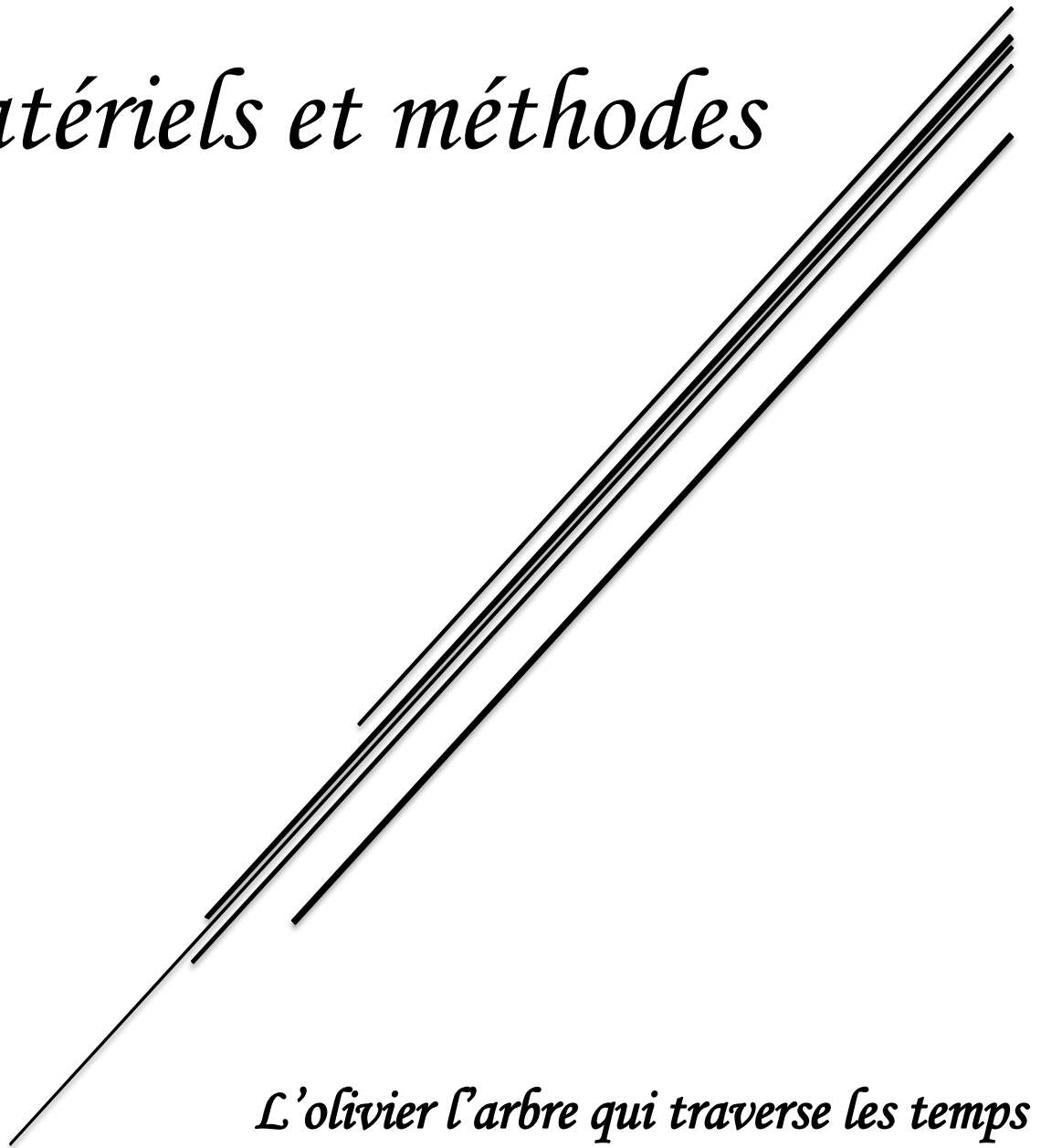
Il existe 3 grands attributs positifs (COI, 2007) :

- ❖ Amer : il est défini comme le goût élémentaire caractéristique de l'huile obtenue d'olives vertes ou au stade de la véraison, perçu par les papilles caliciformes formant le V lingual.
- ❖ Fruité : ensemble des sensations olfactives caractéristiques de l'huile, dépendant de la variété des olives, provenant de fruits sains et frais, perçues par voie directe ou rétro-nasale. Le fruité vert correspond aux caractéristiques rappelant les fruits verts à l'inverse du fruité mûr qui témoigne d'une récolte des olives plus tardive.
- ❖ Piquant : sensation tactile de picotement, caractéristique des huiles produites au début de la campagne, principalement à partir d'olives encore vertes, pouvant être perçue dans toute la cavité buccale, en particulier dans la gorge.

D'autres attributs négatifs moins courants ont également été décrits par le COI. Parmi ceux-ci le cuit ou brûlé (dû à un réchauffement excessif et prolongé de la pâte lors du malaxage), le « vers » (olives ayant subi une attaque de la mouche de l'olivier, *Bactrocera Oleae*) ou encore le bois humide (olive ayant subi une congélation sur l'arbre avant récolte).

Chapitre II :

Matériels et méthodes



L'olivier l'arbre qui traverse les temps

1. Etude du polymorphisme phénotypique chez l'olivier

1.1 Echantillonnage

Pour la caractérisation morphologique nous avons procédé à la cratérisation phénotypique de 7 cultivars d'olivier durant les années 2011,2012 et 2013. Ce travail a été réalisé au cours de la période de dormance, sur le site de l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (I.T.A.F.V) situé à Takerietz. Le choix des cultivars étudié a été basé sur le nombre de pieds présents, l'utilisation des fruits, et l'importance de la surface de culture des cultivars. En effet, la répartition géographique des variétés étudiées est représentée dans le tableau 7, en se référant au catalogue des variétés algériennes de l'olivier de l'I.T.A.F.V (Mendil et Sebai, 2006).

Tableau 7 : Nom du Cultivar, synonymes, origine, diffusion et utilisation (Mendil et Sebai, 2006)

Nom	Nbr de pieds	Synonymes	Origine	Diffusion sur le territoire national	Utilisation
Aghchren de titest	03	Pas de synonyme connus	Hammam Guergour (Sétif)	Restreinte	Double aptitude
Aguenau	04	Agnaw	Bousselah (Sétif)	Restreinte	Double aptitude
Blanquette de guelma	04	Pas de synonyme connus	Guelma	Assez répandue dans le Nord-Est Constantinois (Skikda et Guelma)	Huile
Chemlal	04	Achamlal, Achamli, Achemlal	Kabylie	Occupe 40% du verger oléicole Algérien	Huile
Limli	04	Imeli, limeli	Sidi Aiche (Bejaia)	Occupe 8% du verger oléicole Algérien	Huile
Rougette de Mitidja	04	Pas de synonyme connus	Plaine de Mitidja	Restreinte	Huile
Sigoise	04	Olive de Tlemcen, Olive du Tell	Plaine de sig (Mascara)	Occupe 25% du verger oléicole Algérien	Double aptitude

1.2 Méthodologie

La méthodologie de travail suivie pour la caractérisation phénotypique a été prise telle qu'elle a été proposée dans le catalogue des variétés Algériennes (Mendilet Sebai 2006) et le catalogue mondial des variétés d'olivier (Cimato. 2000). La caractérisation des variétés étudiées a concerné la description morphologique des principaux organes de l'arbre (feuille, fruit, et endocarpe). Vingt-trois caractères morphologiques, actuellement utilisés pour la caractérisation primaire des variétés d'olivier (Barranco et Rallo 1984), ont été retenus pour cette étude. Chaque caractère présente 2 à 4 catégories. Les observations ont porté sur (3-4) individus par cultivar.

a/ Descripteurs de l'arbre

La vigueur

Fait référence aussi bien aux dimensions de l'arbre qu'à la capacité intrinsèque des branches principales et des rameaux à croître en longueur et en épaisseur. Trois catégories ont été distinguées : faible, moyenne et élevée.

Le port

Décrit la distribution naturelle des charpentiers et des rameaux, indépendamment de la forme adoptée et de la vigueur. On distingue trois classes de port : retombant, étalé et dressé.

La densité du feuillage

Elle fait référence à l'abondance de végétation de la frondaison qui peut être mesurée par la possibilité de pénétration de la lumière. Elle est classée en trois catégories : lâche, moyenne et compacte.



b/Descripteurs de la feuille

Au total 4 descripteurs ont été utilisés, dont trois sont quantitatifs et un est qualitatif. Ils ont été observés sur un échantillon de quarante feuilles adultes, récoltées, sur la partie médiane de 10 pousses de l'année, et ont été choisies parmi les plus représentatives et situées sur la partie de l'arbre orientée vers le sud, à hauteur d'homme.

Longueur

- Réduite (<5cm)
- Moyenne (5-7cm)
- Elevée (>7cm)

Largeur

- Réduite (<1cm)
- Moyenne (1-1,5cm)
- Elevée (>1,5cm)

Forme

- Elliptique ($L/l < 4$)
- Elliptique-lancéolée (L/l 4-6)
- Lancéolée ($L/l > 6$)

La courbure longitudinale du limbe

Permet de classer la feuille en 4 catégories :

- Epinastique
- Plane
- Hyponastique
- Hélicoidale



Figure N° 6 : Descripteur de la feuille (COI, 1997)

c/ Descripteurs du fruit

Les descripteurs ont été utilisés sur un échantillon d'une quarantaine de fruits récoltés sur la partie médiane de rameaux fructifères, choisis parmi les plus représentatifs et situés sur la partie de l'arbre orientée vers le sud. De plus, les fruits les plus petits et les plus gros ainsi que ceux qui présentant des malformations ont été éliminés.

La description du fruit a été réalisée à la fin de la véraison. Pour certains marqueurs du fruit, deux positions ont été considérées :

- ✓ Position "A" : où le fruit présente généralement son asymétrie maximale en le prenant par ces deux bouts entre l'index et le pouce ;
- ✓ Position "B" : résulte de la rotation du fruit de 90° de manière à tourner la partie la plus développée vers l'observateur.

Le poids :

- Réduite (<2g) ;
- Moyen (2-4g) ;
- Elevé (4-6g) ;
- Très élevé (>6g).

La forme en position "A" Elle est déterminée en fonction du rapport longueur (L) et largeur (l) en :

- Sphérique ($L/l < 1,25$) ;
- Ovoïde ($L/l < 1,25-1,45$) ;
- Allongée ($L/l > 1,45$).

La symétrie en position "A" :

Elle est déterminée par la correspondance entre ses deux moitiés longitudinales :

- Symétrique ;
- Légèrement asymétrique ;
- Asymétrique.

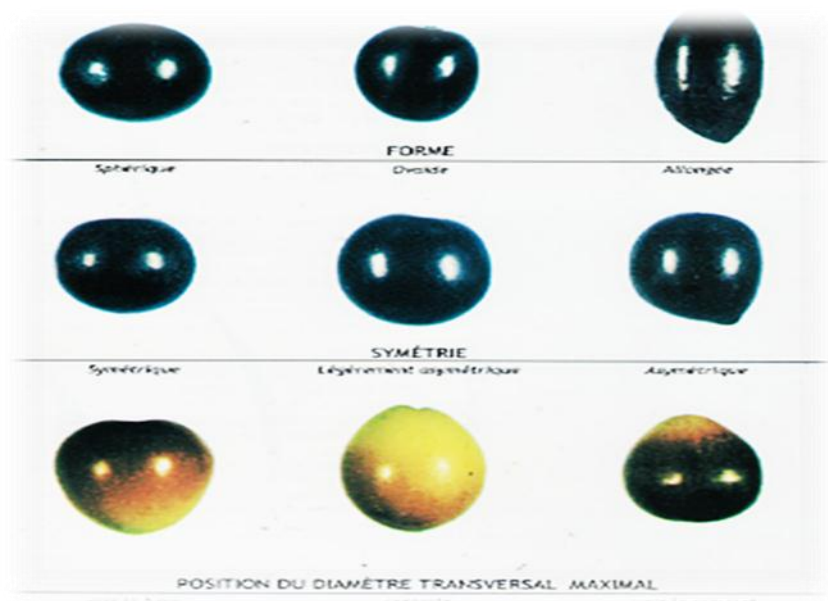


Figure N°7 : Descripteur du fruit (COI, 1997)

La position du diamètre transversale maximal par rapport au pédoncule (position "B ":

- Vers la base ;
- Centrale ;
- Vers le sommet

Le sommet en position "A: "

- Pointu ;
- Arrondi.

La base en position "A: "

- Tronquée ;
- Arrondie.

Le mamelon : C'est le point stylaire du fruit qui peut être :

- Absent ;
- Présent.

La présence de lenticelles :

Est déterminés lorsque le fruit est complètement développé mais encore vert. Elles peuvent être :

- Peu nombreuse ;
- Nombreuse.

Les dimensions des lenticelles :

- Petites ;
- Grandes.

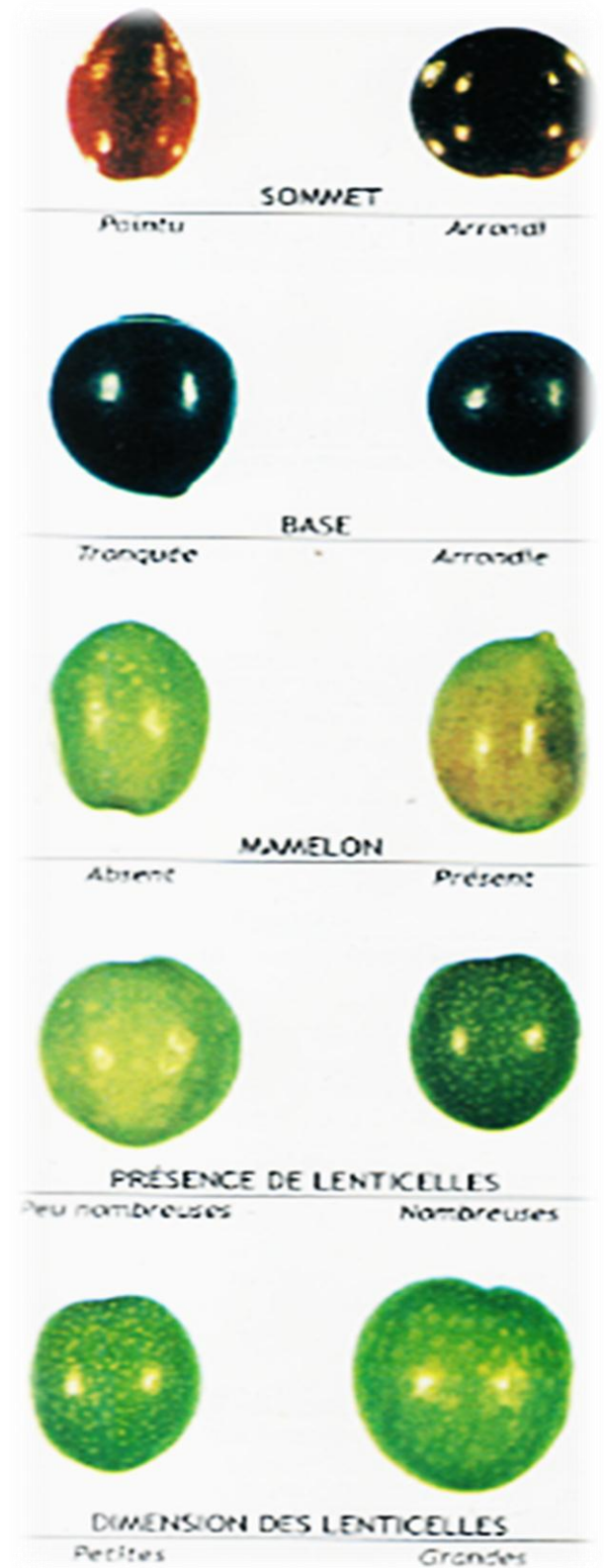


Figure N°8 : Descripteur du fruit (COI, 1997)

d/ Descripteurs de l'endocarpe :

Est défini comme la partie interne, lignifiée, du fruit qui protège la graine ou amandon et sur laquelle on procède aux observations structurales. On désigne habituellement par « noyau » l'ensemble formé par l'endocarpe et la graine. L'évaluation a été faite sur 40 fruits. Comme, pour le fruit, il est fait référence, pour certains marqueurs à deux positions :

*La position « A », qui correspond normalement à la position d'asymétrie maximale, où la suture du carpelle est visible par l'observateur,

*La position « B », celle résultant de la rotation de 90° de la position « A », de manière à tourner la partie la plus développée vers l'observateur. En générale, les descripteurs de l'endocarpe présentent un pouvoir discriminant très élevé pour l'identification des variétés de l'olivier.

Le poids : Dans l'hypothèse où chaque variété a été cultivée dans des conditions agronomiques normales pour sa zone de culture, les catégories suivantes ont été définies :

- Réduite ($< 0,3g$) ;
- Moyenne ($0,3-0,45g$) ;
- Elevée ($> 0,45g$).

La forme (en position A) : Est déterminée en fonction du rapport entre la longueur (L) et la largeur (l) :

- Sphérique ($L/l < 1,4$) ;
- Ovoïde ($L/l < 1,8$) ;
- Elliptique ($1,8 < L/l < 2,2$) ;
- Allongée ($L/l > 2,2$).

La symétrie en position "A" : Est déterminé par la correspondance entre ses deux moitiés longitudinales :

- Symétrique ;
- Légèrement asymétrique ;
- Asymétrique.

La position du diamètre transversal maximal du noyau par rapport au point d'insertion (en position B) : selon sa situation elle peut être :

- Vers la base (situé vers l'insertion) ;
- Centrale ;
- Vers le sommet.

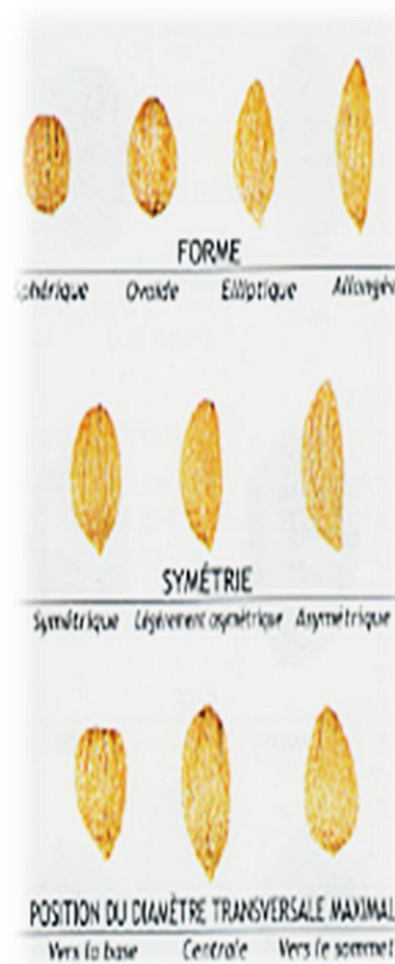


Figure N° 9 : Descripteur de l'endocarpe (COI, 1997)

Le sommet en position "A" :

Pointu ;
Arrondi.

La base en position "A" :

Tronquée ;
Pointue ;
Arrondie.

La surface : Est déterminée en fonction de la profondeur et de l'abondance des sillons fibrovasculaires :

Lisse ;
Rugueuse ;
Raboteuse.

L'extrémité du sommet :

Sans mucron ;
Avec mucron.

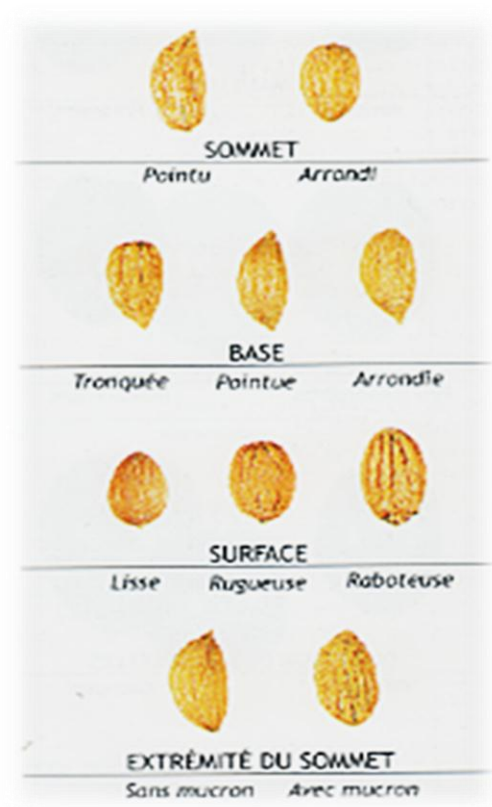


Figure N°10 : Descripteur de l'endocarpe (COI, 1997)

2. Descripteurs de l'huile d'olive

Sept échantillons d'huile d'olive ont été caractérisés durant la campagne 2012/2013. Les caractéristiques, synonyme et rendement en huile des cultivars étudiés sont représentées dans le tableau 8, en se référant au catalogue des variétés algériennes de l'olivier de l'I.T.A.F.V (Mendil et Sebai, 2006).

Tableau 8 : Caractéristiques agronomiques connues des variétés (Mendil et Sebai, 2006)

Cultivar	Synonymes	Rendement en huile (%)
Aghchren de titest	Pas de synonyme connus	14 à 18
Aguentaou	Agnaw	16 à 20
Blanquette de guelma	Pas de synonyme connus	18 à 22
Chemlal	Achamlal, Achamli, Achemlal	18 à 22
Limli	Imeli, limeli	20 à 24
Rougette de Mitidja	Pas de synonyme connus	18 à 20
Sigoise	Olive de Tlemcen, Olive du Tell	18 à 22

2.1 Récolte et extraction de l'huile

La récolte des olives a été réalisée à la main sur différents arbres adultes à hauteur d'homme et aux quatre points cardinaux de l'arbre. Les fruits bien homogénéisés ont été transportés dans des caisses en plastiques aérées et puis lavés.

L'extraction de l'huile des différents échantillons d'olives a été effectuée au niveau du laboratoire de l'I.T.A.F.V de Takerietz au moyen d'un oléodenseur (Levi-Dilon-Lerogsame), selon les étapes suivantes :

- ✓ Le broyage par un broyeur à marteau ;
- ✓ Le malaxage a été effectué en deux temps : 10 minutes sans eau et 10 minutes après ajout de 50 ml d'eau à 30°C pour 920g de pâtes d'olives.
- ✓ La centrifugation, pendant une minute, de la pâte malaxée à une vitesse de 4845 tours /min ; pour séparer la phase liquide et solide.



Figure N°11 : Oléodenseur utilisé pour l'extraction de l'huile

Après décantation, les huiles ont été recueillies dans des flacons en verre ombré, remplis, étiquetés et conservés à une température de 4°C.

2.2 Détermination des indices de qualité de l'huile d'olive

La qualité de l'huile d'olive se caractérise principalement par 3 facteurs : le taux d'acidité, l'indice de peroxyde et l'absorbance spécifique dans l'Ultraviolet.

2.2.1 Acidité

Elle représente la proportion d'acides gras libres, qui apparaissent lorsque les triglycérides de l'huile d'olive sont dégradés. Le taux d'acidité est un indicateur de la dégradation de l'huile, due soit à un traitement sanitaire avant la récolte, une utilisation d'olives trop mûres, de mauvaises conditions de récolte ou de stockage. Elle est exprimée en % d'acide oléique libre, déterminé selon la méthode ISO 660, qui consiste en un titrage des acides gras libres présents par une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium. En fait, un échantillon d'huile de 5 ml a été solubilisé dans 20 ml d'un mélange (V/V) d'oxyde diéthylique-éthanol à 95%. Le mélange a été titré, en agitant, avec une solution d'hydroxyde de potassium à 0,1N jusqu'à un virage de l'indicateur coloré (la phénolphthaléine), vers le rose, persistant pendant au moins 10 secondes. L'acidité est exprimée en pourcentage de poids d'acide oléique selon la formule suivante :

$$A \% (\text{d'acide oléique}) = (V - V_0) * (N * M / 10 * m)$$

Avec :

V et V₀ : volume en ml de KOH nécessaire pour neutraliser l'échantillon et le blanc, respectivement ;

N : normalité de l'hydroxyde de potassium ;

M : masse molaire g/ml de l'acide oléique qui est égale à 282 g/ml ;

m : masse en g de la prise d'essai.

2.2.2 Indice de peroxyde

Le rancissement d'une huile est dû à une oxydation des acides gras insaturés de l'huile d'olive. Cette oxydation se fait en plusieurs étapes. L'indice de peroxyde est un contrôle de l'état d'avancement de la première étape. Plus cet indice est élevé, plus l'huile est oxydée. Cette oxydation est inéluctable mais des précautions prises lors de la récolte, de la trituration et du stockage permettent de la retarder. L'indice de peroxyde représente la quantité des

substances de l'échantillon exprimées en meq d'O₂ actif /Kg, qui oxydent l'iodure de potassium.

La méthode utilisée pour le calcul est celle d'ISO 3960. Un échantillon de 2 g d'huile est introduit dans une fiole à col rodé, 10 ml de chloroforme sont ajoutés, tout en agitant, afin de dissoudre l'huile ; suite à quoi 15 ml d'acide acétique glaciale et 1 ml d'iodure de potassium saturé sont ajoutés, la fiole est bouchée rapidement, puis agitée vigoureusement pendant 1 minute et laissée à l'obscurité pendant 5 min à température ambiante. Par la suite, 75 ml d'eau distillée sont ajoutés ainsi que quelques gouttes d'empois d'amidon, le tout est titré avec le thiosulfate de sodium (Na₂ S₂ O₃) à 0,01N en agitant vigoureusement. L'indice de peroxyde est donné par la formule ci-après :

$$IP = N (V-V_0) * 1000/m \text{ (meq d'O}_2 \text{ /Kg)}$$

Avec :

N: normalité Na₂S₂O₃;

V, V₀: volume en ml de Na₂S₂O₃ nécessaire pour le titrage de l'échantillon et de l'essai à blanc, respectivement ;

m : masse en gramme de la prise d'essai.

2.2.3 Absorbance spécifique dans l'Ultraviolet

La détermination des absorbances spectrophotométriques spécifiques dans l'UV, aux longueurs d'ondes de 232 et 270 nm, permet d'évaluer l'état d'oxydation des huiles.

L'extinction spécifique est déterminée selon la méthode ISO 3656. Après filtration des échantillons d'huiles à travers le sulfate de sodium anhydre, une solution à 1% d'huile dans le hexane est préparée. L'absorbance est mesurée à deux longueurs d'ondes 232 nm et 270 nm.

Les coefficients d'extinction E₂₃₂ et E₂₇₀ sont exprimés par l'équation suivante :

$$E = A \lambda / C * l$$

Avec

E : extinction spécifique à la longueur d'onde λ ;

A λ : absorbance à λ nm ;

C : concentration de la solution en g/100 ml ;

l : épaisseur de la cuve en centimètre.

2.3 Détermination des biophénols totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques a été réalisée selon la méthode COI/T. 20/Doc.n°29. Il s'agit d'une extraction des composés mineurs polaires de nature biophénolique directement à partir de l'huile d'olive au moyen d'une solution méthanolique, suivie de leur dosages par HPLC " Agilent 1260 Infinity " muni d'un révélateur UV à 280 nm et une colonne chromatographique (4.6mm*250mm) à phase inverse C18, de type Zorbax Eclipse plus 5µm.

La concentration en composés phénoliques des extraits de l'huile d'olive est déterminée par le calcul du rapport entre les facteurs de réponses des étalons externes $RRF_{sir/tir}$ (acide Syringique et Tyrosol) qui permet d'exprimer le résultat final en Tyrosol, en utilisant l'acide Syringique comme étalon interne. Les concentrations en biophénols totaux des extraits méthanoliques d'huile d'olive sont exprimées en mg/Kg de Tyrosol.

2.4 Identification des acides gras dans l'huile d'olive par GC/MS

2.4.1 Préparation des esters méthyliques

Les esters méthyliques sont préparés suivant la méthode ISO 8262-3. Un aliquote de 0,2g d'huile est dissout avec 5ml d' hexane pour chromatographie, à laquelle sont ajoutés 0,2ml de solution méthanolique d'hydroxyde de potassium (2N), le tout est agité énergiquement pendant 30S, puis centrifugés à 3000tours/min pendant 5 minutes. Ensuite, 2 gouttes du surnageant sont prélevées et mélanger avec 1 ml d'hexane.

2.4.2 Dosage

Les esters méthyliques sont analysés par une GC 7890B/MSD 5977A "Agilent technologie" couplée à une source d'extracteur d'ions. La séparation est réalisée sur une colonne capillaire **DB Wax** de type polyrthylene glycol (60m, 0.25mm, 0.25, µm), alimentée en hélium comme un gaz vecteur avec un débit de 0.5ml/min. Le volume d'échantillon injecté est 1µl de solution dans l'hexane. La température initiale de la colonne est de 200C° (durant 20min) avec une rampe de 2C°/min jusqu'à 210C° (durant 10min), puis une rampe de 2C°/min pendant 10min jusqu'à 220C° pendant 5 min. L'injection est réalisée en mode splitless à une température de 250C°, avec des températures de la ligne de transfert et du bloc de 280C° et 230C°, sont respectivement. L'acquisition en spectrométrie de masse est réalisée en mode « impact électronique » à 70eV avec un balayage du domaine de 50 à 600 UMA (unités de masse atomique) à 2.83 scan/s. L'identification est

effectuée en se basant sur l'interprétation des spectres de masse en les comparants avec les spectres de la librairie NIST et WILY.

3. Etude du polymorphisme génotypique

3.1 Matériel végétal

Au total, un nombre de 58 individus (arbres) ont été sélectionnés pour procéder à une analyse de la diversité génétique moyennant 11 marqueurs SSR (GAPU 101, GAPU 103A, GAPU71A, GAPU71B, GAPU59, UDO99-012, UDO99-028, UDO99-039, UDO99-043, DCA9 et DCA18). Deux sites ont été choisis, sur le premier situé au niveau de la collection nationale de germoplasme ((Takeriets, Béjaia, latitude 36.24, longitude 6.57 and altitude 63.30), les échantillons de feuilles ont été prélevées sur 45 arbres, représentés par 21 cultivars. Le second site, situé dans la commune de Sofiana (Batna, latitude 35.41, longitude : 5.62 et altitude 708.33), les échantillons de feuilles ont été prélevés sur 13 pieds de 7 cultivars (Fig. 1). Les arbres ont un âge qui varie de 30 ans à une centaine d'années.

En effet, il a été procédé à la collecte d'un jeune rameau par arbre et leurs feuilles ont été choisies parmi celles n'ayant pas présentées de symptômes de maladies. Les feuilles ont été séchées dans l'étuve à 27°C pendant 5 jours. Ensuite, elles ont été déposées dans des enveloppes pour assurer leur conservation jusqu'à l'extraction de l'ADN.

3.2 Les marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires basés sur l'ADN sont des outils versatiles dans divers champs comme la taxonomie, la physiologie, l'embryologie, la génétique, etc. Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Un marqueur idéal doit être à hérédité simple, multi-allélique et co-dominant. Les marqueurs neutres et co-dominants sont nécessaires pour analyser la structuration des populations. En général, ils permettent de caractériser un génome de manière fiable, spécifique et rapide. La majorité des stratégies de marquage moléculaire détecte des mutations ponctuelles de la séquence d'ADN (comme par exemple les techniques : AFLP Amplified fragment length polymorphism, RFLP

Restriction fragment length polymorphism ou SNP Single nucleotide polymorphism), ou bien des modifications du nombre de copies de motifs répétés très courts de type microsatellites.

3.2.1 Les microsatellites (Simple Sequence Repeat, SSR)

Les marqueurs simple séquence répétée (SSR), également connus sous le nom de microsatellites sont des séquences d'ADN, constituées de répétitions en tandem de motifs mono- di-, tri- ou tétra nucléotidiques localisées dans une région codante ou non codante du

génomique chez les procaryotes (Tautz, 1989) et chez les eucaryotes (Zane *et al.*, 2002). Les microsatellites (répétitions de séquences simples) ou STR (séquences répétées en tandem) sont des séquences d'ADN longues composées de quelques nucléotides (2 -6 paires de base (pb)) répétées plusieurs fois en tandem (Tautz *et al.*, 1986. Litt et Luty, 189). Ce sont les marqueurs de choix (Diaz *et al.*, 2006; Sarri *et al.*, 2006; Baldoni *et al.*, 2009; Bracci *et al.*, 2009; Erre *et al.*, 2010; Diez *et al.* 2011; Fendri *et al.* 2014; Linos *et al.*, 2014) vu que les caractéristiques qu'ils ont. Il s'agit notamment d'un nombre de répétitions variables, et donc d'un polymorphisme élevé entre les génotypes (Bracci *et al.*, 2011), d'une bonne distribution à travers l'ensemble du génome, multi-allélique, avec un mode de transmission co-dominant et une facilité de détection par PCR avec des petites quantités d'ADN (Powell *et al.*, 1996). Les 11 loci microsatellites utilisés dans ce travail ont été choisis à partir de la liste des marqueurs recommandés pour l'étude de la diversité génétique (Tableau 9). Ces SSR ont démontré un réel pouvoir discriminant intra et inter variétale dans d'autres études similaires (Doveri *et al.*, 2008; Baldoni *et al.*, 2009; Muzzalupo *et al.*, 2010).

Tableau 9 : Les loci microsatellites sélectionnés pour la caractérisation moléculaire

N°	Locus	Primer séquences (5'-3')	Référence
1	GAPU 101	F : ATCGGGAGGGATGTGATGTA R : CATCGCATCGCCTGTAAATA	Carriero et al., 2002
2	GAPU 103A	F : TGAATTTAAC TTAAACCCACACA R : GCATCGCTCGATTTTATCC	
3	GAPU71A	F : GATCATTTAAATATTAGAGAGAGAGA R : TCCATCCATGCTGAACTT	
4	GAPU71B	F : GATCAAAGGAAGAAGGGGATAAA R : ACAACAAATCCGTACGCTTG	
5	GAPU59	F : CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA R : CAAAGGTGCACTTTCTCTCG	
6	UDO99-012	F : TCACCATTCTTAAC TTACACCA R : TCAAGCAATTCCACGCTATG	Cipriani et al., 2001
7	UDO99-028	F : TGCAGCTTCTGCCCATAC R : GCAGATCATCATTTGGCACT	
8	UDO99-039	F : AATTACCATGGGCAGAGGAG R : CCCCAAAGCTCCATTATTGT	
9	UDO99-043	F : TCGGCTTTACAACCCATTTTC R : TGCCAATTATGGGGCTAACT	
10	DCA9	F : AATCAAAGTCTTCCTTCTCATTTTCG R : GATCCTTCCAAAAGTATAACCTCTC	Sefc et al., 2000
11	DCA18	F : AAGAAAGAAAAAGGCAGAATTAAGC R : GTTTTCGTCTCTCTACATAAGTGAC	

3.3 Méthode

Les caractéristiques, nom commun, synonyme, nombre de pieds, origine géographique, diffusion à travers le territoire national et utilisation des cultivars étudiés sont représentées dans le tableau 10, en se référant au catalogue des variétés algériennes de l'olivier de l'I.T.A.F.V (Mendil et Sebai, 2006).

Tableau 10 : Nom du Cultivar, nombre d'arbre, synonymes, origine, diffusion et utilisation
(Mendil et Sebai, 2006)

Nom	Nbr d'arbres	Synonymes	Origine	Diffusion	Utilisation
Abani	02	laabani	Khenchla	Restreinte	Huile
Aeleh	02	Aaleh	Khenchla	Restreinte	Huile
Aghchren del ousseur	02	Pas de synonyme connu	Sétif	Restreinte	Double aptitude
Aghchren de titest	03	Pas de synonymes	Sétif	Restreinte	Double aptitude
Aghenfas	02	Aghenfous	Sétif	Restreinte	Double aptitude
Aguenau	04	Agnaw	Sétif	Restreinte	Double aptitude
Azerdaj	01	Aradj, Adjeraz	Kabylie	Occupe 10% du verger oléicole nationale	Double aptitude
Beskri	02	Pas de synonyme connu	Batna	Région des Aurès	Olive de table
Blanquette de Guelma	04	Pas de synonyme connu	Guelma	Assez répandue dans le Nord-est Constantinois	Huile
Bouchouke Soummame	01	Bouchouk sidi aiche, avouchouk	Vallée d'oued soummam	Locale	Double aptitude
Bouichret	01	Boutichrat, Avouchert	Béjaia	Locale	Huile
Chemlal	> de 04	Achamlal, Achamli, Achamlale	Kabylie	Occupe 40% du verger oléicole	Huile
Chemlal (âge: environ 300 ans)	01	Achamlal, Achamli, Achamlale	Batna	Occupe 40% du verger oléicole	Huile
Chemlal (envron 2000 ans)	01	Achamlal, Achamli, Achamlale	Batna	Occupe 40% du verger oléicole	Huile
Ferdel	02	No synonyms	Batna	Région des Aurès	Olive de table
Ferkani	02	ferkane	Tebessa	Région des Aurès	Huile
Gelb al faroudje	02	Pas de synonyme	Batna	Région des Aurès	Huile
Limli	04	Imeli, limeli	Bejaia	Occupe 8% du verger oléicole national	Huile

Rougette de Mitidja	04	Pas de synonymes connus	Plaine de Mitidja	Restreinte	Huile
Sigoise	04	Olive de Tlemcen, Olive du Tell	Plaine de Sig (Mascara)	Occupe 25% du verger oléicole algérien	Double aptitude
Sigoise (âge: envron 300 ans)	01	Olive du Tell	Batna	Région des Aurès	Double aptitude
Sofiana	02	Pas de synonyme	Batna	Région des Aurès	Olive de table
Souidi	01	Pas de synonyme connu	Khenchla	Locale	Huile
Takesrit	01	Pas de synonyme connu	Basse vallée de la soummam	Locale	Huile
Tefah	02	Atefah, tefahi	Béjaia, Batna	Restreint	Double aptitude
Telthi	02	Pas de synonyme connu	Batna	Région des Aurès	Huile

3.3.1 Extraction de l'ADN

Le protocole d'extraction suivi est celui de la méthode CTAB (Benbouza *et al.*, 2006). La méthode consiste à broyer 100 mg de feuilles sèches dans un tube « Eppendorf » de 2 ml à l'aide du broyeur Tissulyser II(Qiagen), 750µL de CTAB préchauffé au préalable à 60°C pendant 1h est ajouté. L'ensemble est homogénéisé immédiatement au vortex puis incubé au bain-marie pendant une heure à 60°C. Ensuite, 750 µl de chloroforme /alcool isoamylique (24 /1) sont ajoutée, et on agite pendant 10 min pour obtenir une émulsion. Une première centrifugation à 10000tr/min à 4°C pendant 10min est effectuée, le surnageant (phase aqueuse) est récupéré dans un tube neuf où 2/3 du volume est prélevé en isopropanol (conservé à 4°C) est ajouté afin de précipiter l'ADN. Une 2ème centrifugation pendant 7min à 8000tr/min à 4°, le surnageant est éliminé, 1000µl de tampon de lavage sont additionnés et le tout placé en agitation en position verticale pendant 30min. Une 3ème centrifugation est réalisée pendant 7min à 8000tr/min à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot est re-suspendu dans 200µL de tampon TE 1X. Le tout est incubé pendant 15min à 60°C. Enfin, la solution d'ADN est traitée avec 2µl d'ARNase pendant 30min à 37°C. Les solutions d'ADN sont stockées à - 20°C. Une fois l'ADN extrait on procède à sa quantification à l'aide d'un Nanodrop 2000c (Thermo scientific, Willington, USA).

3.3.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) et révélation du polymorphisme

Après l'extraction, l'ADN est dilué à une concentration finale de 25 ng. La composition du mix et les conditions PCR du milieu réactionnel ont été optimisés à partir de plusieurs protocoles (Carriero *et al.*, 2002; Cipriani *et al.*, 2001; Sefc *et al.*, 2000). La composition

finale appliquée est la suivante : dans un volume total de 25 µl nous avons 0,3 mM de chaque dNTPs (Qiagen, Venlo, the Netherlands), 0.5 µM de chacune des deux amorces (spécifiques au locus étudié), 1.5 mM MgCl₂ et 0.5 u de Taq polymerase (Qiagen, Venlo, the Netherlands).

Le programme d'amplification adopté est le suivant : une dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 3 min, suivie de 35 cycles avec 3 étapes soit, 3s à 94°C (dénaturation), 30s à T_a° d'appariement appropriée (selon l'amorce) et 1 minute à 72°C (amplification). Le programme se termine par une dernière étape d'extension finale de 5min à 72°C. La réaction PCR est faite à l'aide d'un thermal cycler VERITI (Applied Biosystems, Foster city, USA).

3.3.3 Méthode pour l'analyse de fragments d'ADN (taille et quantification)

Après la PCR, les produits d'amplifications sont soumis à une électrophorèse capillaire à l'aide du 2100 Bio-Analyzer (Agilent technologies, Waldbronn, Germany) et par la suite, analysés avec le 2100 Biosizing software (version A.02.12) en utilisant le DNA 1000 Lab chip kit (Muzzalupo et *al.*, 2010), qui donne directement la taille du produit d'amplification. Les étapes suivies pour la préparation des chips et de l'analyse sont comme suit :

A/Préparation du Gel Dye Mix : les étapes suivies sont :

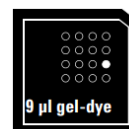
1. Dans un tube de Gel Matrix (tube rouge), mettre 15µl Dye concentrate, Vortexé et puis centrifugé rapidement ;
2. Transféré dans un spin filtre,
3. Centrifugé le tout à 2680 g pendant 10 min. La solution est protégée de la lumière et est stockée à 4°C pendant une période ne dépassant pas les 6 semaines.

B/Nettoyage du Bioanalyser AVANT et APRES utilisation : Il s'agit de :

1. Répartir 350 µl d'H₂O DEPC dans une puce cleanser et la placée dans le bioanalyser, ensuite la fermée et attendre 10 sec ;
2. Retirer la puce cleanser et la laissée sécher pendant 10 sec.

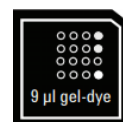
C/ Chargement du Gel Dye Mix : comme suit :

1. Placer le clip sur le niveau le plus bas ;
2. Visser la seringue du kit sur la station de préparation ;
3. Régler le piston à 1ml.
4. Placer une puce High Sensitivity DNA sur la station de préparation.
5. Déposer 9 µl de mélange matrice rouge/colorant dans les puits
6. Fermer le couvercle de la station de préparation, en appuyant assez fort pour enclencher le clip de fermeture.
7. Presser le piston très lentement et régulièrement jusqu'à ce qu'il soit retenu par le clip.
8. Attendre 60 sec libéré le clip pour relâcher le piston, puis le laissé remonter le piston seul ;



notés

9. Vérifier le volume du piston en fin de remontée (≥ 0.75 ml : indicateur d'absence de microfuite au niveau du joint) ;
10. Déposer 9 μ l du mélange matrice rouge/colorant dans les 3 puits notés :



D/ Chargement du Marqueur :

11. Déposer 5 μ l de marqueur vert dans les 11 puits « samples » + 1 puits Ladder.
12. Tous les puits doivent être remplis. Si moins de 11 échantillons sont à analyser, remplir directement avec 6 μ l du marqueur vert dans les puits vides.



E/ Chargement du Ladder et les échantillons :

1. Déposer 1 μ l de Ladder jaune dans les puits Ladder ;
2. Déposer 1 μ l d'ADN dans les puits notés de 1 à 11 ;
3. Vortexer la puce à 2400 rpm pendant 1 min.



F/Insertion de la puce dans le bioanalyseur : les étapes à suivre sont :

1. Allumer le Bioanalyseur et le PC et ouvrir le logiciel Agilent 2100 ;
2. Sélectionner le com port 2 ;
3. Sélectionner dans l'onglet Assays, Electrophoresis, DNA puis High Sensitivity DNA ;
4. Indiquer le nom du fichier résultats (16 caractères maximum) ;
5. Indiquer le nombre d'échantillons à analyser et entrer le nom des échantillons et les commentaires ;
6. Insérer la puce dans le Bioanalyser dans les 5 min et appuyer sur start.

NB. : Quand le run démarre : les opérations suivantes se succèdent avant l'apparition d'un profil :

- | | | |
|--|---|---------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1) Sending script : 48sec 2) Warming : 4-30sec 3) Focusing : 60sec 4) Loading : 70sec 5) Injecting : 15sec 6) Warming : 90sec 7) Calbrating all : 90sec 8) Loading : 70 secs 9) Reading ladder : 70sec 10) Reading sample 1 : 70sec 11) Reading sample n : n x 70sec | } | Environ 8 min |
|--|---|---------------|

Lorsque le run est terminé la puce est retirée immédiatement et on procède au nettoyage des électrodes du bioanalyser.

G/ Analyse des données :

Le logiciel permet l'analyse des données sous d'électrophérogramme, comme suit :

- 1) Contrôle du Ladder (marqueur du poids moléculaire)

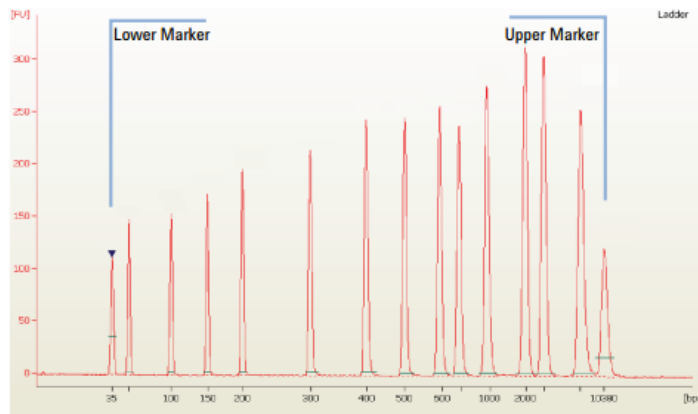


Figure 1 High Sensitivity DNA ladder

2) Observation globale des échantillons

4. Méthodes d'analyse des données

Le traitement des données s'est effectuée en trois étapes : 1) la définition et la collecte des données, 2) leur présentation en tableaux et enfin leur analyse à l'aide de tests statistiques.

4.1 Les données morphologiques

Les différents résultats de la caractérisation morphologique sont présentés dans le texte sous forme de moyennes et de coefficients de variation. L'analyse de la variance à un facteur (ANOVA1) a été effectuée dans le but de déceler l'effet caractère sur : la feuille, le fruit et l'endocarpe. Cette analyse a essentiellement pour objet de déceler des différences existantes entre les différentes valeurs obtenues pour les différents descripteurs du COI utilisés.

Une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée dans le but de déceler la corrélation entre les caractères étudiés et faire ressortir les caractères les plus discriminants. Enfin, la classification des sept cultivars étudiés a été réalisée par la méthode CAH afin de déterminer la nature et le degré des divergences /ressemblances entre eux.

4.2 Les données moléculaires

A partir des données obtenues, plusieurs analyses ont été effectuées. Tout d'abord, les paramètres génétiques ont été calculés sur base des résultats d'amplification obtenus sur les 58 individus avec les 11 microsatellites amplifiés. La diversité génétique intra-population et inter-population a été estimée à l'aide de calcul de plusieurs indices génétiques à savoir :

✓ Les fréquences alléliques et génotypiques (p_i)

Pour un locus donné, on détermine les différents génotypes présents dans une population. Ceci permet de définir les fréquences génotypiques. Si les individus sont diploïdes, la présence de 2 allèles (identiques ou différents) sera notée pour chaque locus. Ainsi, les

fréquences alléliques sont déduites des fréquences génotypiques. Les fréquences allélique sont le paramètre de base caractérisant une population, ils sont d'une grande importance dans le processus d'évolution (Hamrick, 1997), puisque les changements génétiques d'une population sont habituellement décrits par des changements des fréquences alléliques.

✓ **Taux de polymorphisme « P% »**

C'est la proportion des gènes polymorphes parmi l'ensemble des gènes étudiés.

$$P = \text{Nbre de gènes polymorphes} / \text{Nbre total de gènes étudiés}$$

Une population sera dite polymorphe pour un locus donné, si la fréquence allélique de l'allèle le plus fréquent est inférieure à **0,95**. L'utilité de ce paramètre dépend du nombre de loci analysés. **P** n'est pas informatif lorsque peu de loci sont analysés (Berg and Hamrick 1997). Aussi **P** est en fonction de la taille de l'échantillon analysé, les allèles aux faibles fréquences pouvant être facilement observées dans des échantillons de grande taille. De ce fait, ce paramètre n'est pas un bon indicateur de la variabilité allélique (Nei, 1987).

✓ **Le nombre d'allèles par locus (Na) et le nombre efficace d'allèles (Ne)**

Une autre mesure de la variabilité est la moyenne du nombre d'allèles par locus (**Na**) :

$$Na = \text{nombre total d'allèles} / \text{nombre de loci}$$

D'autre part, pour déterminer la fréquence de ces allèles, pour un locus et un taux d'hétérozygotie donnés, on définit le nombre d'allèles efficaces (**Ne**), maintenus dans une population d'effectif N, comme le nombre théorique d'allèles possibles dans une population de même taille et de même hétérozygotie à l'état stationnaire, mais dans laquelle tous ces allèles auraient la même fréquence (Kimura et Crow, 1964). On remarque que le nombre efficace d'allèles est plus faible que le nombre réel (sauf dans le cas où ceux-ci ont des fréquences alléliques égales).

✓ **L'indice de diversité de Shannon (I)**

Ce paramètre renseigne sur la diversité génétique des populations, plus il est grand, moins les populations sont homogènes. L'indice de Shannon est un indice d'abondance basé sur la diversité spécifique qui permet de décrire, avec d'autres la structure d'une population.

$$I = \sum_{i=1}^S (p_i * \log_2 p_i)$$

✓ Taux d'hétérozygotie

L'hétérozygotie (diversité génétique de Nei, 1973) est la moyenne des fréquences des hétérozygotes observées à chacun des locus étudiés.

L'indice **He** représente l'hétérozygotie attendue pour une population en panmixie, c'est la probabilité que 2 individus choisis (4 allèles, 2 copies des gènes de deux individus) aléatoirement dans une population aient des allèles différents d'un locus donné. Il est estimé à partir des fréquences alléliques (2pq).

$$He = 1 - \sum (pi)^2$$

Pi : fréquence à l'i^{ème} allèle pour un locus donné

L'indice **Ho** représente l'hétérozygotie observée, il est mesuré à partir des analyses génotypiques. En comparant ces deux indices il est possible de déduire l'impact des forces évolutives dans les populations, dues à l'autofécondation ou à l'autogamie.

Le taux d'hétérozygotie fournit une bonne estimation de la variabilité génétique de la population, à condition toutefois que les individus de cette population se reproduisent au hasard.

Tous ces indices ont été calculés en utilisant GenAIEx 6.5 software (<http://anu.edu.au/BoZo/GenAIEx>) (Peakall and Smouse, 2006). Pour chaque marqueur, les cultivars ayant amplifiés un seul allèle, ont été considérés comme homozygotes, si une mutation survient, la diversité génétique sera considérablement affectée (une sous-estimation probable suit à l'avènement d'allèle nul). En conséquence, la fréquence d'allèle nul a été calculée à l'aide du logiciel Free NA (Chapuis and Estoup, 2007).

Un autre indice génétique, le pouvoir de discrimination « PD » (Kloosterman et al., 1993), a été aussi calculé pour chaque marqueur. Nous avons choisi cet indice car il permet de distinguer entre les cultivars génotypés (Alba et al. 2009). La formule de calcul est comme suit : **PD** = $1 - \sum Pi^2$, (Tessier et al., 1999), où la fréquence allélique est remplacée par la fréquence de génotypique (Pi : la fréquence du génotype i^{ème}).

✓ **Distance génétique entre sous populations**

Une autre approche de l'étude de la différenciation génétique entre des individus ou des populations est l'analyse du degré de similitude entre eux ou entre elles. Il est généralement considéré que la distance génétique entre les sous populations augmente en fonction du temps de leur divergence à partir de la population d'origine (Gonzales-Candelas et Palacios, 1995).

Dans notre étude la similarité génétique est calculée à l'aide du coefficient simple matching (Sokal et Michener, 1958), les 58 arbres ont été groupés (en clusters) par la méthode non pondérée du groupe de pair des moyennes arithmétiques (UPGMA) en utilisant le logiciel NTSYS (version 2.2).

Enfin, la structure génétique spatiale et l'analyse des autocorrélations spatiales entre les individus d'olivier étudiés ont été réalisées avec le logiciel STRUCTURE en utilisant les données d'amplifications des SSRs utilisés (Pritchard et *al.*, 2000; Falush et al 2003, Excoffier et *al.*, 2005), avec 10 permutations indépendante en fonction de la valeur K (nombre de clusters) allant de 1 à 20. La simulation a été effectuée en utilisant le modèle de mélange sans aucune information préalable. Le plus petit K a été sélectionné selon le critère suggéré par Pritchard et *al.*, 2007 après avoir atteint le plateau "Ln P (D)" valeurs (log-vraisemblance des estimations du modèle de la structure) sélectionnées. Le mélange des proportions pour chaque individu (Q), ont été estimées en utilisant 10 000 runes suivies par 100, 000 Markov Chaine de Monte Carlo (MCMC) répétition. Ensuite, la cohérence des résultats est vérifiée visuellement en comparant les sorties pour les 20 séries de répétitions.

Une fois les pools génétiques construits, une analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a été réalisée avec le logiciel GenAlEx 6.5 pour estimer la variance moléculaire totale intra et inter populations et tester l'importance des composantes de la variance partitionnée en utilisant les procédures de test de permutation (Excoffier et *al.*, 1992). La différenciation génétique entre les pools génétiques identifiés dans cette étude a été estimée en calculant les **F-statistiques de Wright**, ce sont fondamentalement des estimations de la fixation des allèles à travers différents niveaux d'organisation d'une population. Les **F-statistiques** sont estimées à partir des composantes de la variance obtenue d'une analyse hiérarchisée (AMOVA) des fréquences géniques (Weir, 1996). Les indices de fixation de Wright : Le coefficient de consanguinité (F_{is}), la déviation des fréquences génotypiques (F_{it}), et l'indice de fixation (F_{st}) ; sont couramment utilisés pour la différenciation entre populations.

✓ **Le coefficient de consanguinité (F_{is})**

La mesure la consanguinité des individus, consécutive à l'absence de panmixie à l'intérieur des sous populations. Les principales explications des F_{is} significatifs ($F_{is}>0$) s'articulent autour des points suivants (David, 1996) :

- effets populationnels : les individus considérés ne proviennent pas d'un pool unique de gamètes fécondés au hasard. Il est alors possible de considérer une réassociation non aléatoire des gamètes (consanguinité) ou bien il existe un mélange de groupes différenciés à l'intérieur de l'échantillon (effet Wahlund).
- non-détection du polymorphisme introduisant une sous-estimation de l'hétérozygotie observée. On distingue différentes possibilités de non détection : l'existence d'allèles nuls (non visualisés) ou même artefacts de lecture.

✓ **L'indice de fixation (F_{st})**

Il traduit le déficit en hétérozygotes dû à la subdivision de la population en sous populations et mesure le niveau de différenciation génétique entre les sous populations. Ce déficit en hétérozygotes est souvent attribué à la dérive génétique et/ou à un flux de gènes limités. Donc, il mesure la réduction relative des hétérozygotes, lié aux différences alléliques entre sous populations. C'est un indice de diversification des populations. Si les sous populations sont identiques, $F_{st}=0$.

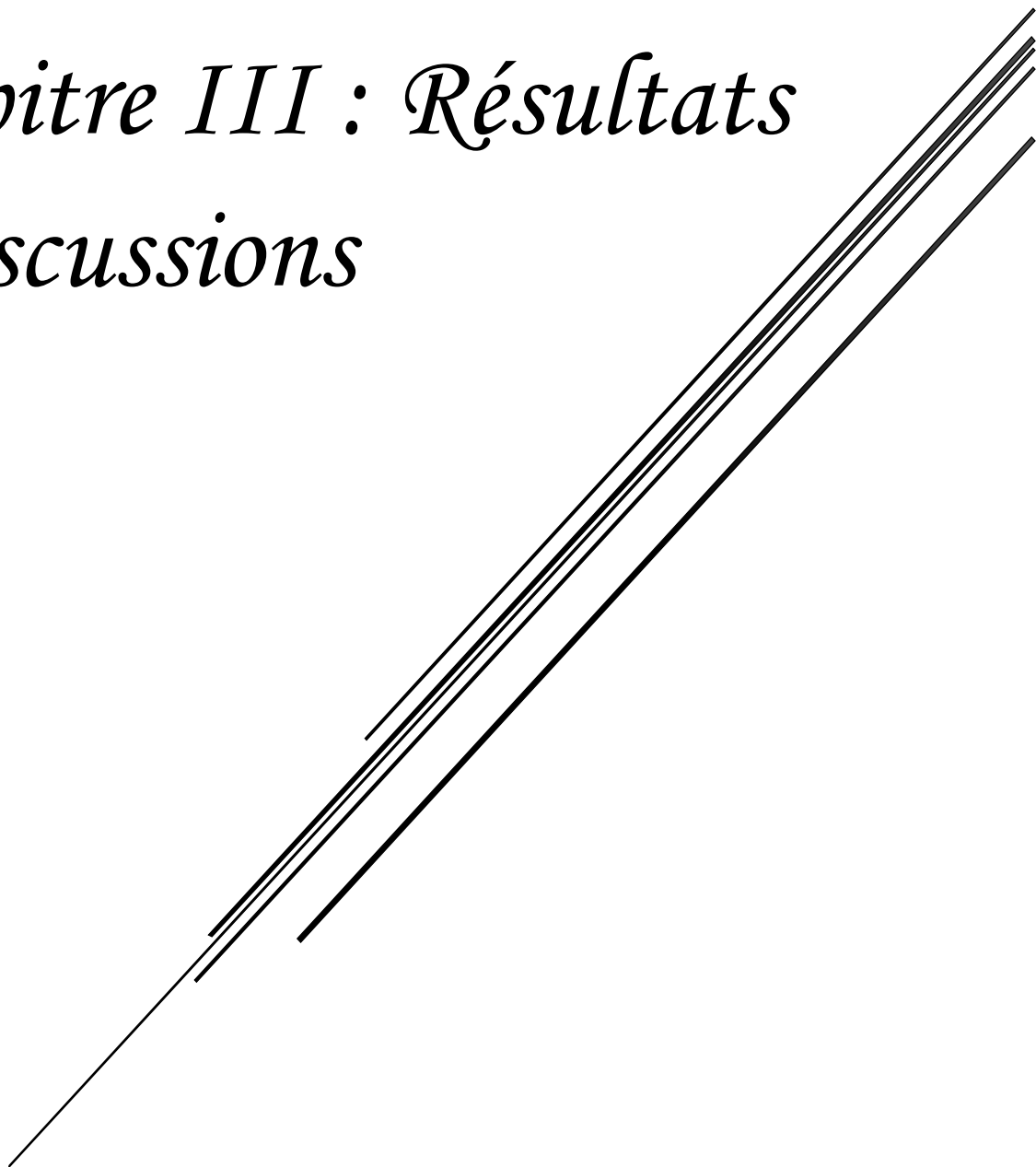
F_{st} : de 0 à 0,05 : faible,

de 0,05 à 0,15 modérée,

de 0,15 à 0,25 importante et au-delà, très importante

Il faut noter que la signification statistique des estimateurs F_{st} a été évaluée en utilisant 10.000 permutations.

Chapitre III : Résultats et discussions



L'olivier l'arbre qui traverse les temps





I. Caractérisation morphologique




1. Les caractères morphologiques qualitatifs

1.1 Observation de l'aspect de l'arbre

Les observations faites ont portées sur trois caractères les plus discriminants (vigueur, port et densité du feuillage) liés à l'arbre et ont été réalisées sur des individus en bon état. Les résultats sont enregistrés dans le Tableau 11 avec illustration en photos.

Tableau 11 : Description de l'aspect générale des 7 cultivars étudiés

Cultivar	Aspect générale de l'arbre			Photos
	Vigueur	Port	Densité du feuillage	
Aghchren de titest	Faible : le tronc et la surface de projection sont inférieurs.	Etalé : le port naturel de l'espèce, le feuillage avec une forme hémisphérique	Lâche : présence de soupiraux qui laissent entrer la lumière.	
Aguenau	Moyenne : avec un développement moyen.	Etalé : le port naturel de l'espèce, le feuillage avec une forme hémisphérique	Moyenne : une densité typique de l'espèce.	
Blanquette de guelma	Moyenne : avec un développement moyen.	Dressé : branche avec une croissance verticale et une forte dominance apicale.	Lâche : présence de soupiraux qui laissent entrer la lumière.	
Chemlal	Elevée : une croissance importante et un développement du tronc, de la frondaison en hauteur et en volume.	Dressé : branche avec une croissance verticale et une forte dominance apicale.	Moyenne : une densité typique de l'espèce.	

Limli	Moyenne : avec un développement moyen.	Etalé : le port naturel de l'espèce, le feuillage avec une forme hémisphérique	Moyenne : une densité typique de l'espèce.	
Rougette de Mitidja	Moyenne : avec un développement moyen.	Etalé : le port naturel de l'espèce, le feuillage avec une forme hémisphérique	Moyenne : une densité typique de l'espèce.	
Sigoise	Moyenne : avec un développement moyen.	Dressé : branche avec une croissance verticale et une forte dominance apicale.	Moyenne : une densité typique de l'espèce.	

2. Les caractères morphologiques quantitatifs

2.1/Analyse statistique descriptive : facteur années

Les moyennes des mesures faites pour les caractères quantitatifs de la feuille, le fruit et l'endocarpe pour la période (2011-2013) sont représentées dans les Tableaux 12, 13 et 14 respectivement. Le coefficient de variation et l'écart type permettent de mesurer et de préciser l'intensité des irrégularités ou plus précisément les fluctuations entre les 3 années d'évaluation. En effet, le coefficient de variation et l'écart type permettent de comparer la dispersion (variabilité) autour de la moyenne.

$$CV = S/m$$

Avec :

S : écart type (mm) ; CV : coefficient de variation (%) et m : moyenne.

Afin d'interpréter les résultats du coefficient de variation obtenus nous avons utilisés les intervalles de Martin et Gendron (2004) :

- ✓ Entre 0.0% et 16.0%, la variation est faible ;
- ✓ Entre 16.0% et 33.3%, la variation est importante ;
- ✓ Au-delà de 33.3% la variation est très élevée.

2.1.1 Caractères des feuilles

La longueur des feuilles des cultivars évalués a variait de 46,83 mm jusqu'à 70.19 mm pour la Blanquette de Guelma et Chemlal, respectivement. D'après les résultats reportés dans le Tableau 12 nous remarquons que le caractère montrant le moins de variation est la longueur de la feuille qui varie de 1% à 7%. Ce qui peut faire de lui un bon marqueur morphologique, relativement stable dans le temps, que l'on peut utiliser pour la caractérisation. Par contre, les deux autres caractères, la largeur et la forme de la feuille, montrent des coefficients de variations importants, de 20% et 19%, respectivement.

Tableau 12 : Moyennes arithmétiques des trois caractères (Longueur, largeur et forme) évalués de la feuille chez pour la période (2011-2013)

		Agchren de Titest	Aguenaou	Limeli	Blanquette de Guelma	Sigoise	Chemlal	Rougette de Mitidja
Longueur (Len mm)	Moy	55,94	60,16	56,83	46,83	50,62	70,19	51,08
	S	3,25	3,79	0,30	0,23	3,32	0,91	0,72
	CV	6%	6%	1%	0%	7%	1%	1%
Largeur (l en mm)	Moy	14,35	14,405	16,67	14,23	12,78	14,37	13,24
	S	2,89	2,01	1,52	1,20	0,77	0,73	0,43
	CV	20%	14%	9%	8%	6%	5%	3%
Forme (L/l)	Moy	4,19	4,43	3,52	3,37	4,02	4,95	3,94
	S	0,80	0,39	0,35	0,32	0,53	0,20	0,10
	CV	19%	9%	10%	10%	13%	4%	3%

2.1.2 Caractères des fruits

La longueur des fruits des cultivars évalués a variait de 16.05 mm jusqu'à 22.93 mm pour *Chemlal* et *Aguenaou*, respectivement. Ce dernier cultivar a enregistré le poids le plus élevé avec 3,424 g, alors que le plus faible a été trouvé chez le cultivar *Limli* avec le coefficient de variation le plus élevé par rapport aux autres cultivars évalués pour la même période (Tableau 13). Généralement, les variations annuelles observées dans les poids des fruits sont principalement dues à l'environnement et les conditions de cultures notamment la disponibilité de l'eau.

Tableau13 : Moyennes arithmétiques des quatre caractères (Longueur, largeur, forme et poids) évalués du fruit pour la période (2011-2013)

		Agchren de Titest	Agueanaou	Limeli	Blanquette de Guelma	Sigoise	Chemlal	Rougette de Mitidja
Longueur (L en mm)	Moy	19,97	22,935	15,58	17,96	19,31	16,05	18,25
	S	0,538	0,859	1,38	0,82	1,17	0,389	0,47
	CV	3%	4%	9%	5%	6%	2%	3%
Largeur (l en mm)	Moy	13,73	14,61	7,79	12,64	14,43	9,63	11,84
	S	0,585	1,505	1,936	1,398	1,2178	0,555	0,283
	CV	4%	10%	25%	11%	8%	6%	2%
Forme (L/l)	Moy	1,46	1,60	1,948	1,42	1,34	1,68	1,54
	S	0,028	0,158	0,255	0,10	0,042	0,133	0,019
	CV	2%	10%	13%	7%	3%	8%	1%
Poids (en g)	Moy	2,76	3,42	0,62	1,96	2,74	1,05	1,76
	S	0,25	0,39	0,382	0,38	0,46	0,09	0,09
	CV	9%	11%	62%	20%	17%	9%	5%

2.1.3 Caractères des endocarpes

Pour l'endocarpe les valeurs les plus basses sont enregistrées pour le cultivar *Limeli*, avec les valeurs pour la longueur, la largeur et le poids sont de : 13,75mm, 6,42mm et 0,34g respectivement. Alors que, les valeurs les plus importantes sont enregistrées pour le cultivar *Agueanaou* (L : 16,83mm ; l : 12,13mm et poids : 0,64g) (Tableau 14). Nos résultats montrent que ces caractères enregistrent les coefficients de variation les plus faibles entre 1% et 16% ce qui concorde avec les différents travaux déjà entrepris (Trujello et al., 2013) ce qui stipule que les traits de l'endocarpe semblent être les plus discriminants et les plus stables, par rapport à d'autres caractères, tels que ceux du fruit qui sont plus influencés par les conditions environnementales. Pour ces raisons, les descripteurs de l'endocarpe ont été fréquemment utilisés pour cataloguer les cultivars d'olivier (Barranco et al., 2000a, 2005 ; Fendri et al., 2010 ; D'Imperio et al., 2011).

Tableau 14 : Moyennes arithmétiques des quatre caractères de l'endocarpe (Longueur, largeur, forme et poids) évalués du fruit pour la période (2011-2013)

		Agchren de Titest	Agueanaou	Limeli	Blanquette de Guelma	Sigoise	Chemlal	Rougette de Mitidja
Longueur (L en mm)	Moy	15,91	16,83	13,75	15,43	14,30	14,09	15,07
	S	0,69	0,05	0,13	0,87	0,12	0,81	0,39
	CV	4%	0%	1%	6%	1%	6%	3%
Largeur (l en mm)	Moy	7,91	12,13	6,42	6,45	7,71	6,84	6,47
	S	0,35	0,63	0,08	0,39	0,10	0,16	0,14
	CV	4%	5%	1%	6%	1%	2%	2%
Forme (L/l)	Moy	2,01	2,02	2,14	2,39	1,84	2,02	2,33
	S	0,007	0,19	0,009	0,006	0,02	0,04	0,11
	CV	0%	10%	0%	0%	1%	2%	5%
Poids (en g)	Moy	0,59	0,64	0,34	0,35	0,55	0,45	0,38
	S	0,05	0,03	0,02	0,06	0,01	0,05	0,01
	CV	9%	5%	6%	16%	2%	11%	3%

2.2 Analyse de la variance

Compte tenu des résultats indiqués dans les Tableaux (12, 13 et 14) relatifs aux coefficients de variation des cinq variables (largeur et forme de la feuille, largeur, forme et poids du fruit), nous avons éliminés leurs données de l'analyse de la variance.

2.2.1 Longueur de la feuille « LF »

Les variations des moyennes arithmétiques, durant 3 années, de la longueur de la feuille (LF) sont illustrées sur la Figure N° 12.

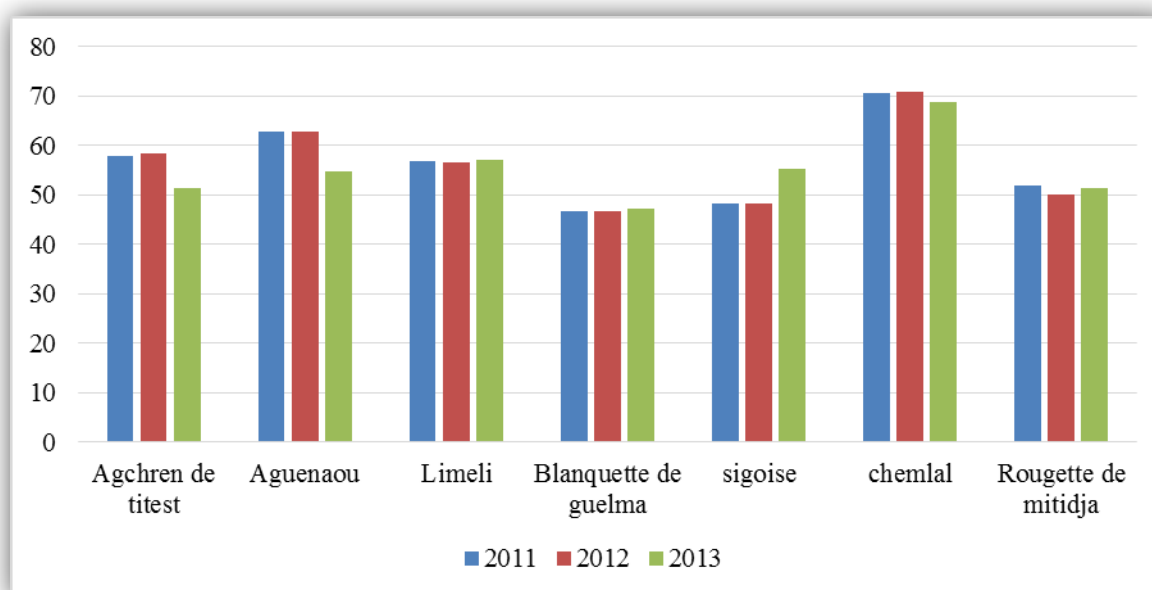


Figure N°12 : Variations des moyennes arithmétiques de la longueur de la feuille (mm) sur trois années

Les valeurs moyennes pour la longueur de la feuille les plus importantes sont enregistrées pour le cultivar *Chemlal* (70,19mm) alors que la plus faible moyenne est enregistrée par le cultivar *Blanquette de Guelma* (46,83mm). D'après la classification du COI, 1997 nos cultivars sont classés comme suite :

- ✓ Variété à feuille réduite : *Blanquette de Guelma*,
- ✓ Variété à feuille moyenne : *Aghchren de titest*, *Aguenaou*, *Limli*, *Rougette de Mitidja* et *Sigoise*,
- ✓ Variété à longueur élevée : *Chemlal*.

Les résultats de l'analyse de la variance ont révélé des différences très hautement significatives entre les différents cultivars ($F = 10,4386$; $Pr < 0,0001$) (Annexe1).

Ces résultats sont très proches de ceux observés pour des variétés Italiennes (D'Imperio et *al.*, 2011) avec des valeurs qui varient de 45 -64,8 mm . alors que des valeurs plus faibles sont signalées pour les variétés espagnoles (28-63,2 mm) (Belaj et *al.*, 2011) .

2.2.2 Longueur du fruit« L Fr »

Les résultats d'évaluation de la longueur du fruit (LO) sont portés sur la figure N° 13.

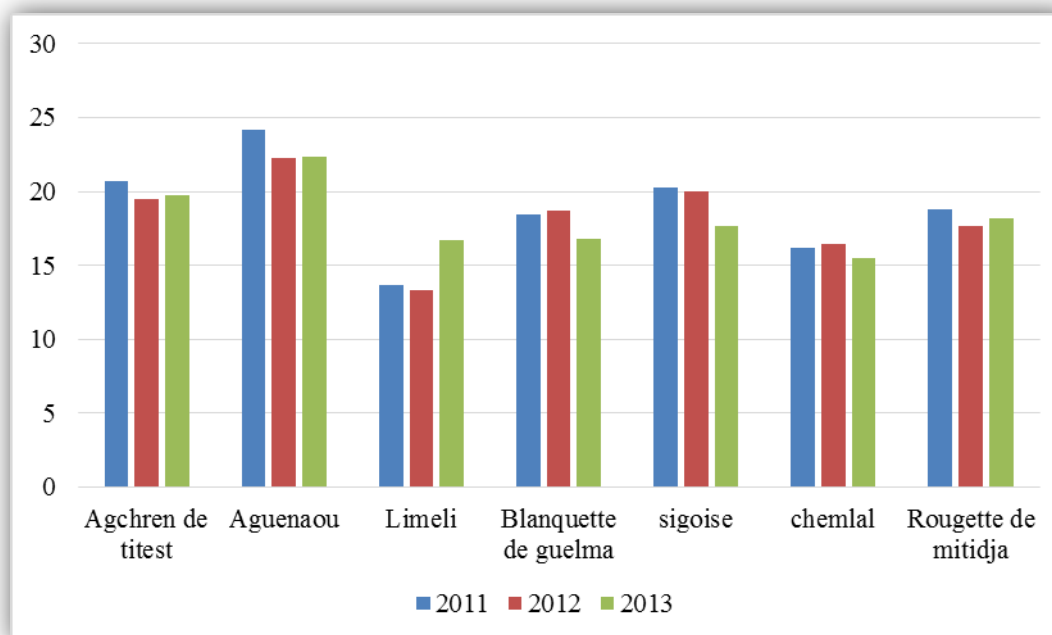


Figure N°13 : Variations des moyennes arithmétiques de la longueur du fruit (mm) sur trois années

Les résultats de l'analyse de la variance ont mis en évidence une différence très hautement significative entre les cultivars étudiés ($F= 8,29$; $Pr< 0,0001$) (Annexe2). La comparaison des moyennes a montré que le cultivar *Aguenau* présente les fruits les plus longs avec une moyenne de 22,93 mm tandis que le cultivar *Limli* possède les fruits les plus courts avec une moyenne de 14,56mm. Les moyennes enregistrées dans notre étude sont semblables à ceux trouvés chez les variétés espagnoles (Belaj et *al.*, 2011) et Italiennes (D'Imperio et *al.*, 2011).

2.2.3 Caractères de l'endocarpe

Selon la littérature, les descripteurs liés à l'endocarpe sont les plus discriminants et les plus stables par rapport aux autres caractères morphologiques. L'étude de Trujillo et *al.*, (2013) sur une collection internationale « WOGBC » contenant 499 cultivars provenant de 21 pays, a bien démontré l'utilité de ces caractères. De même, nos données concordent avec cette

tendance en ayant des coefficients de variation faibles durant les 3 années d'étude (Tableau 14).

En effet, nous avons procédé à l'évaluation de 11 caractères de l'endocarpe qui sont : la longueur, la largeur, le poids, la forme, la symétrie en position A ; la position du diamètre maximale, le sommet, la base, la surface, le nombre de sillons fibrovasculaires, leur distribution et la présence ou l'absence du mucron.

En fait, les résultats de l'analyse de la variance indiquent qu'il y a une différence inter-variétale très hautement significative uniquement pour 4 caractères sur les 11 étudiés et qui sont : la longueur ($F=5,095$; $Pr < 0,0001$), la largeur ($F=9,845$; $Pr < 0,0001$), le poids ($F=99,95$; $Pr < 0,0001$) et la forme ($F=5,6454$; $Pr < 0,0001$), dont les détails par cultivar sont indiqués dans les annexes 3, 4, 5 et 6.

✓ *Longueur de l'endocarpe*

Les moyennes relatives au paramètre de la longueur du noyau sont portées dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Moyenne de la Longueur de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Cultivar	Moyenne en (mm)
Agchren de titest	15,909 \pm 0,845
Aguenaou	16,832 \pm 0,063
Limli	13,727 \pm 0,163
Blanquette de Guelma	15,431 \pm 1,070
Sigoise	14,303 \pm 0,150
Chemlal	14,086 \pm 0,999
Rougette de Mitidja	15,073 \pm 0,483

Les valeurs moyennes pour la longueur de l'endocarpe varient entre 13,727mm et 16,832mm, la comparaison des moyennes par le test LSD de Fisher a montré que le cultivar «Aguenaou» présente les endocarpes les plus longs avec une moyenne de 16,832mm, tandis que le cultivar «Limli» possède les endocarpes les plus courts.

✓ *Largeur de l'endocarpe*

Le Tableau 16 reprend les résultats relatifs aux moyennes de la largeur du noyau où le cultivar Aguenaou se distingue par la plus grande largeur enregistrée au cours de notre étude. Les valeurs moyennes pour la largeur de l'endocarpe varient entre 6,425 mm et 12,13 mm, la comparaison des moyennes par le test LSD de Fisher a montré que le cultivar «Aguenaou»

présente des endocarpes larges, tandis que le cultivar «*Limli*» possède les endocarpes les moins larges.

Tableau 16 : Moyennes du largeur de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Cultivar	Moyenne en (mm)
Agchren de titest	7,9141± 0,432
Aguenau	12,13± 0,773
Limli	6,4258±0,101
Blanquette de Guelma	6,455± 0,479
Sigoise	7,707± 0,123
Chemlal	6,844± 0,201
Rougette de Mitidja	6,472± 0,170

✓ *Forme de l'endocarpe*

La forme de l'endocarpe a été déterminée à partir du rapport (L/l), et est assignée selon les descripteurs établis par le COI, 1999 (Tableau 17).

Tableau 17 : Forme de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Cultivar	Rapport (L/l)	Forme selon les descripteurs Cois
Agchren de titest	2,010± 0,008	Elliptique
Aguenau	2,018±0,244	Elliptique
Limli	2,141±0,011	Elliptique
Blanquette de Guelma	2,395±0,008	Allongé
Sigoise	1,843±0,028	Ovoïde
Chemlal	2,015±0,052	Elliptique
Rougette de Mitidja	2,327±0,136	Elliptique

D'après les résultats statistiques dans le Tableau 17 nous pouvons classer nos cultivars dans 3 classes différentes :

- Endocarpe de forme elliptique : *Agchren de titest*, *Chemlal* et *Rougette de Mitidja* ;
- Endocarpe de forme Allongé : *Blanquette de Guelma* ;
- Endocarpe de forme ovoïde : *Sigoise*.

✓ **Poids de l'endocarpe**

Le poids de l'endocarpe présente des valeurs allant de (0,345) g pour le cultivar *Limli* jusqu'à (0,636) g pour le cultivar *Aguentaou*. D'après les résultats mentionnés dans le tableau 18 nos cultivars sont classés principalement dans deux catégories :

- Cultivars avec endocarpe de poids élevé (Agchren de titest, aguentaou et Sigoise) ;
- Cultivar avec endocarpe moyen (*Limli*, *Blanquette de Guelma*, *Chemlal* et *Rougette de Mitidja*).

Tableau 18 : Moyennes du poids de l'endocarpe des 7 cultivars étudiés

Cultivar	Poids (g)	Classification selon les descripteurs COI
Agchren de titest	0,592±0,062	Elevé
Aguentaou	0,636±0,038	Elevé
Limli	0,345±0,023	Moyen
Blanquette de Guelma	0,353±0,069	Moyen
Sigoise	0,545±0,013	Elevé
Chemlal	0,429±0,059	Moyen
Rougette de Mitidja	0,378±0,012	Moyen

2. 3 L'analyse en composante principale (ACP)

L'analyse en composante principale (ACP) est une analyse multifactorielle, c'est-à-dire qu'elle cherche à représenter graphiquement les relations entre individus (les 7cultivars) par l'évaluation de leurs ressemblances, ainsi que les relations entre variables quantitatives (caractères morphologiques) par l'évaluation de leurs liaisons. Cette analyse nous a permis d'atteindre trois objectifs :

- 1 / Une représentation graphique "optimale" des cultivars,
- 2/ Une représentation graphique des caractères morphologiques en expliquant au mieux les liaisons initiales entre ces caractères,
- 3/ La réduction de la dimension en projetant simultanément cultivars et caractères morphologiques (compression).

2. 3.1 Résultats de l'Analyse en Composantes Principales (ACP)

❖ Analyse du nuage de points-cultivars : graphique des individus

L'ACP a été appliquée à la matrice des corrélations obtenue à partir de l'ensemble des 11 variables quantitatives mesurées sur les 7 cultivars ayant fait l'objet de notre étude. L'objectif de cette analyse est la détermination de la relation entre les caractères et faire ressortir ceux ayant la plus grande contribution dans la variabilité entre les cultivars c'est-à-dire les plus discriminants qui permettront la comparaison entre les cultivars. De plus, la recherche de variables qui sont très corrélées entre elles, et celles qui, au contraire ne le sont pas, va nous permettre d'identifier, (Duby et Robin, 2006) et de faire un premier tri, des meilleurs génotypes (cultivars) ayant les caractères les plus prometteurs pour l'amélioration d'un trait important lors d'un programme de sélection. Les résultats de cette analyse sont résumés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 19 : Résultats de l'analyse ACP sur les 2 axes principaux (F1, F2)

	F1	F2	F 3
Valeur propre	4,519	2,304	1,946
Variabilité (%)	41,080	20,949	17,688
% cumulé	41,080	62,030	79,718

Légende : V1:F longueur (L); V2:F largeur (l); V3 : F rapport (L/l); V4: Fr longueur (L); V5: Fr largeur (l); V6:Fr rapport (L/l); V7:Fr poids ; V8:E longueur (L); V9: E largeur (l); V10:E rapport (L/l); V11 : E poids.

L'examen des données dans le Tableau 19 fait ressortir une variabilité de 79%, associé respectivement aux axes 1, 2 et 3. Ceci indique une variabilité moyenne entre les cultivars sur le plan morphologique avec des valeurs propres de (4,52), (2,3) et (1,9) respectivement pour l'axe 1, 2 et 3. Nous avons 41% de variabilité total expliqué par CP1 avec une forte contribution positive des paramètres relatifs au fruit et l'endocarpe : largeur fruit, rapport L/l du fruit, poids du fruit, longueur de l'endocarpe, largeur de l'endocarpe et poids du fruit. Par contre, la CP2, explique 21% de la variabilité avec une contribution positive de trois variables : longueur feuille, rapport L/l de la feuille et rapport L/l de l'endocarpe. Enfin, la CP3 explique 17% de la variabilité total avec une contribution positive de la variable largeur de la feuille. Ainsi, pour discuter nos résultats nous considérons deux axes 1 et 2 pour rendre

compte de la distribution des variables (paramètres morphologiques) et des individus (cultivars, géotypes).

La figure N°14 illustre une représentation graphique des variables sur le cercle de corrélation ce qui permet de détecter rapidement les variables liées entre elles sur base des corrélations calculées. Selon Duby et Robin (2006) pour qu'une variable soit contributive et bien représentée sur un axe donné, il faut que sa corrélation soit > 0.5 (50%) et que le cosinus carré soit proche de 1. Sur la base des corrélations les plus importantes entre variables / individus et les axes comme le montre le tableau en annexe 7, notre analyse montre que les variables les plus significatives sont celles liées au fruit (V5, V6, V7), l'endocarpe (V8, V9, V10 et V11) et la feuille (V1 et V3).

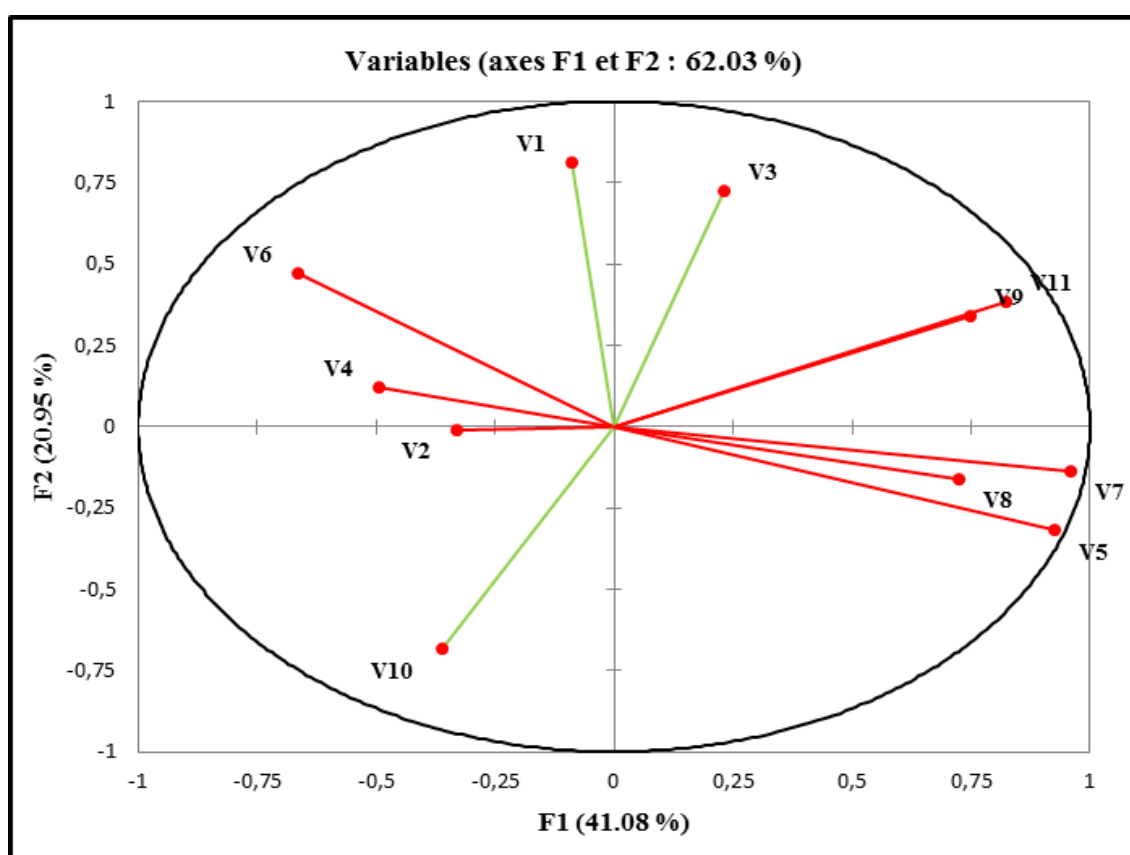


Figure N°14 : Cercle de corrélation des 11 variables morphologiques (F1 et F2)

Cette même figure fait ressortir que sur l'axe 1, nous distinguons deux groupes :

- Le 1^{ère} groupe est dans l'extrémité positive comprenant les paramètres : V5, V7, V8, V9 et V11, qui sont bien représentées et ont eu la plus forte contribution à la formation de l'axe 1 et à l'explication de la variabilité entre les individus.
- Le 2^{ème} groupe est situé à l'extrémité négative avec une unique variable V6 qui est négativement corrélée avec le premier groupe.

Par contre, on observe que l'axe 2 est corrélé avec 3 variables dont deux (V1 et V 3) contribuent positivement dans sa formation, et la troisième variable (V10) y contribue négativement.

❖ **Analyse du nuage de points-cultivars : graphique des individus.**

Afin de s'assurer de la bonne présentation graphique d'un cultivar il est nécessaire de calculer le cosinus carré (Duby et Robin, 2006). Si le cosinus carré est proche de 1 on peut dire que le cultivar est bien représenté par sa projection sur l'axe ; et si deux individus sont bien représentés en projection sur un axe et ont des projections proches, alors on pourra dire qu'ils sont proches dans l'espace (Annexe 7).

Ainsi, selon PALM (1998) et MORINEAU et ALUJA-BANET (1998), la qualité de la représentation d'un point dans le plan peut être obtenue en additionnant les cosinus carrés relatifs aux deux axes qui donnent un pourcentage de la représentation du point sur le sous-espace défini par ces axes. La projection de nos 7 cultivars dans le plan factoriel (1-2) est représentée sur la figure N°13, qui fait ressortir des groupes distincts preuve d'une distinction sur le plan morphologique.

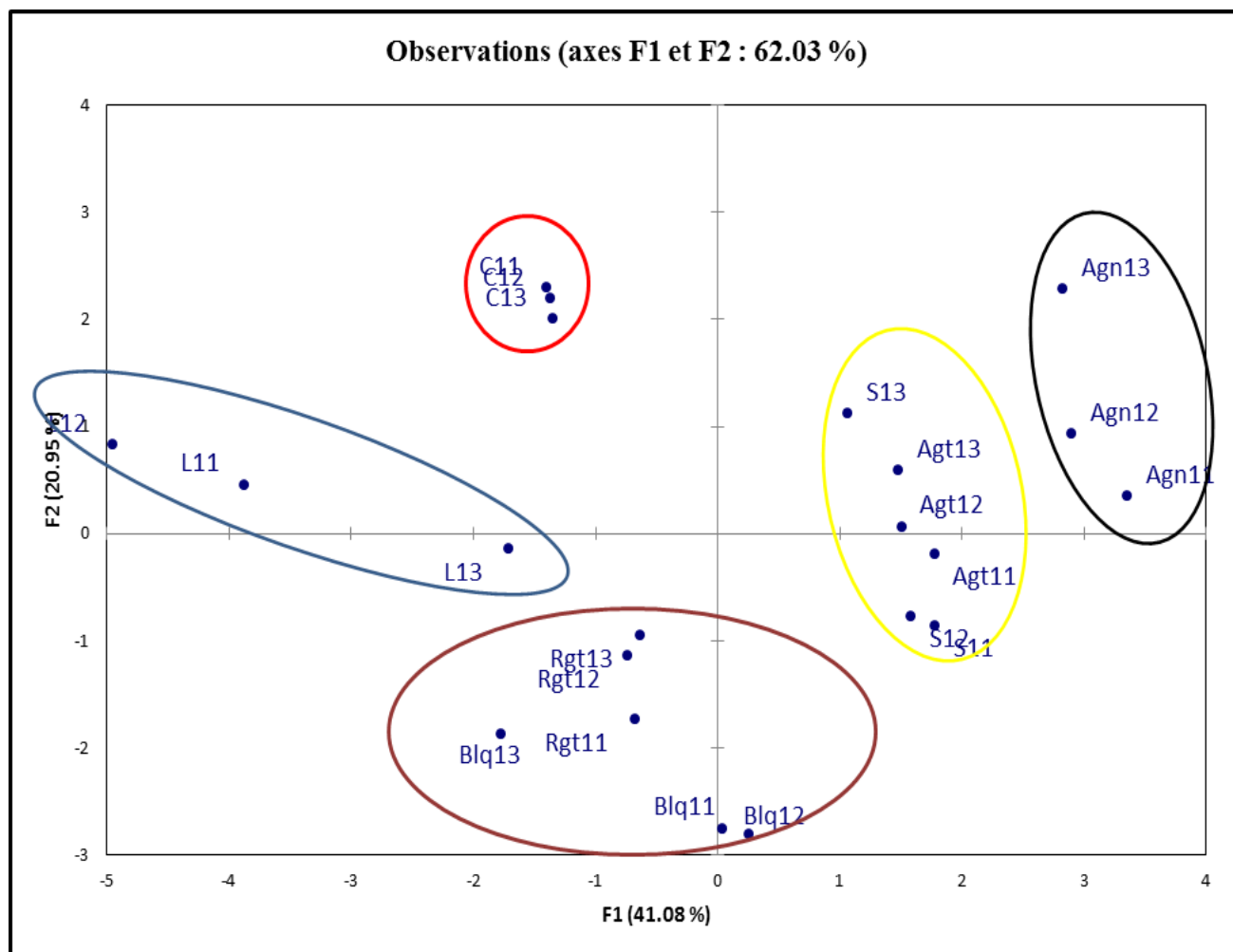


Figure N°15 : Projection des cultivars sur le plan factoriel (1-2)

D'après la figure N°15 et selon le plan factoriel (1-2), il semble se dégager 5 groupes de cultivars qui sont comme suit :

- ✓ Groupe 1 : avec un seul cultivar « *Chemlal* »,
- ✓ Groupe 2 : avec un seul cultivar « *Limli* »,
- ✓ Groupe 3 : regroupe deux cultivars « *Blanquette de Guelma et Rougette de Mitidja* »,
- ✓ Groupe 4 : inclut deux cultivars « *Agchren de titest, et Sigoise* »,
- ✓ Groupe 5 : représenté par un cultivar unique « *Aguenaou* ».

Une dernière représentation graphique de l'ACP et le « Biplot » qui permet la projection simultanée des cultivars et des caractères morphologiques sur le plan factoriel 1-2 (Figure N°14).

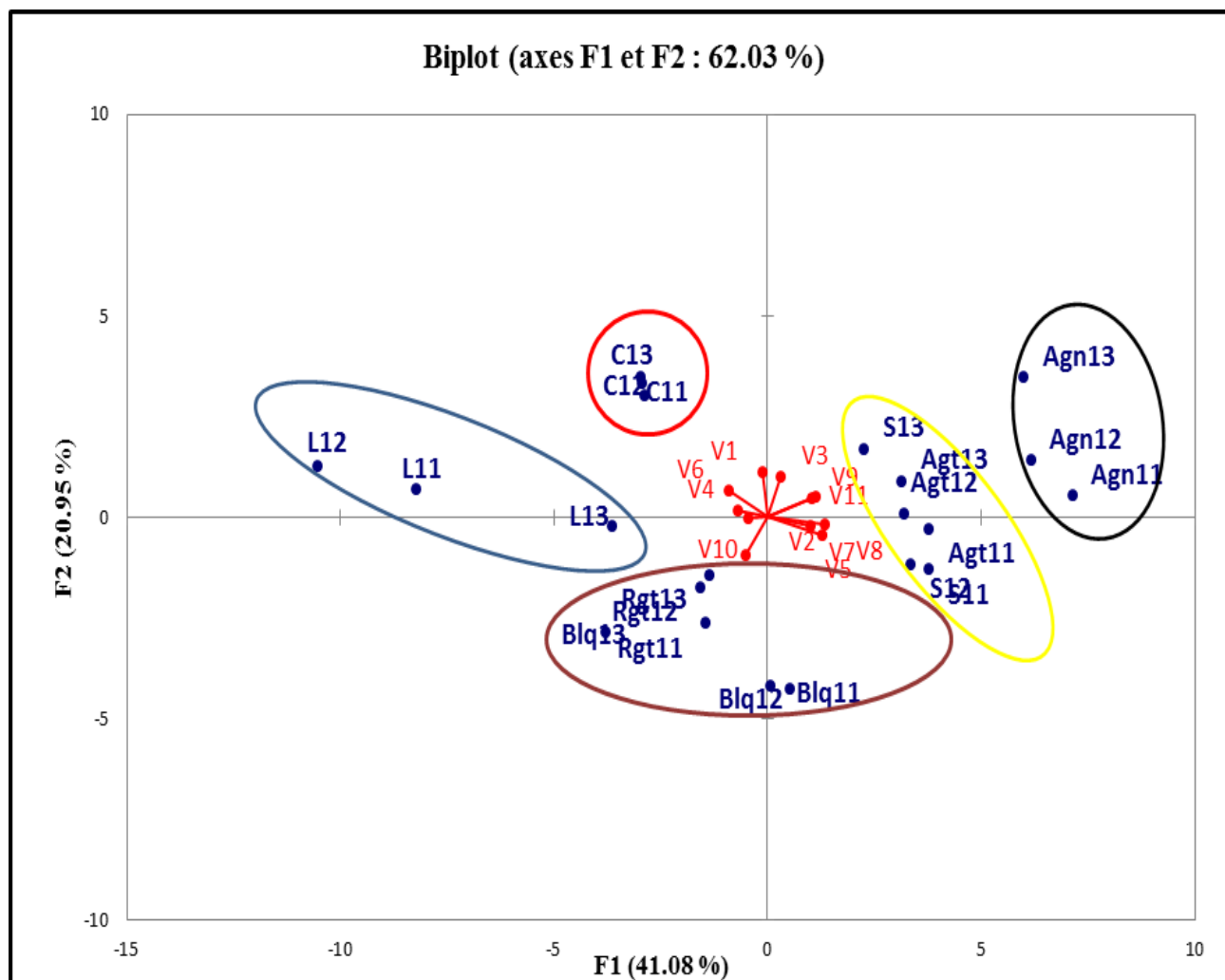


Figure N°16 : Projection en biplot (cultivars-caractères morphologiques) sur le plan factoriel 1-2

A travers la figure N°16 nous remarquons que les cultivars sont dispersés sur le plan ce qui signifie qu'il existe une importante diversité entre eux. La répartition de ces cultivars sur le plan est une preuve de leur distance dans l'espace, donc de leur distinction par rapport aux caractères évalués. Et sur cette base, nous pouvons dégager les groupes homogènes suivants :

- ✓ **Groupe 1 "Chemlal" :** un cultivar caractérisé par de longues feuilles de forme elliptique-lancéolée, un fruit de poids réduits et une forme spécifique allongé.
- ✓ **Groupe 2 "Limli" :** caractériser par un rapport (L/l) plus au moins important de l'endocarpe qui lui confère une forme elliptique, une importante longueur des feuilles et des fruits et donc un rapport (L/l) élevé. Ce cultivar se distingue par des feuilles de

forme elliptique avec une largeur élevée, des fruits allongée et des endocarpes de poids moyen.

- ✓ **Groupe 3 "Blanquette de Guelma et Rougette de Mitidja"** : les cultivars de ce groupe sont caractérisés par un rapport (L/l) élevé de l'endocarpe et donc une forme allongée.
- ✓ **Groupe 4 "Agchren de titest, et Sigoise "** : caractériser par des fruits de poids moyen et de forme ovoïde. Une deuxième caractéristique est la forme elliptique et le poids élevé de l'endocarpe.
- ✓ **Groupe 5 "Aguenaou"** : le nuage formé par les individus de ce cultivar s'étire vers le côté positif de l'axe 1. Ce cultivar se distingue par des feuilles de forme elliptique lancéolée, d'un endocarpe de poids élevé et d'une largeur réduite.

2.4 La classification ascendante hiérarchique (CAH)

Les méthodes de regroupement permettent de mettre en évidence des différences ou des ressemblances entre les cultivars. Il existe de nombreuses techniques statistiques visant à partitionner une population en différentes classes ou sous-groupes. La *classification ascendante hiérarchique (CAH)* est l'une d'entre elles. C'est une méthode qui cherche à ce que les individus regroupés au sein d'une même classe (homogénéité intra-classe) soient le plus semblables possibles tandis que ceux des autres classes sont le plus dissemblables (hétérogénéité interclasse). Mais il apparaît qu'en matière de classification de moyennes, les résultats obtenus dans l'ensemble sont peu dépendants des méthodes utilisées (DAGNELIE, 2006). En fait, la CAH rassemble nos cultivars de manière itérative afin de produire un *dendrogramme* ou *arbre de classification*. La classification est *ascendante* car elle part des observations individuelles ; et est *hiérarchique* car elle produit des classes ou groupes de plus en plus vastes, incluant des sous-groupes en leur sein. En découpant cet arbre à une certaine hauteur choisie, on produira la partition désirée.

Les résultats de la classification ascendante hiérarchique avec la méthode UPGMA des données morphologiques sur base de la distance euclidienne, produisent deux dendrogrammes, le premier présente les groupes obtenus, le second présente comment les 7 cultivars sont regroupés au sein des groupes obtenus. Le premier dendrogramme regroupe les 7 cultivars dans trois principales classes phénotypiquement liées comme représenté sur la figure N°17 (C₁, C₂ et C₃). Il montre non seulement les liaisons entre les trois classes obtenues mais aussi la hauteur des branches nous indique leur niveau de proximité.

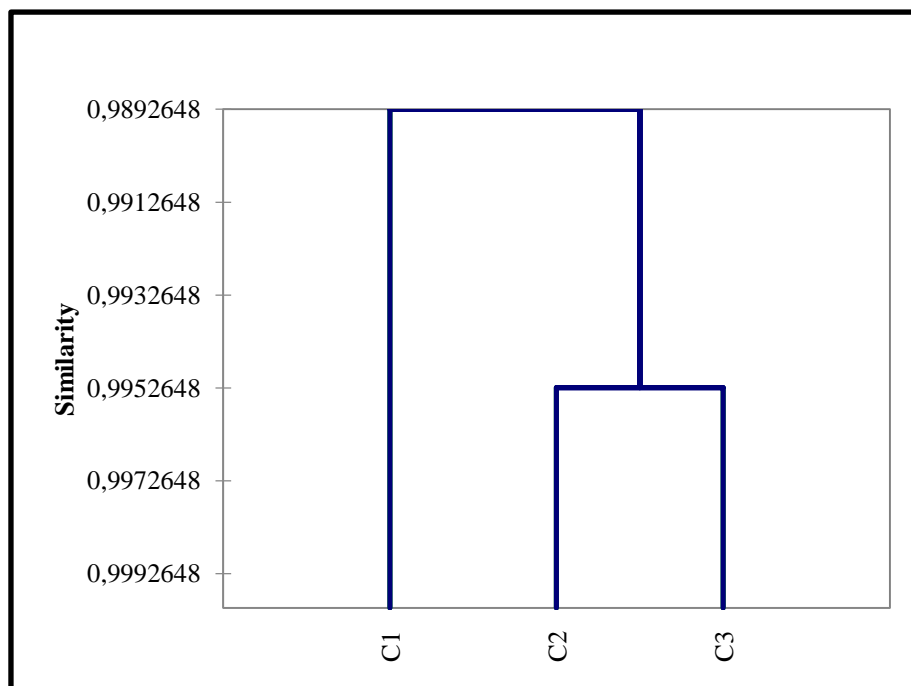
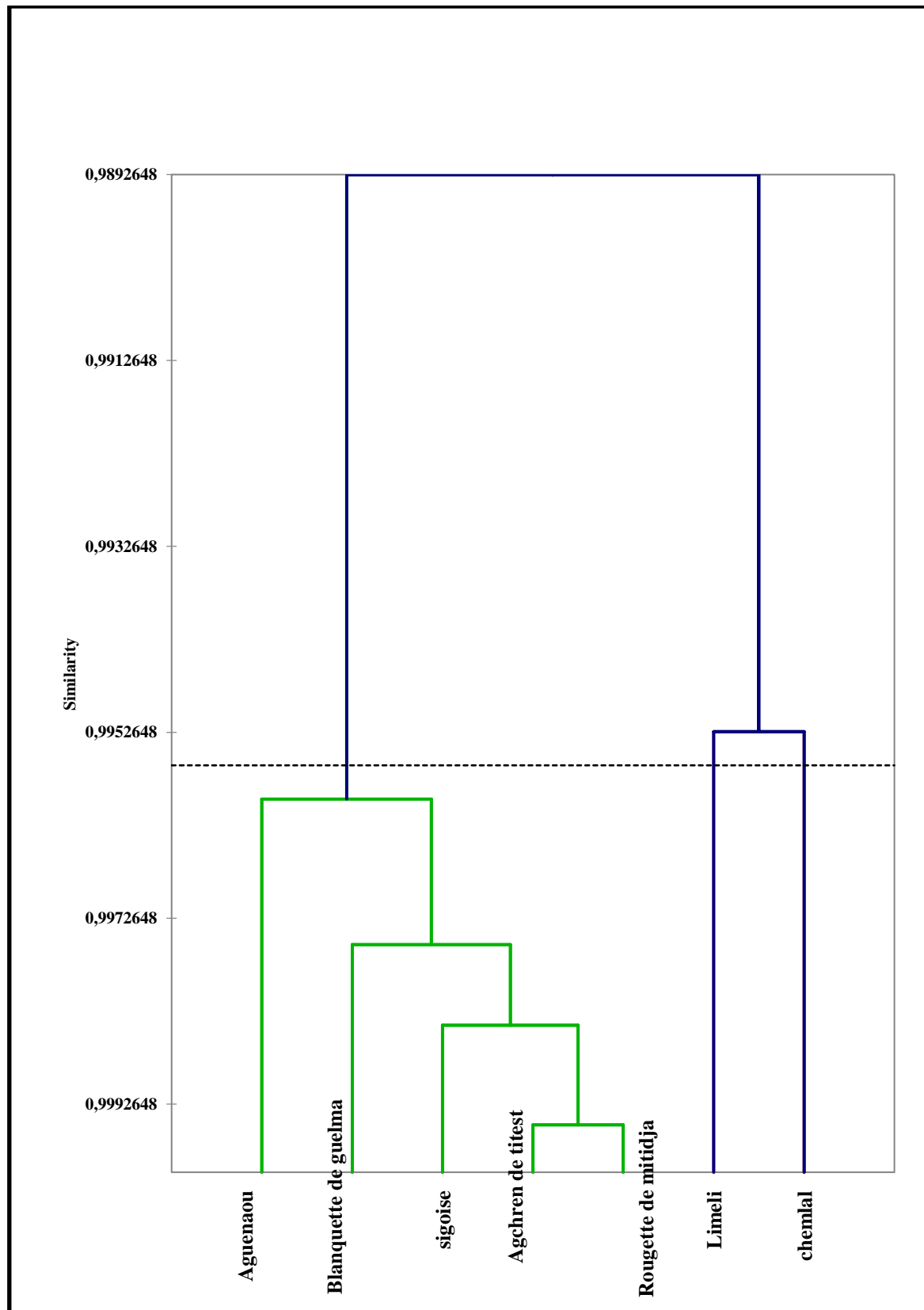


Figure N°17 : Dendrogramme du regroupement en 3 principales classes

Le deuxième dendrogramme dans la figure N° 18 permet de visualiser la composition des trois précédents groupes avec des niveaux de similitude (coefficient de corrélation de Pearson) variant de 0,983 à 0,999. La 1^{ère} classe comporte 5 cultivars *Agchren de titest* (double aptitude), *Aguenaou* (double aptitude), *Blanquette de Guelma* (huile), *Sigoise* (double aptitude) et *Rougette de Mitidja* (huile) qui sont caractérisés par des fruits et des endocarpes de grandes tailles.

La 2^{ème} et 3^{ème} classe sont constituées par un seul cultivar : *Limeli* et *Chemlal* respectivement caractérisés par de longues feuilles, des fruits et des endocarpes de petites tailles est tous les deux destinées pour la production d'huile d'olive.



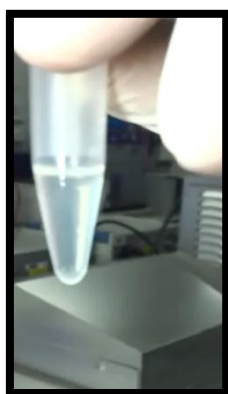
FigureN°18 : Dendrogramme pour les 7 cultivars par la méthode CAH

II. Caractérisation moléculaire

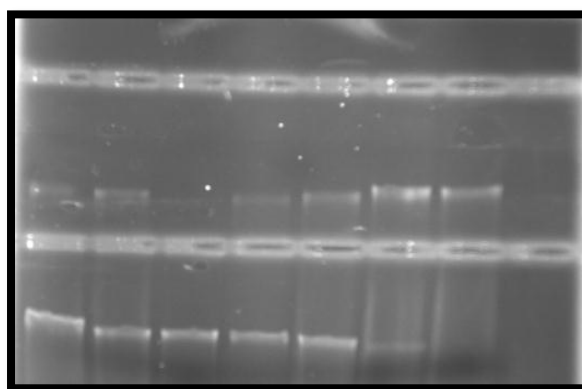
1. Extraction de l'ADN génomique de l'olivier

Les feuilles d'olivier sont particulièrement riches en carbohydrates. La matière organique est constituée par des protéines, des lipides, des monomères et polymères phénoliques (tel que les tannins) et principalement par des polysaccharides (tel que cellulose, hémicelluloses). Cette composition rend difficile l'isolement de l'ADN. Raison pour laquelle nos premières intentions et efforts ont été concentrés pour l'adoption de la meilleure méthode d'extraction susceptible de donner une bonne qualité d'ADN utilisable comme matrice pour divers actions PCR. Pour ce faire, trois différentes techniques d'extraction de l'ADN génomique, dont certaines sont très connues, ont été testées.

Le protocole de Dellaporta et al., (1983) et de CTAB(Doyle et Doyle, 1987) sont très efficaces et communément utilisées pour extraire l'ADN génomique de plantes (Corniquel et al., 1994 ; Khadari et al., 1994 ; Dwivedi al., 2001). Vu le soucis de la disponibilité du matériel végétale (emplacement de la collection) et à l'issue des essais, la méthode adoptée et celle développée par Benbouza et al., (2006), qui est une optimisation de la méthode CTAB dont les principales modifications concernent la précipitation de l'ADN à -20 °C, l'incubation à 60 °C de l'ADN re-suspendu dans une solution TE et la centrifugation à 4 °C pour toutes les étapes d'extraction. La méthode améliorée est relativement rapide, peu coûteuse et donne des rendements moyens réguliers (60-1000 ng/μl) en ADN de bonne qualité. Le protocole a été utilisé avec succès sur des feuilles séchées à 25°C pendant 5 jours.



Solution d'ADN



Qualité de l'ADN sur gel d'agarose 0,85%

Les résultats dans le tableau (20) témoignent de l'efficacité et la rentabilité du protocole de Benbouza et al., (2006). Selon le même tableau, plus de 90% d'extrait d'ADN des différents cultivars, ont enregistré une valeur du rapport ADN/protéines supérieur à 1,9 d'où une très bonne qualité d'ADN. La plus grande quantité (1077ng/μl) a été extraite des feuilles du cultivar

Bouchouke Soummame, tandis que la plus faible (70 ng/μl) a été obtenue avec celle de Takesrit.

Tableau 20 : Qualité et quantité de l'ADN à partir des feuilles sèches utilisant le protocole de Benbouza et *al.*, 2006

Cultivar	Quantité de l'ADN (ng/μl)	Rapport DO₂₆₀/DO₂₈₀
Abani	314	1,92
Aeleh	619	1,83
Aghchren del ousseur	175	1,85
Aghchren de titest	396	1,94
Aghenfas	776	1,98
Aguenaou	660	1,95
Azerdaj	546	1,73
Beskri	358	1,95
Blanquette de Guelma	601	1,93
BouchoukeSoummame	1077	1,97
Bouichret	378	1,96
Chemlal	413	1,86
Ferdel	213	1,93
Ferkani	387	1,96
Gelb al faroudje	206	1,88
Limli	404	1,86
Rougette de Mitidja	335	1,90
Sigoise	98	1,91
Sofiana	337	1,86
Souidi	869	1,97
Takesrit	70	1.80
Tefah	848	1,98
Telthi	211	1,97

2. Mise au point et optimisation de la réaction d'amplification en chaîne par polymérase (PCR/SSR)

La qualité de l'ADN extraite joue un rôle important dans la réussite de son amplification par PCR. Grâce au bon rendement en qualité et en quantité d'ADN obtenu, la phase de la mise au point de différentes techniques d'amplification via PCR, a été très réduite. D'emblée, les tests réalisés par l'utilisation des programmes du cycle thermique de Carriero *et al.*, (2002) pour 5 amorces (GAPU 101, GAPU 103A, GAPU71A, GAPU71B et GAPU59), Cipriani *et al.*, (2001) pour 4 amorces (UDO99-012, UDO99-028, UDO99-039 et UDO99-043) et Sefc *et al.*, (2000) pour 2 amorces (DCA9 et DCA18) avec 25ng d'ADN, ont été concluants. Toutefois, les bandes obtenues ont été de faible intensité nécessitant ainsi l'optimisation de certains paramètres de la réaction PCR. En effet, une bonne résolution des bandes et une réponse positive de toutes les amorces testées ont été réalisées après une optimisation de la réaction PCR. En grande partie, les paramètres liés à la quantité de la *Taq* ADN polymérase et des amorces. En fin, les amorces testées lors de cette phase de mise au point, se sont avérées très polymorphes (Figure N°19).

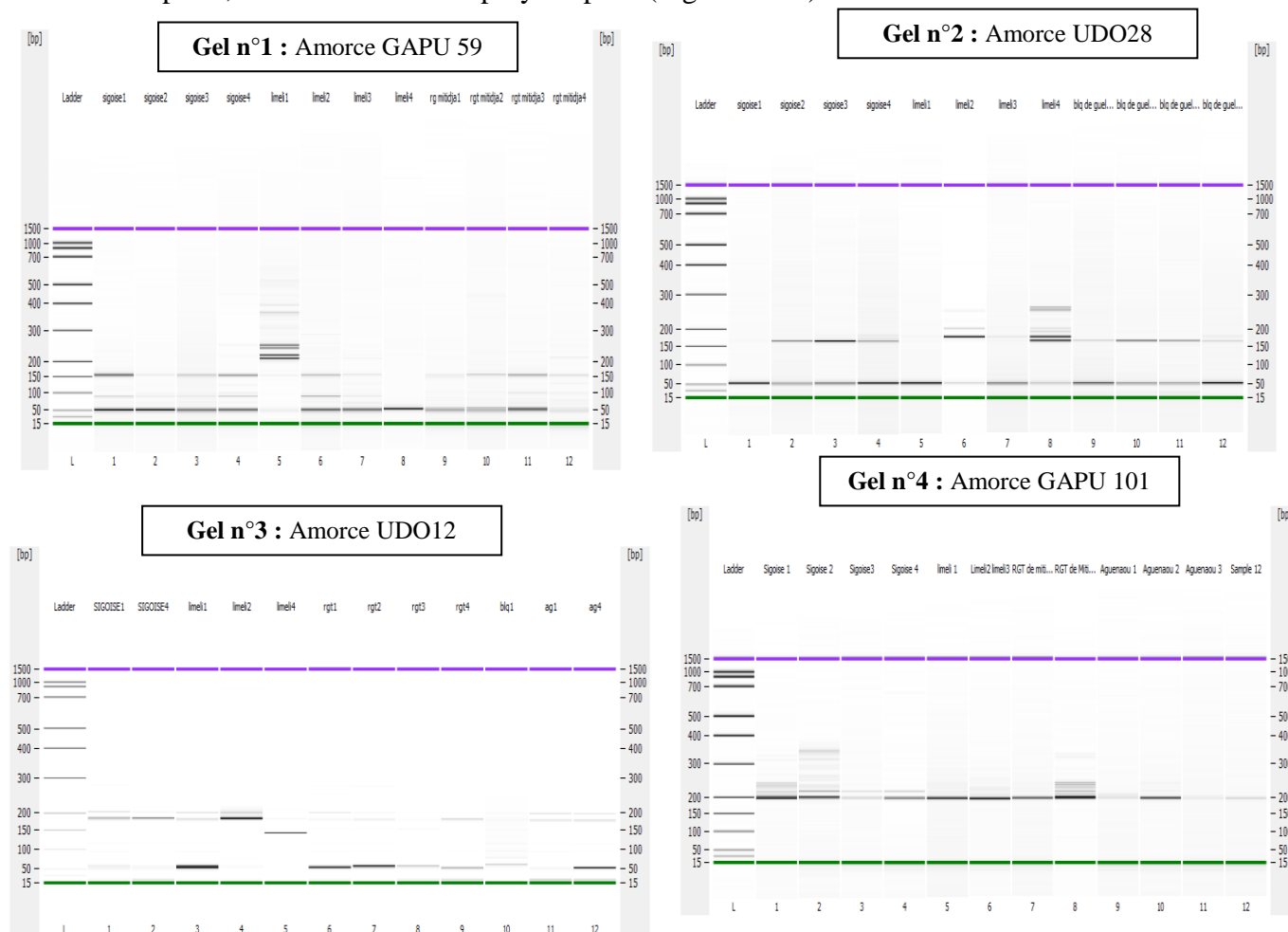


Figure N°19 : Profils génomique SSR générés par les amorces GAPU59, UDO28, UDO 12 et GAPU 101

3. Caractérisation des amorces SSRs

3.1 Evaluation du polymorphisme des SSRs

3.1.1 Analyse de la diversité des marqueurs

Les 11 amorces utilisées ont généré des profils polymorphes, avec des fragments reproductibles pour les 26 cultivars. Un total de 129 allèles a été amplifié avec une moyenne de 11 allèles par locus allant de 6 pour GAPI59 à 21 pour GAPI103A (Tableau 21). Parmi les 129 allèles amplifiés, 45 sont des allèles privés, où le locus UDO43 a enregistré le plus grand nombre d'allèles privés sur les 26 cultivars. Des analyses précédentes de diversité sur l'olivier cultivées rapportent des moyennes semblables à nos résultats, parmi eux on peut citer :

- ✓ Haouane et *al.*, 2011 : travail sur la collection mondiale de Marrakech : moyenne de 17,5 allèles par locus,
- ✓ Truillo et *al.*, 2013 : travail sur la collection mondiale de Cordoba, Espagne avec une moyenne de 14,12 allèles par locus,
- ✓ Diez et *al.*, 2014 : analyse de cultivars provenant de 21 pays : moyenne de 16,64 allèles par locus,
- ✓ Yoruk et *al.*, 2014 : résultats d'analyse sur des cultivars turque : moyenne de 18,8 allèles par locus,
- ✓ Chalak et *al.*, 2014 : analyse de cultivar du Liban : moyenne de 10,9 allèles par locus,
- ✓ Muzzalupo et *al.*, 2014 : analyse de cultivars Italiens : moyenne de 7,6 allèles par locus.

Tableau 21 : Paramètres génétiques pour les 11 marqueurs SSRs

Locus SSR	N	NDC	Ng	PD	Fis	Fit	Fst	R
GAPI 101	12	2	18	0,896	-0,297	0,361	0,507	0,131
GAPI 103A	21	7	30	0,934	-0,723	0,144	0,503	0,037
GAPI 71 B	11	4	19	0,876	-0,732	-0,090	0,370	0,002
GAPI 59	6	2	6	0,368	-0,33	0,289	0,466	0
GAPI 71A	8	2	11	0,860	-1	0,814	0,907	0,176
UDO 12	9	2	13	0,845	0,071	0,823	0,809	0,222
UDO 43	15	7	18	0,868	-0,591	0,269	0,541	0,077
UDO 39	11	4	16	0,804	-0,315	0,707	0,777	0,141
UDO 28	11	2	15	0,887	-0,942	-0,024	0,473	0
DCA 9	15	6	22	0,922	-0,511	0,442	0,640	0,019
DCA 18	10	2	14	0,869	-0,297	0,792	0,694	0,221
Moyenne	11	/	/	/	-0,519	0,412	0,608	/

N : le nombre d'allèles détectés, NDC : le nombre de cultivars distingués, Ng : le nombre total de génotypes, PD : le pouvoir de discrimination, Fis : différenciation à l'intérieur des populations, Fit : différenciation des individus par rapport au total, Fst : variance standardisée, R : fréquence des allèles nul.

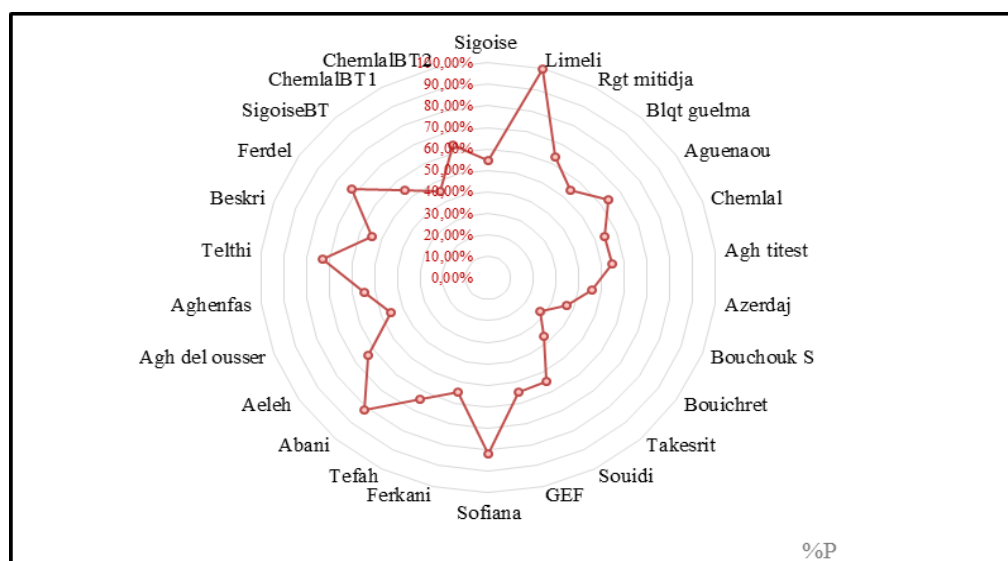
La taille des allèles obtenus varie de 102 pb pour GAPU103A à 248 pb pour GAPU71A, alors que, les fréquences varient de 0,038 pour l'allèle 199pb au locus UDO43, jusqu'à un maximum de 0,91 pour l'allèle 156 pb au locus GAPU59 (tableau 22). A noter que l'allèle 156 pb au locus GAPU59 est présente en une copie dans l'ensemble des cultivars étudiés à l'état homozygote (Tableau 22). Les plus faibles fréquences allélique sont enregistré pour les loci ayant amplifié un nombre élevée d'allèles, parmi eux on a le locus GAPU103A, par exemple on a un allèle unique d'une taille de 136bp observé uniquement chez le cultivar Aeleh (FigureN°17). La diversité génétique d'un locus donné est exprimée également par le **PD** (Power of discrimination) lui-même calculé, par la formule décrite par Tessier et *al.*, 1999. La valeur **PD** donne une estimation du pouvoir discriminant d'un locus en prenant compte le nombre de génotype et aussi de la fréquence de chacun. Les valeurs de **PD** vont de 0 à 1, les valeurs **PD** son repris dans le tableau 22. Nous avons une valeur moyenne de 0,836 avec un minimum de 0,368 pour le locus GAPU59 et 0,93pour le locus GAPU103A.

3.1.2 Diversité intra-cultivars

Les paramètres de diversité intra-populations ont été calculés, ils sont montrés dans le tableau 22, 23 et la figure N°18.

✓ Le pourcentage de loci polymorphes (P)

Le taux du polymorphisme des loci varie de 27%, chez le cultivar *Bouichret* à 100% chez le cultivar *Limeli*, avec une moyenne de 58% pour l'ensemble des 26 cultivars étudiés (Figure N°20). Le taux de polymorphisme varie en fonction de la taille de l'échantillon analysé, les allèles de faibles fréquences peuvent être facilement observés dans des échantillons de grande taille. Ce paramètre n'est donc pas un bon indicateur de la variabilité allélique (Nei, 1987).



FigureN°20 : Pourcentage des loci polymorphes

Tableau 22 : Taille et fréquence allélique pour les 11 SSRs analysés sur l'ensemble des 26 cultivars d'oliviers

Locus	Alleles sizes and frequencies																				
GAPU 101	190 0,167	194 0,083	196 0,368	198 0,450	200 0,330	202 0,180	204 0,280	206 0,140	208 0,101	212 0,083	218 0,212	222 0,131									
GAPU103A	102 0,125	110 0,167	114 0,125	136 0,167	138 0,125	143 0,340	146 0,26	148 0,150	150 0,22	152 0,21	154 0,063	156 0,225	159 0,438	162 0,167	164 0,140	166 0,125	172 0,102	175 0,250	182 0,09	189 0,188	192 0,146
GAPU 71 B	114 0,250	116 0,083	120 0,420	123 0,290	124 0,125	126 0,380	128 0,063	130 0,220	138 0,140	140 0,190	142 0,063										
GAPU 59	156 0,910	206 0,083	210 0,094	212 0,073	220 0,083	222 0,146															
GAPU 71A	210 0,438	212 0,167	214 0,622	217 0,525	227 0,318	234 0,375	242 0,460	248 0,333													
UDO 12	160 0,125	162 0,333	166 0,439	168 0,351	170 0,375	174 0,125	176 0,125	180 0,553	182 0,377												
UDO 43	142 0,083	152 0,400	154 0,312	156 0,307	166 0,375	168 0,456	170 0,389	172 0,116	174 0,167	178 0,083	188 0,083	199 0,038	208 0,083	216 0,167	218 0,125						
UD0 39	122 0,520	124 0,558	126 0,500	174 0,417	177 0,187	207 0,063	209 0,125	213 0,875	217 0,285	228 0,125	230 0,249										
UD028	145 0,167	156 0,257	169 0,250	180 0,231	182 0,174	184 0,500	185 0,278	186 0,276	200 0,308	202 0,288	204 0,279										
DCA 9	158 0,375	165 0,083	168 0,160	170 0,395	172 0,167	179 0,125	180 0,500	183 0,500	188 0,232	189 0,167	190 0,256	192 0,169	194 0,175	199 0,125	204 0,400						
DCA18	168 0,167	172 0,286	174 0,100	175 0,385	177 0,336	178 0,476	179 0,271	181 0,350	185 0,104	187 0,312											

✓ *Le nombre d'allèles par locus (N_a) et le nombre d'allèles effectif (N_e)*

Une autre mesure de la variabilité est la moyenne du nombre d'allèles par locus (N_a). De plus, pour déterminer la fréquence de ces allèles, pour un locus et un taux d'hétérozygotie donnés, on définit le nombre d'allèles efficaces (N_e), maintenus dans une population d'effectif N , comme le nombre théorique d'allèles possibles dans une population de même taille et de même hétérozygotie à l'état stationnaire, mais dans laquelle tous ces allèles auraient la même fréquence (Kimura et Crow, 1964). On remarque que le nombre efficace d'allèles est plus faible que le nombre réel (sauf dans le cas où ceux-ci ont des fréquences alléliques égales). Dans ce cas, le nombre efficace d'allèles (N_e) est égal au nombre réel d'allèles. Dans une situation de consanguinité, les fréquences vont se déséquilibrer, un allèle étant favorisé par hasard au détriment des autres. Le nombre efficace d'allèles sera alors inférieur au nombre réel.

Nos résultats montrent (Tableau 23), une grande homogénéité des indices de diversité intra-population. Selon le locus, le nombre moyen d'allèles varie de 1,077 à 2,346, tandis que le nombre efficace d'allèles varie de 1,077 à 2,259. De plus, on constate que le nombre d'allèles détectés (N) et le nombre de cultivars distingués (NDC) semblent être corrélés positivement, cependant les valeurs élevées du pouvoir de discrimination (PD) ne conduisent pas forcément à un nombre de cultivars distingués élevé.

Tableau 23 : Paramètres de diversité intra-cultivars

Locus SSR	N_a	N_e	I	H_o	H_e
GAPU 101	2,077	1,948	0,637	0,551	0,425
GAPU 103A	2,346	2,259	0,718	0,779	0,452
GAPU 71 B	2,346	2,200	0,774	0,885	0,51
GAPU 59	1,308	1,201	0,158	0,135	0,10
GAPU 71A	1,077	1,077	0,107	0,154	0,07
UDO 12	1,423	1,375	0,239	0,144	0,155
UDO 43	1,885	1,802	0,520	0,548	0,344
UDO 39	1,346	1,245	0,254	0,231	0,175
UDO 28	2,000	1,979	0,651	0,885	0,456
DCA 9	1,769	1,686	0,475	0,503	0,324
DCA 18	1,615	1,559	0,376	0,551	0,425
Moyenne	1,745	1,666	0,446	0,488	0,312

N_a : nombre d'allèle différents, **N_e** : nombre d'allèle effective

I : Indices d'information de Shannon

H_o : Hétérozygotie observé, **H_e** : Hétérozygotie observé

✓ L'indice de diversité de Shannon (I)

L'indice de Shannon est un indice d'abondance basé sur la diversité spécifique, plus il est grand, moins les populations sont homogènes. Il permet de décrire, avec d'autres, la structure d'une population. Tous les groupes de notre étude présentent un indice de diversité de Shannon inférieur à 1, ce qui indique que tous les groupes d'accessions ont une tendance à l'homogénéité (figure N°21).

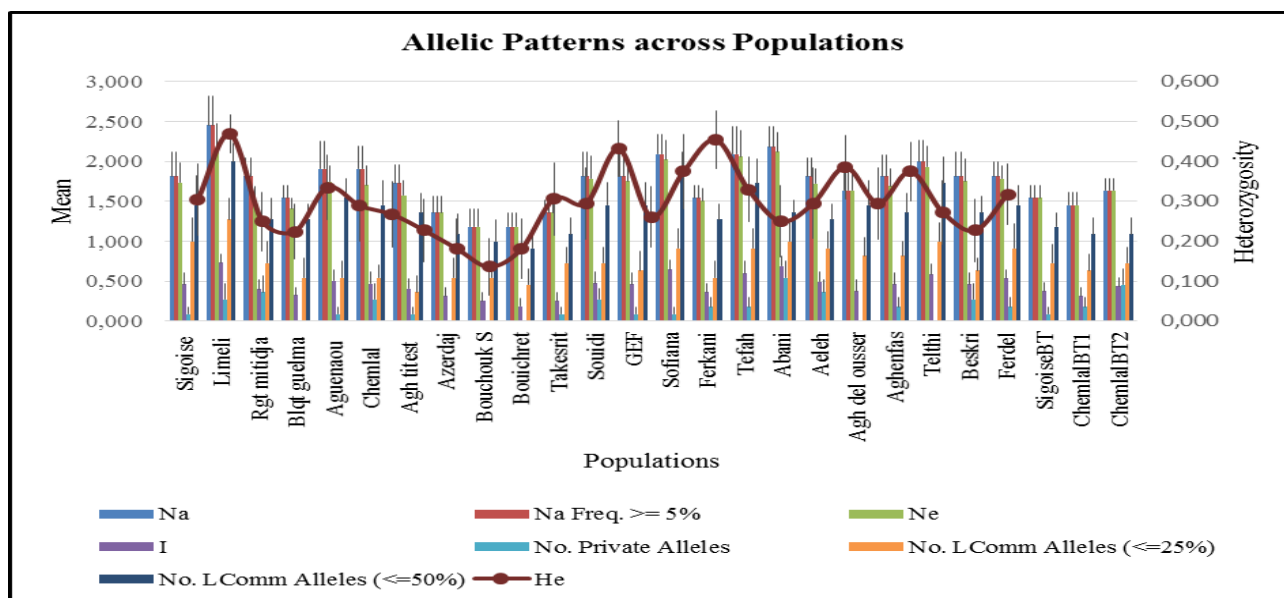


Figure N° 21 : Représentation graphique des différents indices génétiques

✓ L'hétérozygotie observée (H_o) et l'hétérozygotie attendue (H_e)

L'indice H_o représente l'hétérozygotie observée, alors que H_e représente l'hétérozygotie attendue tous les deux mesuré à partir des analyses génotypiques. L'hétérozygotie attendue (H_e) varie de 0,07 pour le locus GAPIU71A à 0,51 pour le locus GAPIU71B, avec une moyenne de 0,312 (Tableau 23). Pour l'hétérozygotie observée (H_o) on a un minimum de 0,135 pour le locus GAPIU59 et un maximum de 0,885 pour le locus GAPIU71B et une moyenne de 0,488. En comparant ces deux indices il est possible de déduire l'impact des forces évolutives dans les populations dues à l'autofécondation ou à l'autogamie.

Il ressort de nos résultats, une concordance entre l'hétérozygotie observée (H_o) et l'hétérozygotie attendue (H_e) où les valeurs les plus élevées sont enregistrées chez GAPIU103A, GAPIU71B et UDO28, tandis que GAPIU59 et GAPIU71A ont eu les valeurs les plus faibles. Nous avons constaté aussi que l'hétérozygotie observée est supérieure à 0,550 pour les quatre loci (GAPIU 101, GAPIU 103A, GAPIU71B et, UDO28) ce qui indique une importante diversité dans nos échantillons. Les valeurs de l'hétérozygotie observée (H_o) plus élevée que

l'hétérozygotie attendue (H_e), révélant un excès d'hétérozygoties et qui peut s'expliquer par une origine multi parentales des cultivars analysées.

Le calcul des fréquences des allèles nuls, avec le logiciel FREENA (Chapuis et Estoup, 2007) a été utilisé dans le but d'ajuster les estimations de l'indice de fixation. Les valeurs supérieures à 0,20 ont été considérées comme un seuil au-delà duquel la signification de l'hétérozygotie attendue sera sous-estimée (Chapuis et Estoup 2007). Tous les loci ont donné des valeurs acceptables à l'exception des deux loci UDO12 et DCA18 (Tableau 21).

3.1.3 Diversité génétique inter-cultivars

Pour décrire la diversité génétique entre les cultivars nous avons utilisé dans la présente étude trois paramètres.

✓ *F-statistiques de Wright*

Ils permettent de connaître la structure génétique d'une espèce grâce à l'estimation, d'une part, de la fixation des allèles dans l'ensemble des populations (F_{it}) et à l'intérieur des sous populations (F_{is}) et d'autre part grâce à l'estimation de la différenciation génétique entre les sous-populations (F_{st}). Ces statistiques de Wright ont été calculées pour chaque locus est sont mentionnée dans le tableau 22.

Le F_{is} dénommé aussi indice de fixation et appelé auparavant coefficient de consanguinité (Wright, 1969), il reflète la différenciation des individus à l'intérieur des populations, nous pouvons expliquer nos résultats comme suite :

- $F_{is} = 1$ signifie fixation complète (cas d'autofécondation),
- $F_{is} = 0$: population en équilibre de Hardy-Weinberg.
- $F_{is} < 0$: hétérozygotie excédentaire.

Donc d'après les résultats dans le tableau 22, nous avons un excès d'hétérozygotie vue les valeurs négatives obtenus à l'exception d'UDO 12 avec une valeur de 0,071. Ce qui signifie un faible taux de consanguinité entre les cultivars analysées.

Un autre indice le F_{st} qui correspond à la séparation génétique entre cultivars. Cet indice mesure la réduction relative des hétérozygotes, lié aux différences alléliques entre sous-populations. C'est un indice de diversification des populations. Si les sous-populations sont identiques, $F_{st} = 0$. D'après Wright, 1978 :

- $0 < F_{st} < 0,05$: différenciation faible,
- $0,05 < F_{st} < 0,15$: différenciation modérée,
- $0,15 < F_{st} < 0,25$: différenciation importante,
- $F_{st} > 0,25$: différenciation très importante.

Dans notre étude, la différenciation génétique moyenne (0,608) est très forte. Enfin, le F_{it} est le coefficient global de la consanguinité. Il reprend les effets de la consanguinité intra-cultivar et de la subdivision inter-cultivar

3.2 Classification et identification des profils génétiques

La combinaison des 129 allèles amplifiés par les 11 SSR a permis de distinguer les 26 cultivars analysés. Les données obtenues ont confirmé que les profils génotypiques des SSR permettent une identification sans ambiguïté de tous les cultivars. Par contre, aucun des SSR utilisés à lui seul n'était capable de différencier tous les cultivars. L'association des profils des trois amorces : GAPU103A, UDO43 et DCA9 a permis la séparation de 77% des cultivars étudiés. En fait, 7 cultivars ont été identifiés grâce au profil obtenu par GAPU103A et UDO43 et 6 cultivars ont été différenciés par DCA9. Au total de 23 allèles privés ont été amplifiés, avec une variation allant d'un allèle pour le locus GAPU101 et GAPU71A, à 11 allèles pour le locus UDO43. D'après nos résultats et en examinant le nombre des génotypes (Tableau 22), nous constatons 6 génotypes pour le locus GAPU59 avec la détection pour la 1^{ère} fois d'un nouveau allèle d'une taille de 156bp présent uniquement chez les cultivars algériens.

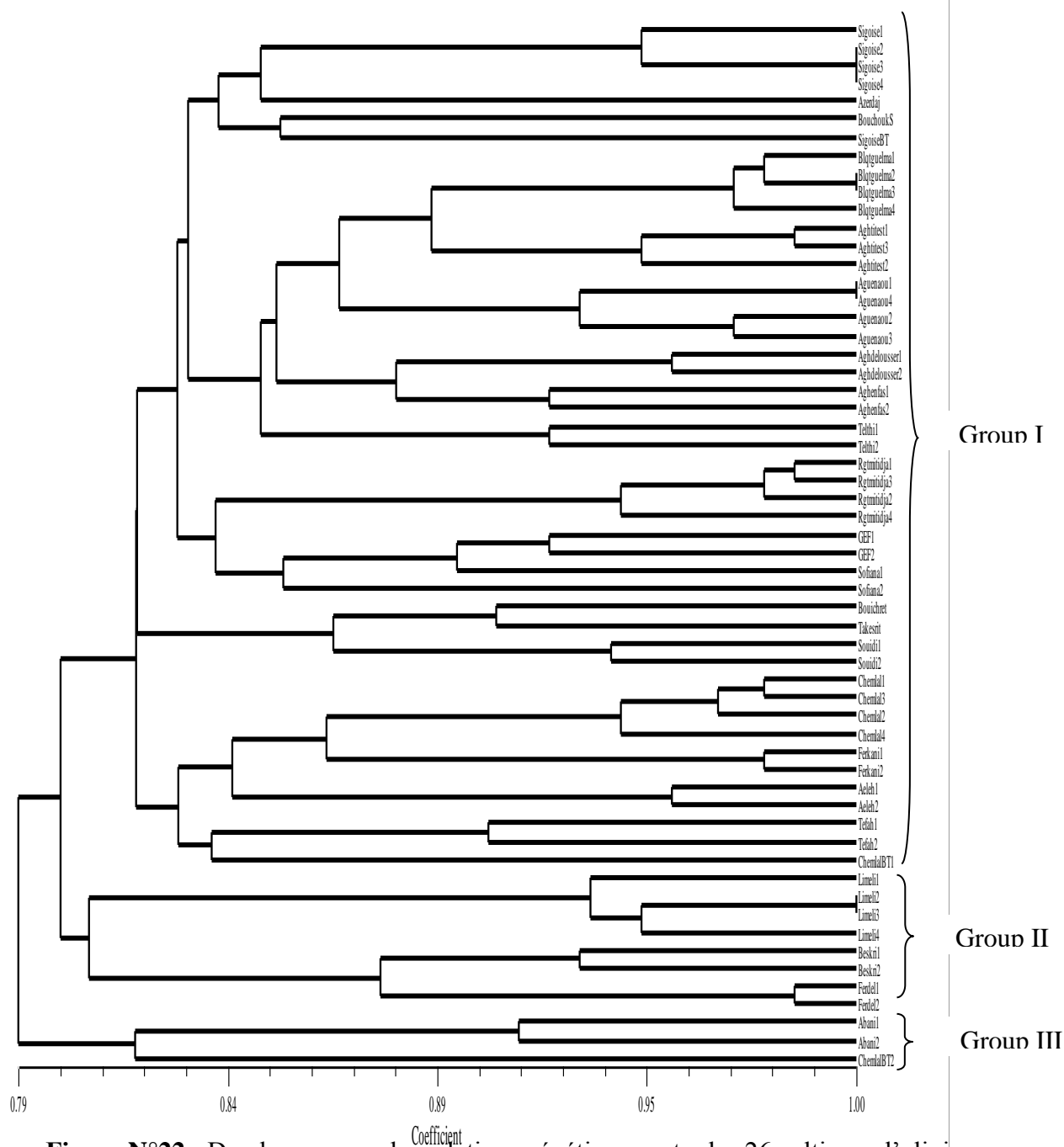
3.3 Structure génétique des cultivars d'olive étudiés

A. Méthode par estimation des distances génétique

Les données des microsatellites obtenues ont été utilisées pour évaluer les relations génétiques entre cultivars par le biais de l'estimation des distances génétiques. La méthode de mesure des distances la plus souvent utilisée est celle de la distance génétique standard de Nei (Nei, 1972). Afin de visualiser cette relation génétique entre les cultivars nous avons construit une phylogénie, en utilisant la méthode non pondérée du groupe de pair des moyennes arithmétiques (UPGMA). Le dendrogramme (Figure N°22), obtenu par la méthode UPGMA sur base d'une matrice de similarité élaborée avec le coefficient simple matching, a montré des grands niveaux de similitude entre les groupes, allant de 0,82 à 0,98, ce qui a permis de structurer les génotypes en 3 principaux groupes (Figure N°21). Le coefficient de corrélation cophenetic a donné une valeur significative, $r = 0,79$ ($P < 0.001$), entre le dendrogramme et la matrice originale expliquant le choix de l'indice simple matching (Annexe 8).

Le premier groupe comprend 47 arbres représentant 21 cultivars, subdivisés en trois sous-groupes : le premier composé de 13 cultivars destinés à la production d'huile ou à un double usage (huile et olive de table).

Les cultivars Bouichret, Takesrit et Souidi représentent le deuxième sous-groupe. Pour le 3^{ème} sous-groupe il est composé des cultivars Chemal (avec les 2 individus âgés de 30 et 300 ans), Ferkani, Aeleh et Tefah. Le deuxième groupe comprend deux sous-groupes, le premier sous-groupe est représenté par le cultivar Limeli, et le second sous-groupe inclus les cultivars Beskri et Ferdel. Le troisième groupe comprend uniquement 2 cultivars, Chemlal (un individu âgé de 2000 ans) et Abani qui sont des cultivars à production huilière.



B. Méthode de groupements bayésiens

L'analyse multidimensionnelle est la plus récemment utilisée, c'est une approche par groupements bayésiens qui a été utilisée pour l'analyse du mélange des données microsatellites des différents cultivars (Pritchard et *al.*, 2000). Cette classification bayésienne est appliquée afin de déduire le nombre d'unités génétiques (clusters) et leur délimitation spatiale. Elle utilise l'information génétique pour déterminer l'appartenance de population d'individus sans assumer les populations prédéfinies. De ce fait, ils peuvent affecter soit le cultivar ou une fraction de son génome sur la base de génotypes multilocus. Parmi les programmes qui utilisent les méthodes bayésiennes, nous avons optés pour STRUCTURE V. 2.3.3, (Pritchard et *al.*, 2000; Pritchard et *al.*, 2010) pour identifier le nombre de clusters (K) d'individus génétiquement similaires. L'analyse a été réalisée dans le cadre du modèle de mélange et de la corrélation entre les fréquences alléliques des cultivars étudiés. En utilisant le logiciel STRUCTURE, les estimations de log-vraisemblances des données ont été obtenues pour chacun des 20 runs indépendants pour chaque valeur K, allant de 1 à 20. Aucune information préalable n'a été utilisée pour définir les clusters. Le nombre le plus probable du cluster (K) de la collection de l'olivier a été évalué compte tenu du critère de plateau (Pritchard) et la distribution de Δk (méthode Evanno, Evanno et *al.*, 2005). Dans notre analyse, la moyenne log-vraisemblance de la courbe a atteint une valeur maximale autour $k = 9$ (Annexe 9), la cohérence entre les différentes simulations au sein de chaque k (parmi les 20 essais) a été évaluée et visualisée par le coefficient de similitude (Figure N°23).

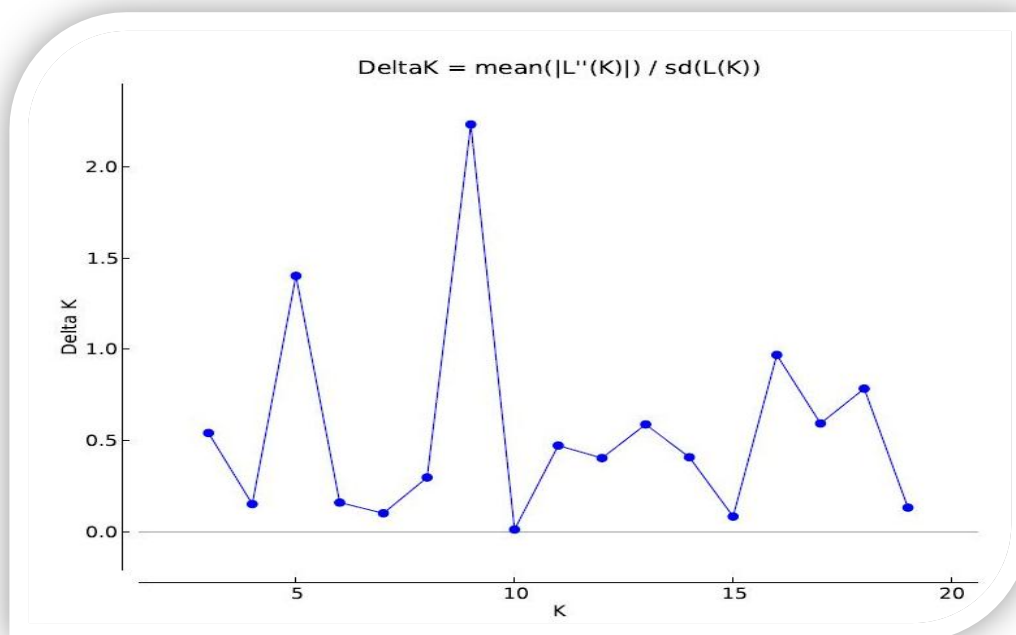


Figure N°23 : la relation entre K (nombre présumé de cluster) et delta K

L'analyse par groupement bayésien en utilisant le programme STRUCTURE, a permis la séparation de nos cultivars locaux d'oliviers en neuf pools génétiques (clusters) comme il est démontré dans la figure 23, avec une hétérozygotie observée allant de 0,33 à 0,705 avec une moyenne de 0,48 (Tableau 24). Le taux de polymorphisme reste élevé est varié de 81% dans les clusters 6 et 7 à 100% dans les clusters 3, 5 et 7. A noter, que le cluster 7 contient un unique cultivar « *Limeli* », enregistrant, ainsi, la valeur d'hétérozygotie observée la plus élevée avec 27 allèles amplifiés. Six des neuf indices de fixation (F_{is}) sont significativement différents de zéro (Tableau 24) avec des valeurs positives, indiquant ainsi un déficit d'hétérozygotie dû à une haute consanguinité entre les cultivars composant ces clusters avec la plus haute valeur positive pour le cluster 1 (2 cultivars) suivie du cluster 4 (avec 4 cultivars), cluster 3 (avec 4 cultivars), cluster 8 (avec 4 cultivars), cluster 2 (3 cultivars) et en dernier le cluster 5 (3 cultivars).

Tableau 24 : Paramètres génétiques pour les onze SSR estimés pour les 9 clusters identifiés par STRUCTURE

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7	Cluster 8	Cluster 9	Mean
P%	90,91%	90,91%	100,00%	90,91%	100,00%	81,82%	100,00%	90,91%	81,82%	91,92%
H_o	0,33	0,386	0,443	0,350	0,591	0,568	0,705	0,386	0,527	0,48
H_e	0,487	0,503	0,604	0,551	0,705	0,457	0,469	0,507	0,424	0,523
F_{is}	0,383	0,267	0,331	0,364	0,149	-0,243	-0,467	0,288	-0,106	0,107

P% : Taux du polymorphisme, **H_o** : l'hétérozygotie observée, **H_e** : l'hétérozygotie attendue, **F_{is}** : indice de fixation

En général, l'analyse par STRUCTURE reflète le regroupement UPGMA. Bien que, l'analyse bayésienne apporte plus d'importance à la structure génétique et prend plus en détail la comparaison entre les profils génétique obtenus que les résultats fournis par l'analyse de NTSY. Par conséquent, le mélange et la fragmentation des groupes génétiques ont été enregistrés. Nous avons observé que le groupe 7, avec la valeur la plus élevée d'hétérozygotie observée, inclus un seul cultivar, *Limeli*, qui a amplifié le plus grand nombre d'allèles (27 allèles) comparé à d'autres cultivars. En outre, les résultats de l'analyse avec STRUCTURE ont permis l'inférence des relations entre les cultivars étudiés et l'obtention de regroupement plus constant.

STRUCTURE a permis le regroupement des accessions en fonction de leur utilisation (Tableau 25, figure n°24). Le Cluster 4 et 8 avec un mélange de génotype tandis que le cluster 1 avec une constitution génétique homogène. Selon Besnard *et al.*, 2002, les oliviers sont propagés végétatif, le matériel génétique de la région de l'Ouest a été incorporé dans des cultivars locaux (Besnard *et al.*, 2002). Un des exemples trouvés dans notre étude et qui met en évidence cette théorie est le fait que le cultivar Sofiana est utilisé comme olive de table, alors qu'il est classé dans le cluster des cultivars à huile. Ceci est expliqué par le fait que Sofiana a été greffée sur le cultivar Chemlal, cultivar à huile par excellence.

Tableau 25 : Composition des clusters obtenus par le logiciel STRUCTURE

N° cluster	Cultivars	Utilisation
1	Rougette de Mitidja, Chemlal	Huile
2	Bouichret , Takesrit et Souidi	Huile
3	Gelb al faroudje, Sofiana, Ferkani et Tefah	Double/olive table/huile
4	Blanquette de guelma, Aguenau, Aghchren de titest et Telthi	Double usage
5	Abani, Aeleh et Chemla BT	Huile
6	Beskri et Ferdel	Olive de table
7	Limli	Huile
8	Azeardaj, Bouchouke soummam, Aghenfess et Aghchren del oussour	Double usage
9	Sigoise et Sigoise BT	Olive de table

En fait, et après enquête auprès des agriculteurs de la région il s'est avéré que le cultivar Sofiana est le résultat du greffage d'un cultivar espagnol sur un olivier sauvage. D'un autre côté il n'est pas à exclure qu'il est des mutations ponctuelles pouvant ainsi produire de nouveaux génotypes (Rotondi *et al.*, 2011). Les résultats de l'analyse avec Structure ont permis aussi de regrouper les cultivars Abani, Aeleh et Chemlal BT dans un unique cluster (n°05), cultivars connus pour être ceux qui donnent le meilleur rendement en huile en Algérie (Mendil et Sebai 2006). Un nombre élevé d'allèles privés (un total de 19) ont été trouvés dans ce cluster, en outre, le locus GAPI103A qui a amplifié un allèle unique, (136 pb) pour les cultivars Aeleh.

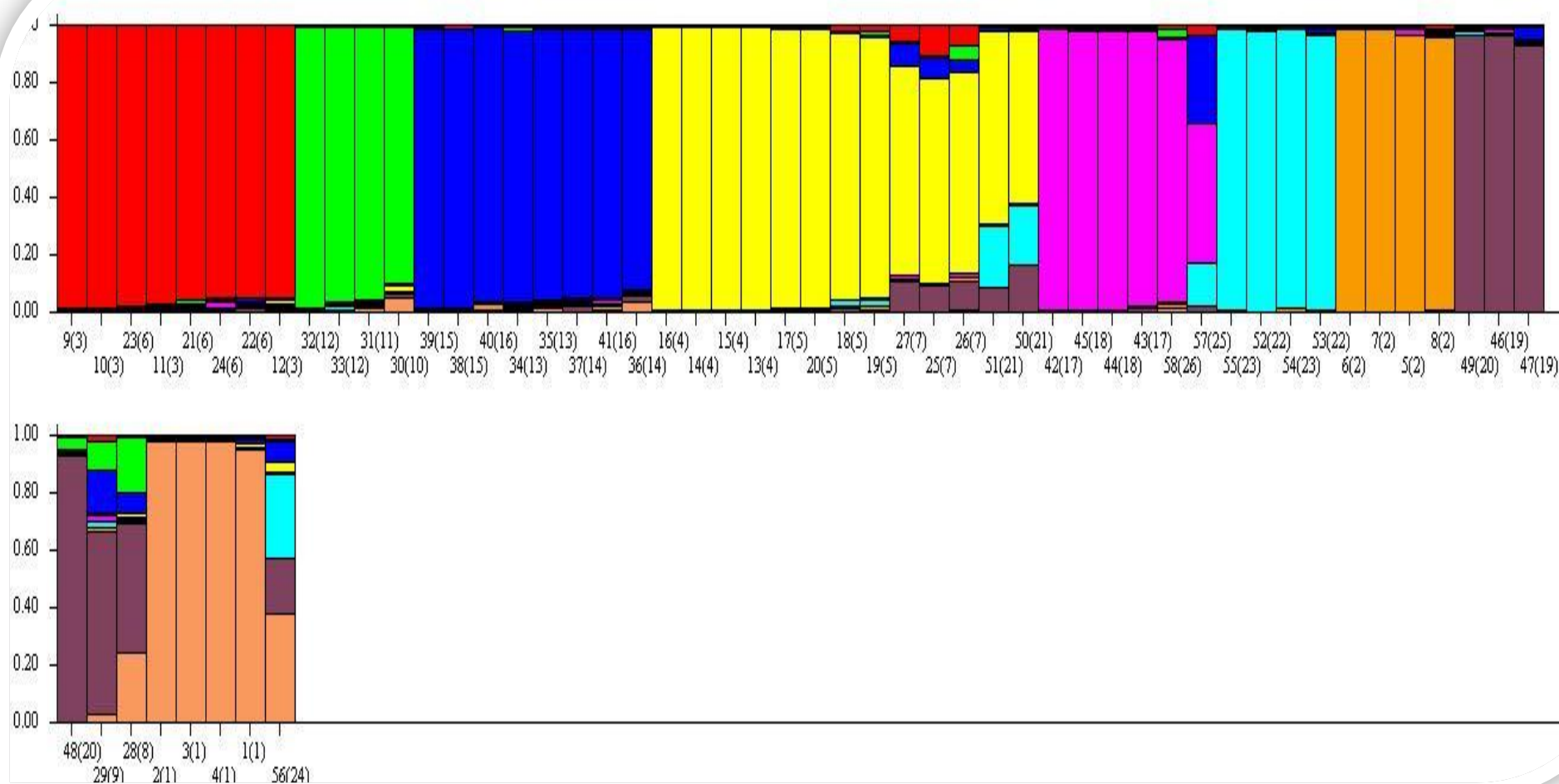


Figure N°24 : Structure des cultivars et de ces accessions d'oliviers inférer à ($K = 9$)

Chaque accession d'oliviers est représentée par une barre verticale divisée en segments colorés, et leurs longueurs indiquent les proportions du génome attribué au génotype inféré. Les principaux pools génétiques ont été indiqués au-dessus des barres de couleur.

3.4 Diversité génétique intra et interspécifique

La structure génétique des cluster a été évalués par l'analyse de variance moléculaire (AMOVA) (Excoffier et *al.*, 1992), dont les résultats sont reportés dans la Figure N°25 . L'analyse a révélé que 27% de la variation génétique a été trouvé parmi les clusters et 73% de la diversité a été exprimée au sein des clusters.

Pour mieux visualiser les distances génétiques nous avons calculés les estimations de Nei (1978) entre les clusters appariées. La valeur la plus élevée de la distance génétique, observée était de 1,417 observée entre le cultivar *Limli*, destiné à huile par excellence, et le cultivar *Sigoise*, connu pour son gros fruit, et est utilisé principalement comme olive de conserve. Par contre, il apparait que les cultivars du cluster 4 et ceux du cluster 8 sont étroitement génétiquement liés, la valeur de distance génétique enregistrée est de 0,489. (Tableau 26).

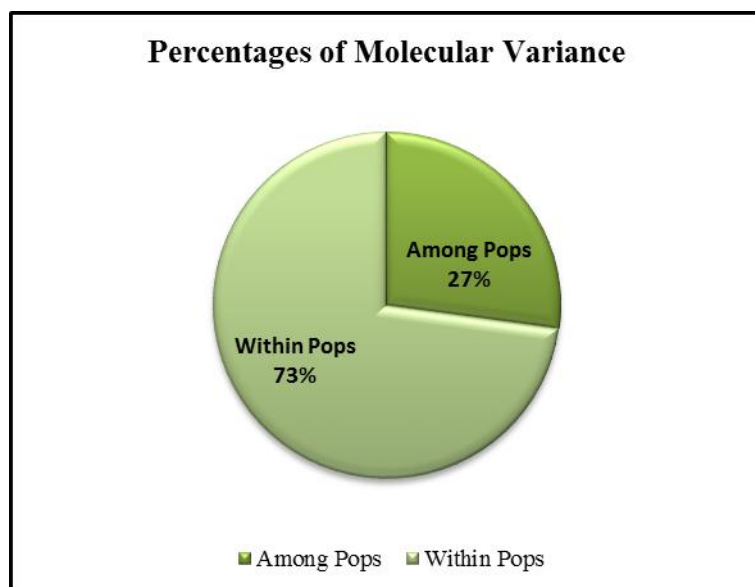


Figure N° 25 : Pourcentage de la variance moléculaire

Tableau 26 : Matrice des distance génétique de Nei's entre les 9clusters

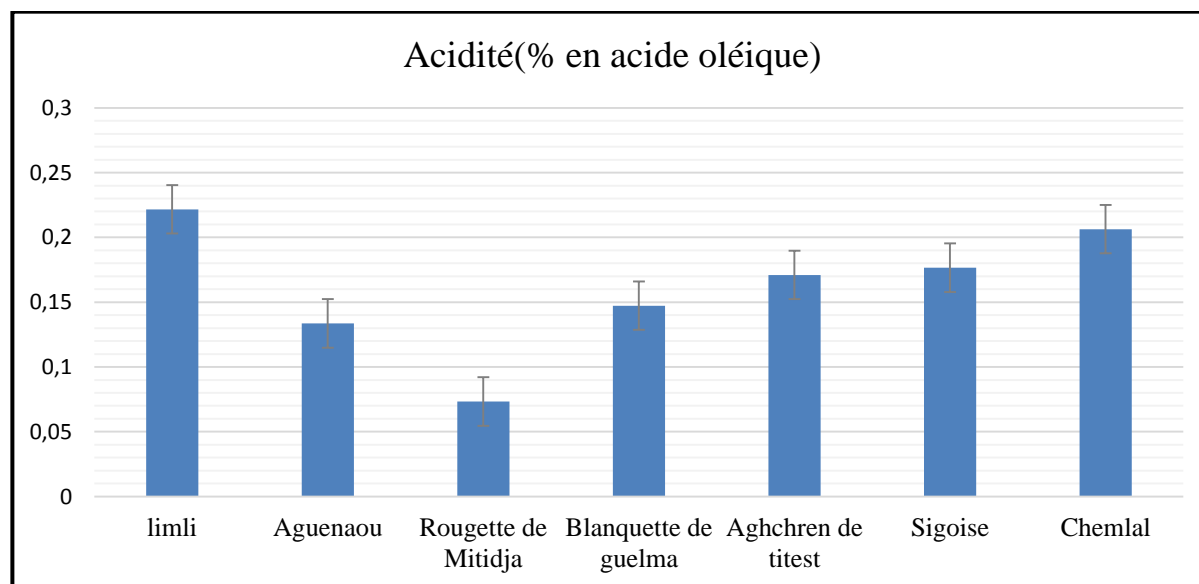
cluster1	cluster2	cluster3	cluster4	cluster5	cluster6	cluster7	cluster8	cluster9	
0,000									cluster1
1,037	0,000								cluster2
0,764	0,935	0,000							cluster3
0,682	0,805	0,553	0,000						cluster4
0,635	1,135	0,724	0,799	0,000					cluster5
1,114	1,147	0,825	0,892	0,911	0,000				cluster6
0,955	1,391	0,835	0,914	1,200	0,898	0,000			cluster7
0,827	0,976	0,578	0,489	0,855	0,989	1,211	0,000		cluster8
1,062	0,616	0,750	0,740	0,987	1,347	1,417	0,859	0,000	cluster9

III. Caractéristiques physico-chimiques de l'huile monovariétale

1. Indices de qualité de l'huile d'olive

1.1 Acidité

Les teneurs de l'acidité libre des échantillons analysés sont exprimés en pourcentage d'acide oléique et illustrés sur la figure N°26. On remarque sur cette dernière que le pourcentage de l'acidité libre des huiles des différents cultivars étudiés se situe entre 0,073 et 0,221%. Sur la base de cet indice ; toutes les huiles analysées semblent se classer dans la catégorie « extra vierge» puisque la teneur en acide gras libre des échantillons analysés reste en dessous de 0,8% (norme du COI). L'huile du cultivar *Rougette de Mitidja* a exprimé les teneurs d'acidité les plus faibles contrairement à celle du cultivar *Limli* qui a enregistré les teneurs d'acidité les plus élevées. Selon El Antari *et al.*, 2000, dans les conditions où les olives sont récoltées à la main et transformées directement sans procéder au stockage, l'acidité de l'huile ne devrait guère dépasser 0,5 %, ce qui est le cas de nos huiles extraites. Ces valeurs sont semblables à celles rapportées par Tantaoui *et al.*, 2010 qui ont montré que l'acidité libre reste en dessous de 0,8. De plus, nous constatons que les teneurs d'acidité de nos cultivars sont moins élevées que celles rapportées par Hamida Benabid *et al.*, 2008. Ces derniers ont indiqué, lors d'analyses des huiles de cultivars de différentes régions oléicoles en Algérie des valeurs entre 1 et 3,3 meq d'O₂/kg.



FigureN°26 : Acidité des différents échantillons d'huiles

Les huiles de nos cultivars sont moins acides que les huiles des variétés tunisiennes analysées par Zarrouk *et al.*, 2008, pour lesquelles l'acidité libre est comprise entre 0,38 et 0,41% d'acide oléique, par contre elles sont proches des huiles des variétés espagnoles *Picual*, *Cornicabra*, *Manzanilla*, *Arbequina* et *Local* dont les valeurs sont comprises entre (0,10 et 0,25 %) (Pardo *et al.*, 2007) et des variétés d'huiles européennes introduites en Tunisie ainsi que la variété tunisienne *Chemlali* dont les teneurs varient entre (0,11 et 0,28 %) (Dabbou *et al.*, 2010).

1.2 Indice de peroxyde

La détermination de la teneur en peroxydes dans les huiles permet d'évaluer le niveau d'oxydation primaire, ces réactions d'oxydation représentent la cause principale de l'altération du goût et de l'odeur de l'huile d'olive. Il indique l'état de rancissement de l'huile d'olive qui pourrait être lié à l'état avancée de maturation des olives, à l'exposition des olives et/ou l'huile d'olive à l'oxydation lors des différentes étapes de trituration et lors du stockage. Les huiles analysées montrent des indices de peroxyde qui oscillent entre 2,4 meq d'O₂/Kg pour les cultivars *Aguentaou* et *Blanquette de guelma*, et de 8,4 meq d'O₂/Kg pour le cultivar *Chemlal* (Figure 27). En comparant ces valeurs à celles de la norme commerciale du COI, on constate également que tous les échantillons analysés sont conformes à la norme ce qui permet aussi de classer les huiles de nos cultivars dans la catégorie « extra vierge » (IP ≤ 20).

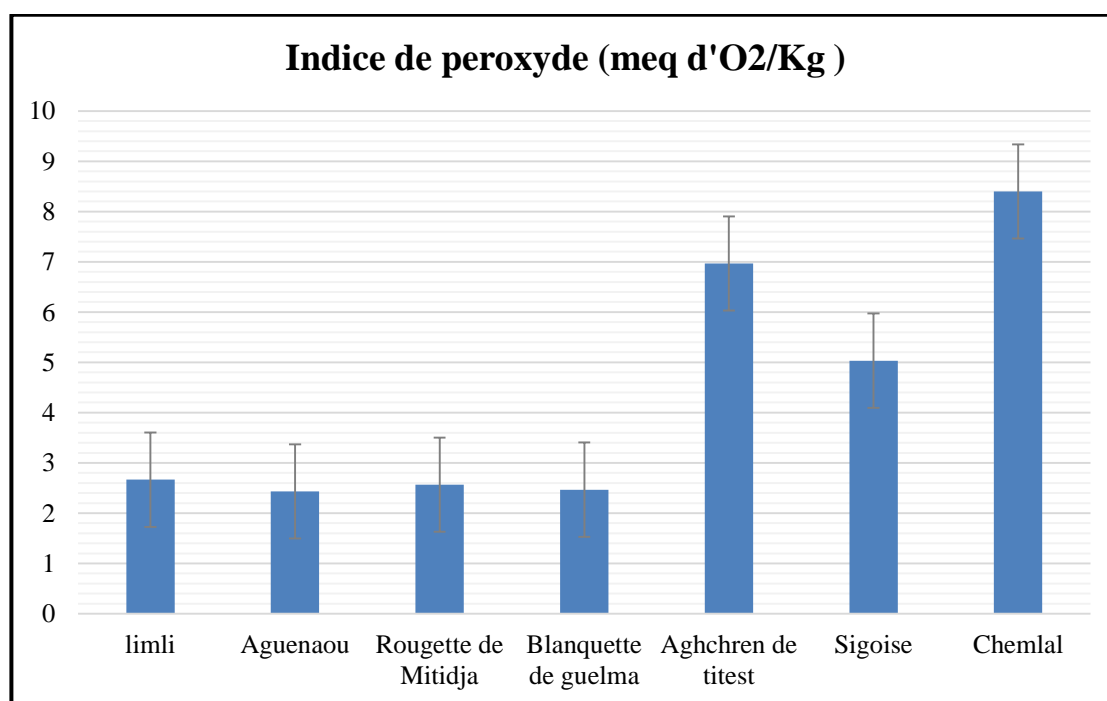


Figure N°27 : Indices de peroxyde des différents échantillons d'huiles

Nos résultats indiquent des indices de peroxyde proches de ceux enregistrés pour les huiles des variétés tunisiennes *Chétoui*, *Jarboui*, *AinJarboua*, *NebJmel*, *Rekhami*, *Regregui* qui varient entre 2,63 et 7,90 meq d'O₂/Kg (Haddada *et al.*, 2008) et des variétés espagnoles *Picual*, *Hojiblanca* et *Arbequina* (4,30 et 7,5 meq d'O₂/Kg) (Gutiérrez *et al.*, 2002). Toutefois, les résultats obtenus restent inférieures à certaines variétés italiennes ayant des indices de peroxyde variant entre 5,3 et 24 meq d'O₂/Kg (Del Carlo, 2004). Le même constat est fait pour les indices de peroxyde trouvés chez des variétés turques (entre 7,37 et 16,08 meq d'O₂/Kg) (Ocakoglu *et al.*, 2009) et ceux des huiles produites au Maroc oriental, avec des teneurs en peroxydes qui vont de 7 à 15,4 meq O₂/kg d'huile (Tanouti *et al.*, 2010).

Il est à noter que toutes les huiles étudiées présentent des teneurs relativement faibles, ce qui traduit une faible oxydation. Selon Sanchez Casas *et al.*, 1999, ce paramètre pourrait être retenu pour contrôler les problèmes de production, en particulier les problèmes qui peuvent se produire après la récolte et au cours de la transformation.

1.3 Absorbance dans l'ultraviolet

L'extinction spécifique des huiles dans l'ultraviolet constitue un paramètre important de leur qualité. En effet, à 232 nm, elle permet d'évaluer la présence de produits primaires d'oxydation des acides gras (hydroperoxydes linoléiques...), alors qu'à 270 nm les produits secondaires d'oxydation des acides gras (alcools, cétones,...) sont détectés (Tchiegang *et al.*, 2005).

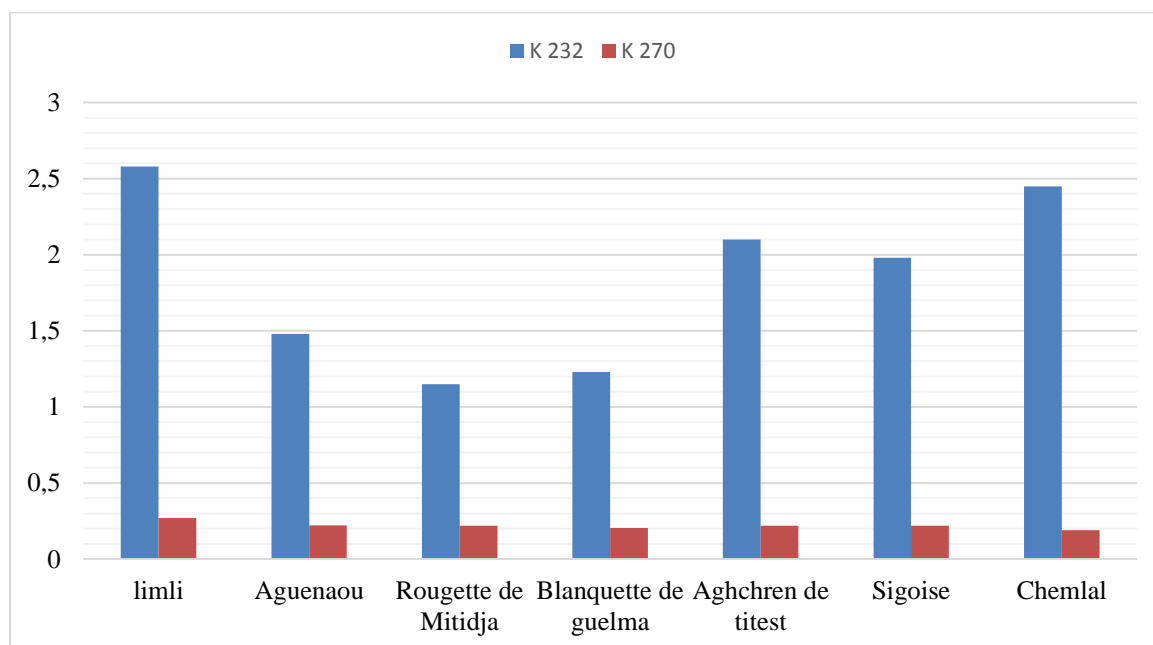


Figure N°28 : Coefficient d'extinction spécifique à 270 nm et 232nm des différents échantillons d'huiles

Les valeurs les plus élevées du coefficient K₂₃₂ sont relevées pour le cultivar *Limeli* (2,58) et *Chemlal* (2,45) et la valeur la plus basse est enregistrée pour les cultivars *Rougette de Mitidja* (1,15) et *Blanquette de Guelma* (1,23). Quant au coefficient K₂₇₀, les valeurs obtenues se situent entre 0,205 pour le cultivar *Blanquette de Guelma* et 0,269 pour le cultivar *Limeli*. Les échantillons d'huile présentent tous des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K₂₃₂, K₂₇₀) égales aux limites établies par le COI (2003) pour une huile d'olive extra-vierge ($K_{232} \leq 2,5$ et $K_{270} \leq 0,22$). Les résultats que nous avons obtenus (Figure N°28) sont similaires ceux enregistrés pour les variétés européennes introduites en Tunisie *Ascolana Tenera*, *Koroneiki* et *Picholine* qui varient entre 1,6 et 2,8 (pour le coefficient K₂₃₂) et entre 0,1 et 0,2 (pour coefficient K₂₇₀) (Dabbou *et al.*, 2009) ainsi que des variétés grecques (1,20 à 2,40 pour le coefficient K₂₃₂ et 0,07 à 0,20 pour coefficient K₂₇₀) (Blekas *et al.*, 2002).

Il est à noter que de nombreuses recherches ont montré que l'origine géographique n'a pas d'influence significative sur ce paramètre analytique qui est fondamentalement affecté par le contact de l'huile avec l'air et son exposition à la lumière. Ceci est favorisé par les attaques d'insectes ou les blessures des fruits, ce qui permet le contact de l'oxygène avec l'huile contenue dans le mésocarpe (Ranalli *et al.*, 1996, Kiritsakis *et al.*, 1998).

2. Composition chimiques de l'huile d'olive

2.1 Détermination des phénols totaux par Chromatographie en Phase

Liquide à Haute Performance (HPLC)

L'analyse des résultats obtenus par HPLC montre une composition qualitative en composés phénoliques similaire pour l'ensemble des échantillons, mais différente d'un point de vue quantitatif. La composition de la fraction phénolique présente un intérêt dans la caractérisation variétale des huiles d'olive vierges (Dhifi *et al.*, 2006). Les teneurs en polyphénols totaux diffèrent significativement ($p < 0,05$) d'un cultivar à un autre (Figure 29). Les teneurs les plus élevées sont enregistrées pour les cultivars *Blanquette de Guelma* (482 mg/kg) et *Aguenaou* (325 mg/kg), alors que les valeurs les plus faibles sont obtenues pour les cultivars *Aghchren de titest* (78 mg/kg) et *Sigoise* (55 mg/kg). Les huiles d'olives sont connues pour leur teneur élevée en composés phénoliques par rapport aux autres huiles végétales raffinées. Ces composés contribuent à la saveur globale complexe de l'huile d'olives (Kiritsakis *et al.*, 1998) et lui fournissent des effets antioxydants (Del Carlo *et al.*, 2004), et sont en grande partie responsables de sa durée de conservation (Servili *et al.*, 2002).

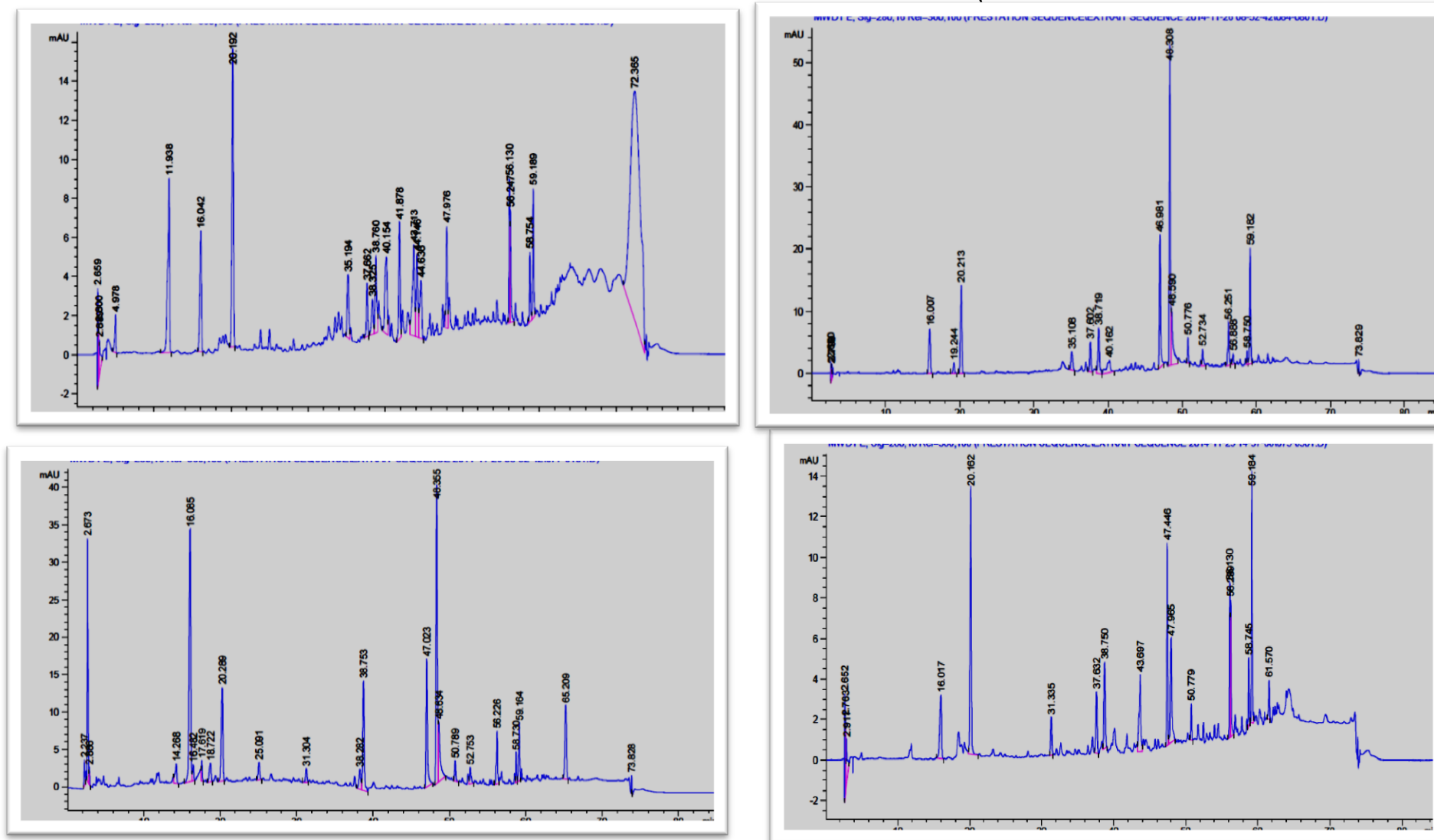


Figure N°29 : Chromatogrammes, HPLC, des Biophénols totaux. Les valeurs des différents pics indiquent les composés phénoliques

En fait, les variations des teneurs des polyphénols peut s'expliquer par plusieurs facteurs à savoir la maturité des olives, le stockage avant la trituration des olives, la méthode de fabrication mais dépendent également de la variété cultivée et de la zone géographique (Garcia et *al.*, 2003) (effet du terroir). En effet, il semble que les huiles d'oliveraie situées en altitude sont plus riches en phénols que les oliveraies des plaines (Ocakoglu, 2008). Les quantités de phénols présentes dans les huiles d'olives qui ont été rapportées dans la littérature sont très variables. D'ailleurs, selon la durée de broyage et le contact avec l'air, l'huile se trouve appauvrie en polyphénols totaux et en o-diphénols responsables de l'activité antioxydant, ces composés relativement hydrosolubles passent partiellement dans les margines (Chimi et *al.*, 2006). Mais généralement, la concentration en phénols dans l'huile d'olives varie entre 1g/kg et 800 mg/kg (Visioli et *al.*, 1992). Montedero et *al.*, (1992) ont signalés des concentrations supérieures à 500 mg/kg, alors que Maestro-Duran et *al.*, (1994) ont indiqué des concentrations qui varient entre 100 et 800 mg/Kg. D'après Owen et *al.*, 2000 la teneur en phénols est de 232 mg/kg pour l'huile d'olives vierge extra et de 62 mg/kg pour l'huile raffinée.

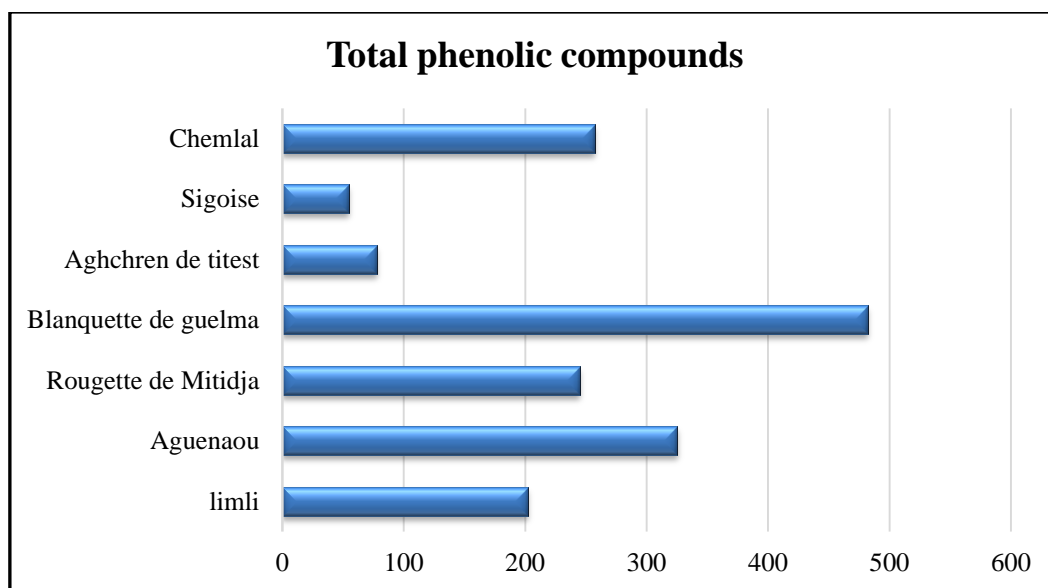


Figure N°30: Teneurs en polyphénols totaux des différents échantillons d'huiles

D'après Tsimidou (1998), on peut classer les variétés étudiées par rapport à leurs teneurs en polyphénols comme suit :

- ✓ Variétés à faible teneur en polyphénols totaux : 50-200 mg/kg
- ✓ Variétés à teneur moyenne en polyphénols totaux : 200-500 mg/kg
- ✓ Variétés à teneur élevée en polyphénols totaux 500-1000mg/kg

D'après cette classification, les cultivars *Limeli*, *Aguenaou*, *Rougette de Mitidja*, *Blanquette de Guelma* et *Chemlal* sont classées dans la catégorie des variétés à teneurs moyennes en polyphénols alors que les cultivars *Sigoise* et *Aghchren de Titest* dans la catégorie des variétés à teneurs faibles en polyphénols (Figure n°30).

Les résultats que nous avons obtenus pour les teneurs en polyphénols totaux sont relativement proches de celles des variétés italiennes étudiées par Baiano et *al.*, 2009, pour lesquelles les teneurs en polyphénols sont comprises entre 133,68 et 322,18 mg/kg, et des variétés turques étudiées par Ocakoglu et *al.*, 2009, dont les teneurs en polyphénols varient entre 75,46 et 333,37 mg/kg. Cependant les teneurs en polyphénols totaux de nos cultivars sont supérieures à celles des variétés espagnoles analysées par Ceci et Carelli (2007), et aux variétés cultivées en Argentine (*Picual*, *Barnea*, *Empeltre*, *Manzanilla Californiana* et *Manzanilla Criolla*) et dont les teneurs varient de 37,2 à 93,2 mg/kg, et de 25,3 à 92,7 mg/kg, respectivement.

2.2 Composition en acides gras des huiles par GC/MS

Les résultats obtenus pour les 7 échantillons analysés par chromatographie en phase gazeuse sont présentés dans le Tableau (27). Ces résultats montrent que la composition en acides gras des huiles des cultivars étudiés présentent des teneurs en différents acides gras répondant aux normes établies par le COI (2003) pour les huiles d'olives extra vierge (Conseil Oléicole International, 2009). Cette composition acide est variable, en effet l'acide le plus dominant est l'acide oléique, toutes les huiles étudiées enregistrent des taux supérieurs à 60%. Les proportions des acides gras ont permis la distinction entre les cultivars, pour l'acide oléique les valeurs les plus élevées sont enregistrées pour le cultivar *Rougette de Mitidja* (70,09%) suivies des cultivars *Aghchren de titesn*, *Chemlal*, *Limli*, *Aguenaou* et *Sigoise* (67,44% ; 65,50% ; 63,94% ; 63,14% et 62%). Par contre, la plus faible valeur est enregistrée par le cultivar *Blanquette de guelma* (60,12%). Pour l'acide linoléique les valeurs oscillent entre 5,79% (*Aguenaou*) et 17,58% (*Blanquette de guelma*). D'après Gutierrez et *al.*, 1999, au cours de la maturation des olives, l'acide oléique est transformé en acide linoléique par l'enzyme oléate dénaturasse. Le rapport acide oléique/acide linoléique est utilisé comme paramètre de stabilité, plusieurs études ont montré qu'un rapport élevé engendre une stabilité oxydative importante (Haddada et *al.*, 2007).

Les cultivars se distinguant par les rapports en acide oléique/acide linoléique les plus élevées sont : *Rougette de Mitidja*(20,52) ; *Aguenaou*(10,91) et *Limli*(5,59).

Tableau 27: Valeurs moyennes des acides gras totaux des huiles des variétés (en % des acides gras totaux)

Cultivar	C16 :0 acide palmitique	C16 :1 acide palmitoleic	C18 :0 acide stéarique	C18 :1 acide oléique	C18 :2 acide linoléique	C18 :3 acide linoléinique	AGS : acide gras saturé	AGI : acide gras insaturé	C18 :1/C18 :2	AGI/AGS
Limli	15,79	1,55	2,64	63,94	11,44	0,76	19,44	78,81	5,59	4,054
Aguenaou	10,04	0,92	2,38	63,14	5,79	0,76	37,85	80,54	10,91	2,127
Rougette de Mitidja	12,06	1,33	2,82	70,09	3,41	0,88	16,25	87,27	20,52	5,371
Blanquette de guelma	12,33	0,93	2,98	60,12	17,58	0,82	11,60	83,26	3,49	7,175
Aghchren de titest	12,04	1,92	3,38	67,44	13,79	0,79	17,82	78,45	4,89	4,402
Sigoise	15,20	2,70	1,90	62,00	17,30	0,90	17,10	82,90	3,58	4,84795322
Chemlal	16,44	2,02	1,85	65,50	13,96	0,62	18,45	81,58	4,69	4,42168022

Les taux en acides oléique et linoléique trouvés dans nos cultivars sont très proches de ceux obtenus pour des variétés marocaines (El Antari *et al.*, 2003), des variétés tunisiennes (Haddada *et al.*, 2007) et des variétés turques (Gurdeniz *et al.*, 2008). Mais ces taux sont supérieurs aux teneurs des variétés *Chemlali* et *Chétoui* de Sousse et de Sfax (Guerfel *et al.*, 2009) et de la variété espagnole *Arbequina* (Allalout *et al.*, 2009) et inférieurs à ceux enregistrés par Pardo *et al.*, 2007, pour des variétés espagnoles (*Picual*, *Cornicabra*, *Manzanilla*, *Arbequina*, *Local*). Certains acides gras minoritaires peuvent également être utilisés comme indicateur variétal. Les concentrations en acide palmitoléique, acide stéarique et acide linolénique sont très faibles dans tous les échantillons analysés et changent d'une huile d'olive à une autre. A noter aussi que les taux d'acides gras saturés et insaturés varient en fonction de la variété, *Rougette de Mitidja* (87,27%) ; *Blanquette de guelma* (83,26%) ; *Sigoise* (82,9%) et *Chemlal* (81,58%).

Le rapport entre les acides gras insaturés sur les acides gras saturés (AGI/AGS) montre également une fluctuation en fonction des huiles étudiés. Ce rapport oscille entre 2,13 pour le cultivar *Aguenaou* et 7,17 pour le cultivar *Blanquette de guelma*. Autant que ce rapport est élevé autant que l'huile d'olive est d'une plus grande stabilité à l'auto-oxydation et une valeur nutritionnelle importante (Ryan *et al.*, 1998 ; Abaza *et al.*, 2003).

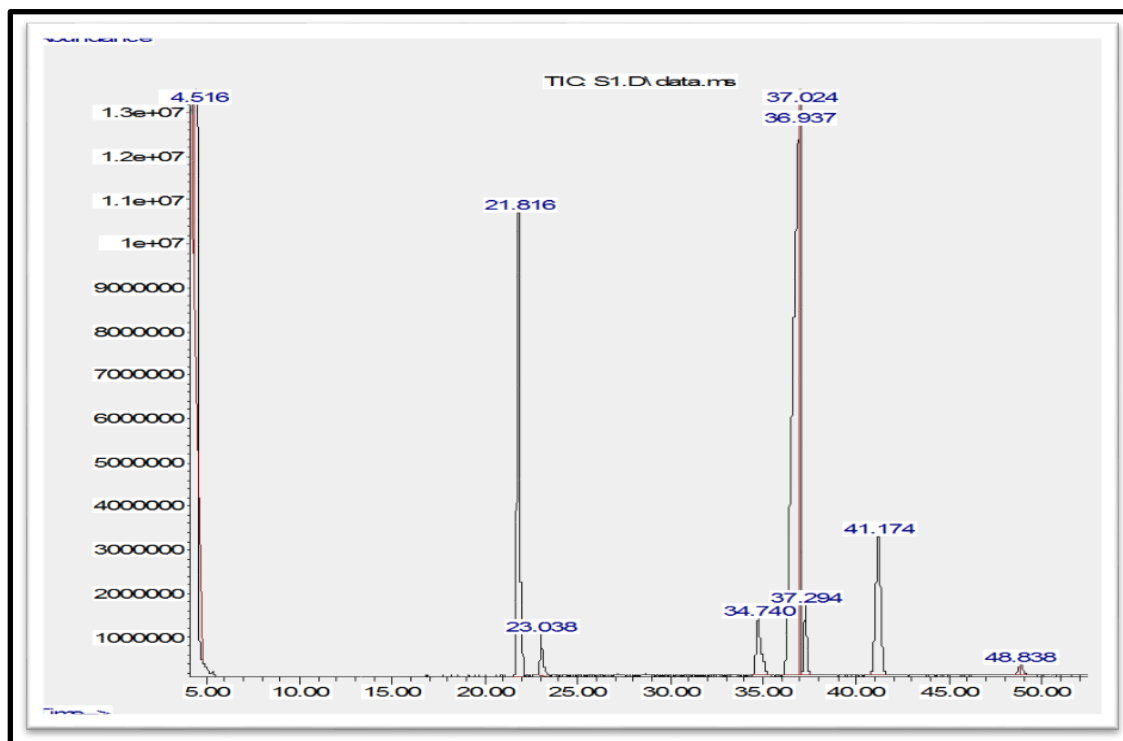


Figure N° 31 : Chromatogramme type des esters méthyliques des acides gras

3. La classification ascendante hiérarchique des huiles

Les résultats des analyses (13 paramètres) de l'huile d'olive obtenues ont été utilisés pour évaluer les relations entre cultivars par le biais de l'estimation des distances. La mesure des distances utilisée est celle de Pearson. Afin de visualiser cette relation nous avons construit une phylogénie, en utilisant la méthode non pondérée du groupe de pair des moyennes arithmétiques (UPGMA). Le dendrogramme (Figure N°32), obtenu par la méthode UPGMA sur base d'une matrice de similarité élaborée avec le coefficient de Pearson a montré une similitude moyenne entre les cultivars de 0,549 à 0,998 ce qui a permis de les structurer en 3 différentes classes.

La 1^{ère} classe comprend 5 cultivars : *Limeli*, *Aguentaou*, *Rougette de Mitidja*, *Blanquette de Guelma*, *Chemlal*. La 2^{ème} et 3^{ème} classe avec un seul cultivar respectivement : *Agchren de Tistet* et *Sigoise* (Annexe).

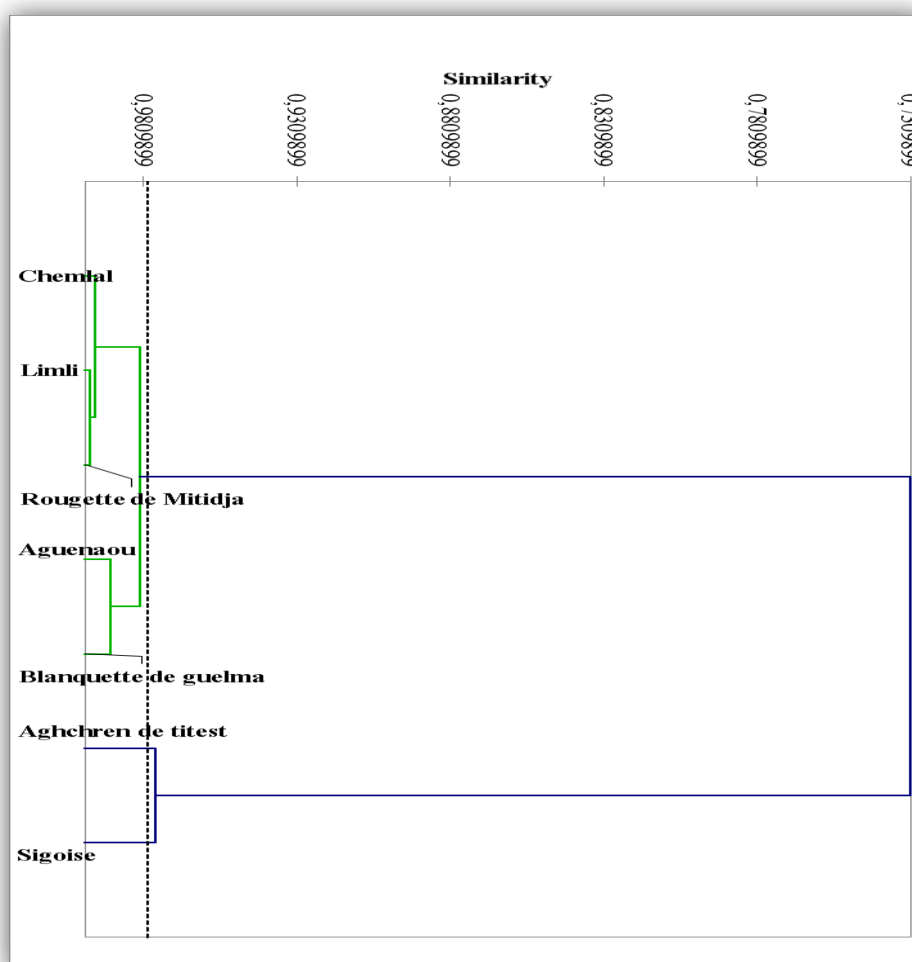


Figure N°32: Dendrogramme pour les 7 cultivars par la méthode CAH pour les paramètres de l'huile

Une autre représentation graphique (Figure N°33) permet de faire ressortir les paramètres les plus discriminants entre les trois classes obtenus. Noter que ces paramètres sont :

- Variable 4 : le taux en acide oléique,
- Variable 8 : le taux en acide gras insaturé,
- Variable 13 : la teneur en polyphénols totaux.

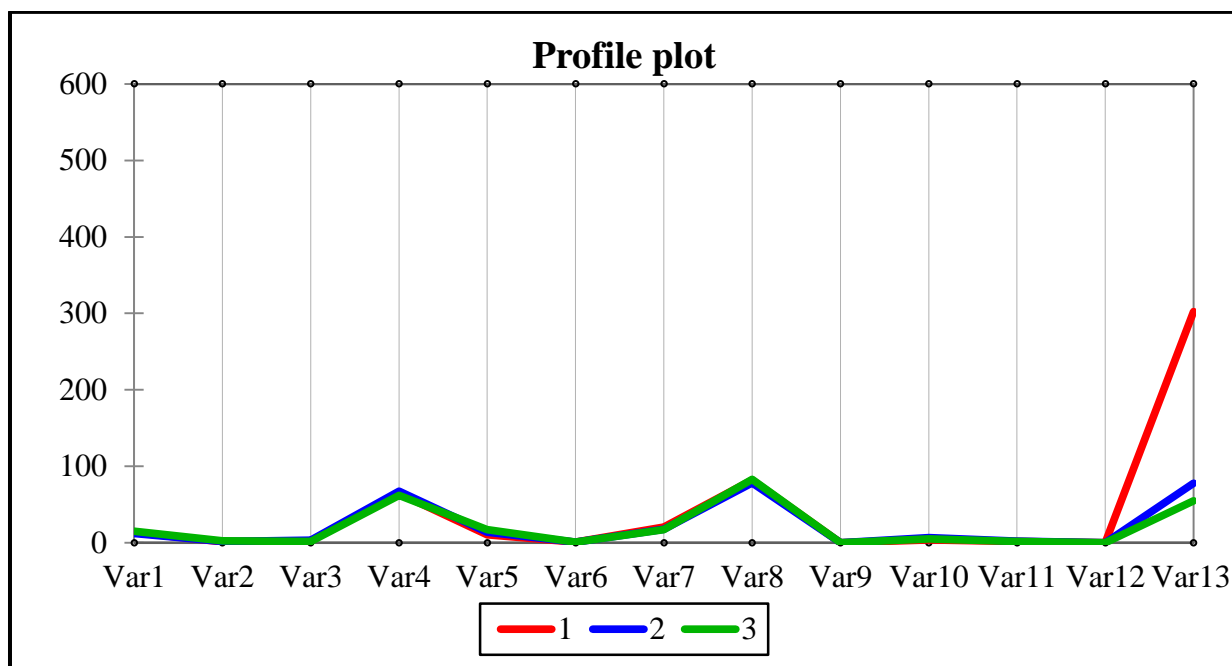


Figure N°33 : représentation graphique des caractéristiques des 3 classes engendrées par la CAH

Synthèse des résultats et discussion générale

Afin de caractériser nos cultivars trois approches ont été mises en œuvre dans le cadre de ce travail. Une approche phénotypique, basée sur des descripteurs morphologiques, COI et IPGRI, une approche biochimique basée sur l'analyse de l'huile monovariétale et une approche moléculaire moyennant l'utilisation des marqueurs moléculaire de l'ADN de type microsatellite. Dans les paragraphes suivants, nous présentons une synthèse des résultats obtenus pour les trois types d'analyses.

1. Synthèse de la caractérisation morphologique

Vingt-trois descripteurs (quantitatifs et qualitatifs) morphologiques, relatifs aux différents organes de l'arbre (fruit, endocarpe, feuille et inflorescence), décrits dans le guide du Conseil Oléicole International (COI) ont été utilisées pour analysées un total de 7 cultivars, ayant un nombre de pieds égale ou supérieur à 3, de la collection établis à l'Institut Technique de l'Arboriculture Fruitière et de la Vigne (I.T.A.F.V) situé à Takerietz , ont été évalués.

Sur les vingt-trois descripteurs utilisés seuls neuf descripteurs quantitatifs (V1 : F longueurs, V3 : F rapport, V5 : Fr largeur, V6 : Fr rapport, V7 : Fr poids, V8 : E longueurs, V9 : E largeurs, V10 : E rapport et V11 : E poids) et sept descripteurs qualitatifs relatifs à l'endocarpe se sont avérés les plus discriminants car ils contribuent le plus dans la variabilité entre les cultivars étudiées. En fait, les résultats indiquent que les cultivars sont répartis sur trois groupes de cultivars : le 1^{er} groupe (*Agchren de titest*, *Aguenau*, *Blanquette de Guelma*, *Sigoise* et *Rougette de Mitidja*) comprend des cultivars avec des fruits et des endocarpes de grandes tailles utilisés pour la production d'huile ou ayant une double aptitude (Huile et olive de table). Pour le 2^{ème} et le 3^{ème} groupes ils sont composés d'un seul cultivar : *Limeli* et *Chemlal* respectivement. Ces cultivars sont caractérisés par des feuilles longues, des fruits et des endocarpes de petites tailles et une vocation de production d'huile.

2. Synthèse de la caractérisation biochimique

L'approche biochimique a été basée sur l'analyse des huiles monovariétales de sept cultivars caractérisés morphologiquement. Un total de cinq paramètres (acidité, indice de peroxyde, absorbance dans l'ultraviolet, polyphénols totaux et composition en acides gras) ont été dosés dont le profil en composés phénoliques et en acides gras sont en relation direct avec le caractère intrinsèque de la variétale (Gomez-Alonso *et al.*, 2002; Oliveras-Lopez *et al.*, 2007). Sur les treize variables analysées, seul trois paramètres (le taux en acide oléique, le taux en AGI et la teneur en polyphénol totaux) sont discriminants et permettent la visualisation de trois groupes

distincts de cultivars : le 1^{er} groupe comprend cinq cultivars : *Limeli*, *Aguentaou*, *Rougette de Mitidja*, *Blanquette de Guelma* et *Chemlal* enregistrant les taux les plus élevés en polyphénols totaux (202- 482 mg/kg), un pourcentage assez important en AGI (80-87%) et un taux moyen d'acide oléique. Par contre, le 2^{ème} groupe est représenté par un seul cultivar *Agchren de Titest*, qui est caractérisé par une huile ayant le pourcentage le plus faible en AGI, un taux moyen d'acide oléique et un faible taux en polyphénols. Le dernier groupe est composé par la *Sigoise* qui donne l'huile la plus riche en AGI et le taux le plus faible en biophénols.

3. Synthèse de la caractérisation moléculaire

L'approche moléculaire a été basée sur l'utilisation de 11 paires d'amorces polymorphes présélectionnés disponibles dans la littérature actuelle (Sefc et *al.*, 2000 ; Carriero et *al.*, 2002 ; Cipriani et *al.*, 2002) pour 26 cultivars collectées de deux sites différents dans le but de détecter la variabilité inter et intra cultivars et de dégager les paramètres et les marqueurs SSR discriminants. Les résultats ont révélé des groupes de cultivars partiellement isolés les uns des autres, où neuf clusters ont été identifiés avec une hétérozygotie observée moyenne de 0,48. Le nombre moyen d'allèle obtenus est de 11,72 et est légèrement supérieur à celui enregistré dans d'autre pays (Cicatelli et *al.*, 2013, Truillo et *al.*, 2013 ; Diez et *al.*, 2014 ; Yor Chalak et *al.*, 2014 ; Haouane et *al.*, 2011 ; Chalak et *al.*, 2014 ; Muzzalupo et *al.*, 2014). Ces premiers résultats indiquent que le germoplasme d'olive algérien comporte une importante diversité génétique. Cet valeur élevée pourraient être expliquée par l'origine non codante de l'ADN, qui n'est pas soumis à une pression sélective (Testolin et al. 2000, selon Bracci et *al.*, 2009) . De plus, en raison du fait que l'olivier est une espèces allogames et que certains cultivars sont auto-incompatibles, l'hétérozygotie et le taux du polymorphisme peuvent augmenter de manière significative (Angiolillo et *al.*, 1999 ; Rallo et *al.*, 2000). Nos résultats font ressortir aussi de hautes fréquences alléliques due à l'amplification de deux différents allèles, particulièrement pour les amorces : GAPU103A, GAPU71B et UDO28 qui peut suggérer une complète duplication du génome (Cipriani et *al.*, 2002).

La combinaison des profils obtenus par la amorces : GAPU103A, DCA9 and UDO43 a permis la séparation entre 20 cultivars étudiées , ce qui fait d'eux d'excellent marqueurs génétiques. Cette conclusion a été rapportée pour les même locis dans différentes études sur le génotypage d'olivier dans différents pays (Belaj et *al.*, 2003;. Bandelj et *al.*, 2004;. Alba et *al.*, 2009;. D'Imperio et *al.*, 2011).

L'analyse des statistiques de Wright dont le (F_{is}) rend compte de la consanguinité au sein des cultivars étudiées, dans notre étude le F_{is} enregistre des valeurs négatives, ce qui indique un excès d'hétérozygotie et donc une faible consanguinité entre nos cultivars. Quant à l'indice de fixation (F_{ST}) qui correspond à la séparation génétique entre variétés, nos résultats montrent une important voir très important différenciation génétique ($F_{st} > 0,15$ à $0,25$).

Le flux de gènes est un autre paramètre important à analyser qui permet d'indiquer les échanges unidirectionnels ou bidirectionnels de gènes par migration entre les populations et joue un rôle important dans la différenciation des populations (Zhao, 2006). Il montre le mouvement des gènes entre différents pools génétiques (Slatkin, 1985) ayant comme résultat final l'homogénéisation des fréquences alléliques entre les populations. L'estimation de ce paramètre peut se faire indirectement à l'aide de l'indice de fixation (F_{ST}) de Wright, sur les hypothèses d'absence de sélection et une situation d'équilibre entre la dérive génétique et le flux de gènes. La différenciation génétique entre les populations est inversement liée au flux de gènes qui existe entre elles. Dans notre étude, le flux de gènes est faible dans tous les groupes (cluster) ce qui s'explique par une forte différenciation entre les accessions (F_{ST} élevé : entre $0,164$ - $0,485$).

Nos résultats ont fait ressortir aussi que l'amorce GAPIU 59 malgré son faible polymorphisme avec l'amplification de 6 allèles seulement dont un d'une taille de 156bp avec une fréquence de (0,91) est détectée pour la 1^{ère} fois chez les cultivars algériens. Nous avons aussi noté un excès d'homozygotie pour GAPIU59, où 52 sur 58 des génotypes étaient homozygotes avec un allèle de petite taille. Cette dernière constatation a été retrouvée pour des cultivars italiens dans les travaux de Bracci et *al.*, 2009. L'intérêt de cette allèle (159bp) ne réside pas seulement dans sa haute fréquence par rapport au cinq autres allèles amplifiés mais aussi le fait qu'il enregistre la fréquence la plus élevée par rapport aux 10 autres amorces utilisées dans cette étude. Donc, cela témoigne de la bonne conservation de la région flanquant de cette amorce au dépit des mutations putative qui pourrait se produire.

Dans notre étude aucun cas de synonymie (noms différents pour le même génotype) n'a été détecté, ce qui corrobore l'exactitude de la désignation des génotypes et le niveau de polymorphisme dans les cultivars étudiés. Par contre, nous avons ressortie des cas d'homonymie (même nom pour génotypes distincts), le cultivar Chemlal a été regroupé en deux groupes différents (I et III par la méthode UPGMA), vue leur origine géographique différents (Batna et Kabylie). Les profils génétiques amplifiés ont été différents pour huit des 11 loci SSR analysées. La discrimination des cas d'homonymes dans les germoplasme d'olive en utilisant

l'outil moléculaire a été rapporté dans plusieurs travaux (Belhaj et al 2002 ; Khadari et *al.*, 2003; Noormohammadi et *al.*, 2007).

Enfin, pour tous les cultivars étudiés, les indices de diversité utilisée ont montré que la diversité génétique était davantage due à la diversité génétique intra-population qu'à la diversité inter-population. On a mis en évidence que les marqueurs génétiques moléculaires traduisent des structures de diversité générale qui peuvent à leur tour servir de base pour construire une «*core collection*». En effet, les marqueurs révèlent parfois des groupes d'accessions partiellement isolés les uns des autres, qui peuvent avoir fixé des allèles distincts pour des caractères utiles, par effet de frondaison, par dérive génétique ou encore sous l'action de différentes pressions de sélection.

On peut en conclure qu'il existe une complémentarité entre les trois types d'analyses (morphologique, biochimique et moléculaire) et qu'il n'est donc pas possible d'inférer une analyse au dépend de l'autre. L'expression du phénotype peut être influencée par l'environnement, les tests moléculaires nous donnent une preuve incontestable de la variabilité conservée dans les cultivars algériens ainsi que la détection d'allèles uniques.

Conclusion Générale et Perspectives



L'olivier l'arbre qui traverse les temps

Conclusion et perspectives

Une collection de génotype caractérisée constitue une source de richesse pour les programmes d'amélioration végétale. La mesure de la variabilité, la structuration des populations et le flux des gènes permettent en effet de réaliser une meilleure gestion du germoplasme à la base de tout programme de sélection.

Dans de notre étude, on a pu constater que cette variabilité est conservée aussi dans des vergers de petites exploitations agricoles. Le présent travail qui traite du polymorphisme phénotypique et moléculaire de l'olivier provenant de différentes régions en Algérie (Collection et verger) nous a permis d'atteindre les objectifs que nous nous sommes fixés au début de notre projet à savoir la détermination des descripteurs phénotypiques et marqueurs biochimiques et moléculaires nécessaires pour identifier les cultivars ayant des traits agronomiques intéressants pour une meilleure gestion et exploitation rationnelle de ces ressources génétiques d'olivier. Au cours de ces travaux de recherche, nous avons pu, en premier lieu, catégoriser les différents cultivars d'olivier en se basant sur l'analyse des traits morpho-métrique liés aux feuilles, fruits et endocarpes. Ensuite étudier leur diversité moléculaire et établir leur phylogénie. En second lieu, nous avons déterminé la qualité, les composés phénoliques et la composition en acides gras présents dans l'huile de quelques cultivars d'huile d'olives algériennes.

L'étude phénotypique basée sur les traits des différents organes de l'olivier a permis de révéler un polymorphisme inter cultivars et de catégoriser et d'établir une fiche descriptive préliminaire pour chaque cultivar. Selon l'importance morpho-agronomique et économique de certains traits du fruit, endocarpe et feuille, nous avons distingué 3 catégories : 1ère catégorie renferme *Agchren de titest*, *Aguenaou*, *Blanquette de Guelma*, *Sigoise* et *Rougette de Mitidja* dotées de fruits et d'endocarpes de grandes tailles utilisées principalement pour des fins de production d'huile ou à double aptitude. Pour la 2ème et la 3^{ème} catégories : *Limeli* et *Chemlal*, des cultivars avec des feuilles longues, des fruits et des endocarpes de petite taille et à vocation huilière. Cette séparation des cultivars a été en grande partie appuyée et confirmée, d'une part, par une classification hiérarchique *via* la méthode CAH et d'autre part, par la méthode d'analyse en composantes principale.

L'analyse moléculaire des accessions a été précédée par la mise au point d'un protocole d'extraction de l'ADN génomique et des méthodes d'amplification en PCR par SSR. Le protocole nous a permis d'obtenir des extraits d'ADN de très bonne quantité variant de 70 à 1077 ng/μl et de qualité et dont le rapport ADN/protéine varie de 1,7 3 à 1,98.

L'analyse de ces 26 cultivars par les marqueurs SSR a permis de les distinguer d'une manière précise. Les 11 amorces utilisées en PCR se sont révélées polymorphes. Au total 129 bandes reproductibles dont 45 allèles privées ont été amplifiées. L'usage de ces bandes SSR dans l'analyse statistique UPGMA a montré une large diversité génétique notamment à un niveau de similarité voisinant 82-98%. Toutefois, l'analyse moléculaire faite par STRUCTURE été plus détaillée et discriminante et a permis la séparation des 59 accessions (26 cultivars) d'oliviers en neuf pools génétiques. L'utilisation de l'outil moléculaire a permis de distinguer facilement entre des cultivars ayant la même utilisation, c'est-à-dire, en fruits de consommation (consommation en frais ou mise en conserve), production d'huile ou à double usage (fruit/huile). Donc, les cultivars utilisés pour la production de l'huile d'olive ont été regroupés dans les clusters : 1, 2, 5 et 7. Ceux utilisés pour la consommation fraîche ou conserve dans le cluster 6 et 9, tandis que ceux utilisés en double usage (fruit/huile) sont regroupés dans les clusters : 3, 4 et 8.

Enfin, l'évaluation des indices de qualité des huiles d'olive montre que les huiles produites à partir de sept cultivars, présentent toutes, sans exception, des valeurs d'acidité, d'indice de peroxyde et des coefficients d'extinction spécifique dans l'UV (K232, K270) inférieures aux limites établies par le COI (2003) pour une huile d'olive extra vierge, ce qui nous permet de les classer dans la catégorie « extra vierge ». La composition en acides gras indique que toutes les huiles étudiées présentent des teneurs en différents acides gras répondant aux normes établies par le COI (2003), pour les huiles d'olives extra vierges. Des variations cultivar-dépendante en profils d'acides gras sont relevés, bien que, les cultivars soient plantés dans la même parcelle expérimentale, elles conservent leur propre rythme de biosynthèse des lipides, la composition en acides gras varie sensiblement d'un cultivar à un autre, selon leur patrimoine génétique. L'acide oléique est l'acide gras dominant de la composition des huiles étudiées, il présente des proportions supérieures à 60%, la valeur la plus élevée est enregistrée chez le cultivar *Rougette de Mitidja* (70,09%). L'analyse de la composition en polyphénols des échantillons des huiles d'olive par HPLC, nous révèle une composition qualitative similaire en composés phénoliques individuels, mais différente d'un point de vue quantitatif, ce qui nous a permis de faire une distinction variétale.

L'originalité de ces travaux, permettant l'évaluation de la diversité phénotypique et génétique de certains cultivars algériens ainsi que leur huile, ce qui constitue une valeur scientifique considérable et prometteuse. Travailler sur une espèce méditerranéenne emblématique telle que l'olivier est enrichissant et valorisant tant sur le plan national

qu'international. Cet arbre fruitier à d'énormes intérêts socio-économiques et écologiques ce qui a poussé une équipe de chercheurs espagnoles à décoder le génome d'un olivier (variété Farga dont l'âge a été estimé à environ 1200 ans), qui comporte plus de 56 000 gènes, le double du nombre de gènes présents chez l'humain. Ces découvertes aideront à améliorer la sélection de cet arbre économiquement important, de servir de base pour des recherches sur l'histoire évolutive de l'arbre, ce qui révélera ensuite comment les oliviers poussant dans des régions différentes s'adaptent à des conditions environnementales variées (Cruz et *al.*, 2016). Sur le plan national l'ouverture de nouvelles perspectives, dans le but de rentabiliser davantage nos investigations, reste judicieuse à concrétiser :

1. L'élargissement de cette collection d'olivier en y apportant de nouvelles accessions provenant de toutes les régions d'Algérie non étudiées.
2. Enrichir les données de différentes collections ou accessions avec d'autres informations utiles telles que la nature de plantation (cultivée ou spontanée), âge, production, exposition,.....
3. Evaluer la diversité génétique intra-cultivar et entre les types sauvages et cultivés en Algérie.
4. Confronter les résultats d'analyse de ressource génétique algérienne d'olivier à ceux de certains pays méditerranéens afin de construire un arbre phylogénétique global.
5. Valoriser les verges locaux et le système d'agriculture de petits agriculteurs afin d'assurer un maintien de la variabilité in situ.
6. Utiliser un nombre de marqueurs et d'individus plus élevé ce qui permettrait de réaliser d'autres applications comme la recherche des gènes candidats liés à la résistance au stress biotique ou abiotique.
7. L'authentification des origines variétales ou géographiques ainsi que l'appartenance des huiles d'olives algérienne.

Références bibliographiques

1. **Abaza L., Ben Temime S., M'Sallem M., Daoud D., Zarrouk M. et Cherif A. 2003.** Etude comparative de la lipogenèse chez quelques variétés d'oliviers cultivées en Tunisie. Riv. Ital. Dell Sost. Gr. 80: 297-306.
2. **Adam A.F et Dron. M, 1993.** Les outils moléculaires et leurs applications à l'amélioration des plantes. Ed: AUPELA-UREF, John Libbey Eurotext « Le progrès génétique passe il par le repérage et l'inventaire des gènes ? » Paris, PP23-46.
3. **Ait Yacine Z., Serhrouchni M. and Hilali S. 2002.** Evolution de la composition acide de l'huile d'olive à différents stades de la maturité des olives. Cas du Périmètre du Tadla- Maroc. Olivae, 94:51-53.
4. **Alba V ; Montemurro C ; Sabetta W ; Pasqualone A et Blanco A., 2009.** SSR-base identification key of cultivars of *Olea europaea* L. diffused in Southern-Italy. Scientia Horticulturae (123): 11–16.
5. **Angiolillo A ; Mencuccini M et Baldoni L., 1999.** Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, (98) : 411–421.
6. **Argenson C ; Régis S ; Jourdain J.M et Vaysse P., 1999.** L'olivier. Ed : centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. 204p.
7. **Baldoni L ; Nicolo G.C ; Mariotti R ; Ricciolini C ; Arcioni S ; Vendramin G.V ; Porceddu A ; Sarri V ; Ojeda M.A ; Trujillo I ; Rallo L ; Belaj A ; Perri E ; Salimonti A ; Muzzalupo I ; Casagrande A ; Lain O ; Messina R et Testolin R., 2009.** A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. Molecular Breeding, Vol.24, pp. 213–231.
8. **Bandelj, D., Jakše, J., Javornik, B., 2004.** Assessment of genetic variability of olive varieties by microsatellite and AFLP markers. Euphytica 136:93–102.
9. **Bao JS, Corke H, Sun M ., 2002.** Microsatellites in starchsynthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in waxy rice (*Oryza sativa* L.). Theor Appl Genet 105:898–905.
10. **Barranco D; Trujillo I et Rallo P., 2000.** Are Oblonga and Frantoio olive the same cultivar. Horticultural Science 35 :6.
11. **Barranco D et Rallo L., 2000.** Olive cultivars in Spain. Hortechology 10: 107-110.
12. **Bartolini G., 2008.** Olea databases. Valable sur le site : <http://www.oleadb.Belaj et al., 2001> .
13. **Belaj A ; Satovic Z ; Rallo L et Trujillo I., 2002.** Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections as determined by randomly amplified polymorphic DNA. Theor Appl Genet (2002) 105:638–644.
14. **Belaj A ; Trujillo I ; de la Rosa R et Rallo L., 2001.** Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. J. Amer. Soc. Hortic. Sci. 126, 64-71.
15. **Belaj A ; Munoz-Diez C ; Baldoni L ; Porceddu A ; Barranco D et Satovic Z., 2007.** Genetic diversity and population structure of wild olive from the North-western Mediterranean assessed by SSR markers. Ann Bot (100) :449–458.

16. **Belaj A ; Leon L ; Satovic Z et de la Rosa R., 2011.** Variability of wild olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) analyzed by agromorphological traits and SSR markers. *Sci. Hortic.* 129(4), 561-569.
17. **Benabid H., 2009.** Caractérisation de l'huile d'olive algérienne : Apports des méthodes chimiométriques. Thèse de doctorat en sciences. Université de Constantine. Pp : 1-38.
18. **Benbouza H ; Baudoin J.P et Mergeai G., 2006.** Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* (10) : 73-76.
19. **Benderradji L ; Bouzerzour H ; Ykhlef N ; Djekoun A et Kellou K., 2007.** Réponse à la culture in vitro de trois variétés de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Sciences et Technologie C-N°26*, décembre 2007, pp.27-32.
20. **Berra B.** 1998. Les composants mineurs de l'huile d'olive : aspects biochimiques et nutritionnels. *Olivae*, 73: 29-30 .
21. **Besnard G ; Khadari B ; Baradat P et Bervillé A., 2002.** *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 104, 1353-1361.
22. **Besnard G et Bervillé A., 2002.** On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europaea* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 104, 1157-1163. Besnard et al., 2007.
23. **Besnard G., 2009.** Génétique et évolution des plantes en milieu méditerranéen et tropical. Université de Lille 1. 45p.
24. **Besnard G, Garcia-Verdugo C, Rubio de Casas R, Treier UA, Galland N, Vargas P (2008)** Polyploidy in the olive complex (*Olea europaea* L.) : evidence from flow cytometry and nuclear microsatellite analyses. *Annals of Botany* 101: 25-30.
25. **Blondel et Aronson et al, 1995;** *Plant Life in the World's Mediterranean Climates.*
26. **Boskou D. 2006 a.** Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit : in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2nd Ed. The American Oil Chemists' Society, pp 13-20.
27. **Boskou D. 2006b.** Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology*, 17: 505-512.
28. **Boskou D., Blekas G. et Tsimidou M. 2006a.** Olive Oil Composition in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, Boskou, D., Ed., the American Oil Chemists' Society, pp 41-72.
29. **Boskou D., Tsimidou M. and Blekas G. 2006 b.** Polar Phenolic Compounds: in *Olive Oil, Chemistry and Technology*, 2nd Ed. The American Oil Chemists' Society, PP 3-92.
30. **Boskou D. 2009.** Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil in *Olive oil : minor constituents and Health*. Ed. CRC press. Pp 11-44.
31. **Boskou D., 2012.** Chapitre 13. Produits alimentaires méditerranéens : recherche et développement. CIHEAM, Presses de Sciences Po « Annuels ». Pp : 279-297.
32. **Bracci T ; Sebastiani L ; Busconi M ; Fogher C ; Belaj A et Trujillo I., 2009.** SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Sci Hortic* (122):209–215.
33. **Bracci T ; Busconi M ; Sebastiani L et Fogher C., 2011.** Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Report*, Vol.30, pp. 449–462.
34. **Camps-Farber H., 1974.** L'olivier et son importance économique dans l' Afrique antique. L'olivier. Paris : CIHEAM (Options méditerranéennes n°24). Pp : 21-28. Cantini et al., 1999.

35. **Cantini C ; Cimato A ; Autino A ; Redi A et Cresti M., 2008.** Assessment of the tuscan olive germplasm by microsatellite markers reveals genetic identities and different discrimination capacity among and within cultivars. *Sci Hortic* 133: 598-604.
36. **Carriero F ; Fontanazza G ; Cellini F et Giorio G., 2002.** Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 301–307.
37. **Chouaki S ; Bessedik F ; Chebouti A ; Maamri F ; Oumata S ; Kheldoun S ; Hamana M.F ; Douzene M ; Bellah F et Kheldoun A., 2006.** Deuxième rapport national sur l'état des ressources phytogénétiques. INRA Algérie/ juin 2006. Pp : 74-75.
38. **Chapuis, M.P; Estoup A; 2007.** Microsatellite null alleles and estimation of Population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24, 621–631.
39. **Chimi H. 2006.** Technologies d'extraction de l'huile d'olive et gestion de sa qualité. *Bulletin Mensuel d'Information et de Liaison du Programme National de Transfert de Technologie en Agriculture*, 141: 1-4. Chol et al., 2005),
40. **Chung AM, Staub JE, Chen JF. 2006.** Molecular phylogeny of Cucumis species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome* 49: 219–229.
41. **Cicatelli A ; Fortunati T ; De Feis I ; Castiglione S., 2013.** Oil composition and genetic biodiversity of ancient and new olive (*olea europaea* L.)Varieties and accessions of southern Italy. *Plant science* 210:82-92.
42. **Cipriani G ; Marazzo M ; Marconi R ; Cimato A et Testolin R., 2002.** Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theor Appl Genet* 104:223–228.COI (2003)
43. **C.O.I., 1997.** Methodology for Primary Characterisation of Olive Varieties, Project RESGEN-CT (67/97), EU/IOC, International Olive Council (IOC).
44. **C .O.I, 1998.** L'olivier, l'olive, l'huile. Pp : 1-18.
45. **C.O.I. 1996.** Analyse spectrophotometrique dans l'ultraviolet. Conseil Oléicole International/ T20/ Doc 19 6 juin 1996, Madrid. Espagne.
46. **C.O.I. 2003.** Classification des huiles d'olive. Normes internationales applicables à l'huile d'olive et à l'huile de grignon d'olive. Conseil Oléicole International.
47. **C.O.I. 2009.** Production de l'huile d'olive. Conseil Oléicole International.
48. **Cordeiro A.I ; Sanchez-sevilla J.F ; Alvarez-tinaut M.C et Gomez-jimenez M.C., 2008.** Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52 (4): 642-647.
49. **Corrado G ; La Mura M ; Ambrosino O ; Pugliano G ; Varricchio P et Rao R., 2009.** Relationships of companion olive cultivars: comparative analysis of molecular and phenotypic data. *Genome*, 52: 692–700D'après Rallo et Cidraes (1995).
50. **De Caraffa, V., Maury, J., Gambotti, C., Breton, C., Bervillé, A., Giannettini, J., 2002.** Mitochondrial DNA variation and RAPD mark oleasters, olive and feral olive from Western and Eastern Mediterranean. *Theor. Appl. Genet.* 104, 1209–1216.
51. **De Vienne D., 1998.** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. Edition, D de Vienne. Pp : 13-44.
52. **Stephen L. Dellaporta,Jonathan Wood , James B. Hicks.** A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983, Volume 1, Issue 4, pp 19-21.
53. **Delseny M, Laroche M, Penon P (1983).** Detection of sequences with Z-DNA forming potential in higher plants. *Biochem Biophys Res Commun* 116:113–120

54. **Dhifi W., Ben Khedher M., Elyes Kechouk M. and Marzouk B.** 2006. Etude qualitative et quantitative des arômes et des polyphénols de quelques huiles d'olive de Tunisie. *Olivae*, 105: 36-40.
55. **Díaz A ; Martin A ; Rallo P ; Barranco D et de la Rosa R.,** 2006. Self-incompatibility of 'Arbequina' and 'Picual' olive assessed by SSR markers. *J Am Soc Hortic Sci* 131:250–255.
56. **Dièz M; Trujillo I; Barrio E; Belaj A et Barranco D.,** 2011. Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. *Annals of Botany* (108): 797–807.
57. **D'Imperio M; Viscosi V; Scarano M; D'Andrea M ; Zullo B.A et Pilla F.,** 2011. Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germplasm (*Olea europaea*). *Sci Hort* 130:229–240. Dabbou et al., 2010).
58. **D'Imperio M., Dugo G., Alfa M., Mannina L. and Segre A.L.** 2007. Statistical analysis on Sicilian olive oils. *Food Chemistry*, 102: 956– 965.
59. **Dominguez-Garcia M.C ; Laib M ; de la Rosa R et Belaj A.,** 2012. Characterisation and identification of olive cultivars from North-eastern Algeria using molecular markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 87(2), 95-100 Dosba et Saunier, 1998).
60. **Doveri S and Baldoni L (2007) Olive.** In: Kole C. (ed.). *Genome, mapping and molecular breeding in plants*, Volume 4: Fruits and Nuts. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg pp 253-264.
61. **Doveri, S., Sabino Gil, F., Diaz, A., Reale, S., Busconi, M., Machado, A., Martin, A., Fogher, C., Donini, P., Lee, D.,** 2008. Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Sci.Hortic.* 116, 367–373.
62. **Doyle et Doyle, 1987.** Molecular techniques in taxonomy, *DNA Protocols for Plants*, Volume 57 of the series NATO ASI Series pp 283-293.
63. **Dresselhaus T, Cordts S, Heuer S, Sauter M, Lorz H, Kranz E ,** 1999. Novel ribosomal genes from maize are differentially expressed in the zygotic and somatic cell cycles. *Mol Gen Genet* 261:416–427.
64. **Duby C et Robin S.,** 2001. Analyse en composantes principales. Dép. O.M.I.P. Paris. Pp : 20-26.
65. **Dugo G., Lo Turco V., Pollicino D., Mavrogeni E. and Pipitone F.** 2004. Caractérisation d'huiles d'olive vierges siciliennes. Variation qualitative des huiles des fruits des cultivars « *Biancolilla, Nocellara del Belice , Cerasuola , Tonda Iblea et Crastu* » en fonction des techniques et de l'époque de récolte des olives. *Olivae*, 101 : 44-52.
66. **Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT,** 1991. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet* 49:746–756
67. **El Antari A., Hilal A., Boulouha. and El Moudni A.** 2000. Etude de l'influence de la variété, de l'environnement et des techniques culturales sur les caractéristiques des fruits et la composition chimiques de l'huile d'olive vierge extra au Maroc. *Olivae*, 80: 29-36.
68. **El Antari A., El Moudni A. and Ajana H.** 2003. Evolution comparative de la qualité et de la composition acide de l'huile d'olive chez quelques variétés méditerranéennes cultivées au Maroc. *Olivae*, 95: 26-31.
69. **Erre, P., Chessa, I., Munoz-Diez, C., Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I.,** 2010. Genetic Diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57, 41–54.
70. **Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J.,** 2005. Detecting the number of clusters of Individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.

71. **Excoffier L ; Smouse P.E et Quattro J.M., 1992.** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction sites. *Genetics* 131: 479-491.
72. **Excoffier, L., Estoup, A., Cornuet, J.M., 2005.** Bayesian analysis of an admixture model with mutations and arbitrarily linked markers. *Genetics* 169, 1727–1738.
73. **Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J.K., 2003.** Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567–1587.
74. **FAOSTAT., 2013.** Site web : <http://faostat.fao.org/>
75. **Fendrin, M., Ferreira, E., Calado, L., Abreu, I., Rodríguez-García, M.I., Amorim, M.I., Alché, J.D., 2014.** Discrimination of Portuguese and Spanish olive cultivars using microsatellite markers. *Acad. J. Agric. Res.* 2 (3), 058–061.
76. **Fontanazza G and Baldoni L., 1990.** Proposed program for the genetic improvement of the olive. *Olivae* 34: 32-40.
77. **Fujimori S, Washio T, Higo K, Ohtomo Y, Murakami K, Kenichi M, Kawai J, Carninci P, Hayashizaki Y, Kikuchi S, Tomita M , 2003.** A novel feature of microsatellites in plants: a distribution gradient along the direction of transcription. *FEBS Lett* 554:17–22.
78. **Garcia A., Brenes M., Garcia P., Romero C. et Garrido A. 2003.** Phenolic content of commercial olive oils. *European Food Research and Technology.* 216 (6) : 520-525.
79. **Ghalmi N., 2011.** Etude de la diversité génétique de quelques écotypes locaux de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cultivés en Algérie. Thèse de doctorat. ENSA, Elharrach Alger. 155p.
80. **Gomes S ; Martins-Lopes P et Guedes-Pinto H., 2012.** Olive Tree Genetic Resources Characterization through Molecular Markers, *Genetic Diversity in Plants*, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7, In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-inplants/> olive tree -genetic- resources characterization -through- molecular –markers.
81. **Gomez-Alonso S., Salvador M.D. and Fregapane G. 2002.** Phenolic Compounds Profile of Cornicabra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (23) : 6812- 6817.
82. **Gomez-Caravaca A.M., Cerretani L., Bendini A., Seguera-Carretero A., Fernandez-Gutierry A., Del Carlo M., Compagnone D. and Cechelli A. 2008.** Effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 56: 4577-4583.
83. **Gomez-Rico A., Salvador M.D., Moriana A. and Perez D. 2007.** Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. Olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry.* 100: 568-578.
84. **Gómez-Rico A., Fregapane G. and Salvador M.D. 2008.** Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food research International*, 41: 433–440.
85. **Green PS., 2002.** A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bull.* 57: 91-140.
86. **Guerfel M., Ouni Y., Taamalli A., Boujnah D., Stefanoudaki E. and Zarrouk M. 2009.** Effect of location on virgin olive oils of the two main Tunisian olive cultivars. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111: 926–932.

87. **Gurdeniz G., Ozen B. and Tokatli F.** 2008. Classification of Turkish olive oils with respect to cultivar, geographic origin and harvest year, using fatty acid profile and mid-IR spectroscopy. *European Food Research & Technology*, 227:1275-1281.
88. **Gutierrez F., Jimenez B., Ruiz A. and Albi M.A.** 1999. Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive Oil Extracted from the Varieties Picual and Hojiblanca and on the Different Components Involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1) : 121-127.
89. **Gutiérrez F., Villafranca M.J. and Castellano J.M.** 2002. Changes in the Main Components and Quality Indices of Virgin Olive Oil During Oxidation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(7) : 669-676.
90. **Haddada F.M., Manai H., Oueslati I., Daoud D., Sanchez J., Osorio E. and Zarrouk M.** 2007. Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55:10941-10946.
91. **Haddada F.M., Krichène D., Manai H., Oueslati I., Daoud D. and Zarrouk M.** 2008. Analytical evaluation of six monovarietal virgin olive oils from Northern Tunisia. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110: 905-913.
92. **Hamada HM, Petrino MG, Kakunaga T, 1982.** A novel repeated element with Z-DNAforming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6465–6469.
93. **Hauville, A., 1953.** La répartition des variétés d'olives en Algérie et ses Conséquences pratiques. *Bulletin de la société des Agriculteurs d'Algérie*, 580.
94. **Haouane H ; El Bakkali A ; Moukhli A ; Tollon Ch; Santoni S ; Oukabli A ; El Modafar Ch et Khadari B., 2011.** Genetic structure and core collection of the World Olive Germplasm Bank of Marrakech: towards the optimized management and use of Mediterranean olive genetic resources. *Genetica* 139:1083–1094
95. **Idrissi A et Ouazzani N., 2003.** Apport des descripteurs morphologiques à l'inventaire et à l'identification des variétés d'olivier (*Olea europaea* L.). *Plant genetic resources newsletter* (136), pp. 1-10.
96. **Jacob HJ, Lindpaintner K, Kusumir EL, Bunkery K, Mao IP, Gantenv D, Dzau J, Lander ES, 1991.** Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Cell* 67:213–224.
97. **Jarne P, Lagoda P.J.L, 1996.** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol Evol* 11:424–429.
98. **Kantety RV, Rota ML, Matthews DE, Sorrells ME, 2002.** Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. *Plant Mol Biol* 48:501–510.
99. **Khadari, B., Breton, C., Moutier, N., Roger, J.P., Besnard, G., Berville, A., Dosba, F., 2003.** The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theor. Appl. Genet.* 106, 521–529.
100. **Khadari, B., Charafi, J., Moukhli, A., Ater, M., 2008.** Substantial genetic diversity in Cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical Situation evidenced by the use of SSR loci. *Tree Genet. Genomes* 4, 213–221.
101. **Kiritsakis A., Nanos G.D., Polymenopoulos Z., Thomai T. and Sfakiotakis E.M.** 1998. Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 5(6) : 721-724.

102. **Kloosterman, A.D., Budowle, B., Daselaar, P., 1993.** PCR amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus Amplification conditions, population genetics and application for forensic analysis. *Int.J.LegalMed.* 105, 257–264.
103. **Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002)** Microsatellites : genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11: 2453-2465.
104. **Linos, A., Nikoloudakis, N., Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., 2014.** Genetic structure of the Greek olive germoplasm revealed by RAPD ISSR and SSR markers. *Sci. Hortic.* 175, 33–43.
105. **Lipshitz N, Gophnar, Hartman M., Biger G. 1991.** The beginning of olive (*Olea europaea* L.) cultivation in the Old World: a reassessment. *J Archeol Sci* 18: 441-453.
106. **Litt M, Luty JA, 1989.** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397–401.
107. **Lumaret R, Ouazzani N, Michaud H, Vivier G, Deguilloux MF, Di Guisto F (2004)** Allozyme variation of olive populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity* 92: 343-352.
108. **Maestro R., Garcia J.M. and Castellano J.M. 1993.** Changes in polyphenol content of olive stored in modified atmospheres. *HortScience*, 28 : p 1.
109. **Mendil M et Sebai A., 2006.** Catalogue national des variétés de l'olivier. 100p
110. **Mendil M. and Sebai A. 2006.** L'olivier en Algérie, aperçu sur le patrimoine génétique autochtone. Institut Technique de L'arboriculture fruitière et de la vigne. pp 99
111. **Morgante M and Olivieri AM , 1993.** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J.* 3: 175-182.
112. **Morgante M, Hanafey M, Powell W , 2002.** Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30:194–200
113. **Muzzalupo I ; Vendramin G.G et Chiappetta A., 2014.** Genetic Biodiversity of Italian Olives (*Olea europaea*) Germplasm Analyzed by SSR Markers. *The Scientific World Journal*, 12 pages.
114. **Muzzalupo I; Chiappetta A; Benincasa C et Perri P., 2010.** Intra-cultivar variability of three major olive cultivars grown in different areas of central-southern Italy and studied using microsatellite markers. *Sci. Hortic.* 126: 324–329
115. **Noormohammadi, Z., Kangarloo-Haghighi, B., Sheidai, M., Farahani, F., Ghasemzadeh-Baraki, S., 2014.** Genetic stability versus somaclonal variation in tissue culture regenerated olive plants (*Olea europaea* cv. Kroneiki). *Eur. J. Exp. Biol.* 4(3), 135–142.
116. **Ocakoglu D., Tokatli F., Ozen B. and Korel F. 2009.** Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, 113: 401-410.
117. **Oliveras-Lopez M.J., Innocenti M., Giaccherini C., Ieri F., Romani A. and Mulinac N. 2007.** Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73: 726-732.
118. **Ouazzani N ; Lumaret R ; Villemur P et Di Giusto F., 1993.** Leaf allozyme variation in cultivated and wild Olive trees (*Olea europaea* L.). *Journal of Heredity* 84:34–42.

119. **Ouazzani N ; Lumaret R et Villemur P., 1995.** Apport du polymorphisme alloenzymatique à l'identification variétale de l'Olivier (*Olea europaea* L.). *Agronomie* 15:31–37.
120. **Owen RW, Haubner R, Mier W, et al. 2003.** The isolation, structural elucidation and antioxidant potential of the major phenolic compound in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol* 41: 703-717.
121. **Owen RW, Haubner R, Wurtele G, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H .2004.** Olives and olive oil in cancer prevention. *Eur J Cancer Prev* 13: 319-326.
122. **Owen R.W., Mier W., Giacosa A., Hull W. E., Spiegelhalder B. and Bartsch H. 2000b.** Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry*, 46: 976-988.
123. **Pagnol J., 1975.** L'olivier. Ed. Librairie Lavoisier, France. 3^{ème} édition. Pp 17-150.
124. **Palm R., 2007.** L'Analyse en Composantes Principales : Principes et applications. Notes de statistique et d'informatique, 98/2. Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech. P32.
125. **Peakall R et Smouse P.E., 2006.** GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. ar Ecol. Notes*. 6: 288-295.
126. **Perrin J.L. 1992.** Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Etude et Recherche*, 4: 25-31.
127. **Powell W, Machray GC, Provan J (1996)** Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1: 215-222.
128. **Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000.** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
129. **Pritchard, J. K., Wen X., Falush, D., 2007.** Documentation for STRCUTURE software: version 2.2. Program manual.
130. **Provan J, Powell W, Hollingsworth PM , 2001.** Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 16:142–147.
131. **Rallo P ; Dorado G et Martin A., 2000.** Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Olive tree (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, Vol.101, pp : 984–989.
132. **Ramírez-Tortosa M.C., Granados S. and Quiles J.L. 2006.** Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil in Olive Oil and Health. CABI Publishing, pp 45-62.
133. **Ranalli A., Pollastri L., Contento S., Iannucci E. and Lucera L. 2003.** Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipids and Science Technology*, 105: 57-67.
134. **Rekik Hakim I ; Grati-Kammoun N ; Makhloufi E et Rebai A., 2010.** Discovery and potential of SNP markers in characterization of Tunisian olive germplasm. *Diversity* 2:17-27.
135. **Rekik I ; Salimonti A ; Grati Kamoun N ; Muzzalupo I ; Lepais O ; Gerber S ; Perri E et Rebai A., 2008.** Characterization and Identification of Tunisian Olive Tree Varieties by Microsatellite Markers. *HORT SCIENCE* 43(5):1371–1376.
136. **Rotondi A ; Cultrera N.G.M ; Mariotti R et Baldoni L., 2011.** Genotyping and evaluation of local olive varieties of a climatically disfavoured region through molecular, morphological and oil quality parameters. *Sci Hort* 130:562-569.
137. **Ruby J., 1918.** Recherches morphologiques et biologiques sur l'olivier et sur ses variétés cultivées en France. Thèse de doctorat. Faculté des sciences de paris, France. 285 p.

138. **Ryan D., Robardas K. and Lavee S. 1998.** Evaluation de la qualité de l'huile d'olive. *Olivae*, 72: 26-38.
139. **Sarri,V., Baldoni, L., Porceddu, A., Cultrera, N.G.M., Contento, A., Frediani, M., Belaj, A.,Trujillo, I., Cionini, P.G., 2006.** Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations.*Genome*49, 1606–1615.
140. **Sefc KM ; Lopes MS ; Mendonça D ; Rodrigues Dos Santos M ; Laimer Da Câmara Machado M et Da Câmara Machado A., 2000.**Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol Ecol* 9:1171–1193.
141. **Servili M. and Montedoro G. 2002.** Contribution of phenolic compound to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104: 602-613.
142. **Sokal, R.R., Michener, C.D., 1958.** A statistical method for evaluating systematic relationships: *Univ. Kansas Sci. Bull.* 38, 1409–1438.
143. **Soranzo N, Provan J, Powell W , 1999.** An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42:158–161.
144. **Tautz D (1989).** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acid Res* 17:6463–6471.
145. **Tautz D (1993).** Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ (eds) *DNA fingerprinting: state of the science*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp 21–28.
146. **Tautz D, Renz M (1984).** Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12:4127–4138.
147. **Tessier C ; David J ; This P ; Boursiquot J.M et Charrier A., 1999.**Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 98: 171–177.
148. **Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A (2003).** Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 106:411–422.
149. **Trujello I ; Maria A Ojeda; Nievs M.Urdiroz; Potter D; Barranco D; Rallo L; M Diez C; 2013.** Identification of world Olive Germoplasm Bank of Cordoba (Sapin) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics and Genomes*
150. **Trujillo I; Rallo L et Arus P., 1995.** Identifying Olive cultivars by Isozyme Analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120(2):318–324.
151. **Tsimidou M. 1998.** Polyphenols and quality of virgin olive oil in retrospect. *Journal of Food Science*, 10 (2): 99-112.
152. **Varshney RK, Thiel T, Stein N, Langridge P, Graner A (2002)** In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cell Mol Biol Lett* 7:537–546.
153. **Varshney RK, Graner A, Sorrells ME (2005a)** Genetic microsatellite markers in plants: features and applications.*Trends Biotechnol* 23:48–55.
154. **Varshney RK, Sigmund R, Borner A, Korzun V, Stein N, Sorrells ME, Langridge P, Graner A (2005b)** .Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST–SSR markers in wheat rye and rice. *Plant Sci* 168:195–202.
155. **Varshney RK, Thudi M, Aggarwal R, Borner A (2007).**Genic molecular markers in plants: development and applications. In: Varshney RK, Tuberosa R (eds) *Genomicsassisted*

crop improvement: genomics approaches and platforms, vol 1. Springer, Dordrecht, pp 13–29.

156. **Visioli F. and Galli C.** 1998. Olive Oil Phenols and their Potential Effects on Human Health. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46: 4292-4296.
157. **Visioli F., Poli A. and Galli C.** 2002. Antioxidant and other biological activities of phenols from olive and olive oil. *Medicinal Research Reviews*, 22 (1) : 65-75.
158. **Wallander E et Albert VA., 2000.** Phylogeny and classification of *Oleaceae* based on *RPS16* and *TRNL-F* sequence data. *Amer. J. Bot.* 87: 1827-1841.
159. **Wang ML, Barkley NA, Jenkins TM (2009a).** Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of biotechnology. *Genes Genomes Genomics* 3:54–67.
160. **Weber JL (1990).** Informativeness of human (dC-dA) polymorphisms. *Genomics* 7:524–530.
161. **Weising K, Gardner RC (1999).** A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42:9–19.
162. **Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002).** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol Ecol* 11:1–16.
163. **Zarrouk W., Haddada F.M., Baccouri B., Oueslati I., Taamalli W., Fernandez Z., Lizzani- Cuvelier L., Daoud D. and Zarrouk M. 2008.** Characterization of virgin olive oil from Southern Tunisia. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 110: 81-88.
164. **Zarrouk M., Marzouk B., Ben Miled Daoud D. and Chérif A. 1996.** Accumulation de la matière grasse de l'olive et l'effet du sel sur sa composition. *Olivae*, 61 : 41-45. Zhao, 2006).

Annexes

Annexe 1. Analyse de la variance de la longueur de la feuille

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	20	4698,6961	234,9348	10,4386	< 0,0001
Error	62	1395,3998	22,5064		
Corrected Total	82	6094,0959			

Annexe 2. Analyse de la variance de la longueur du fruit

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	21	595,6534	28,3644	8,2964	< 0,0001
Error	62	211,9712	3,4189		
Corrected Total	83	807,6246			

Annexe 3. Analyse de la variance de la longueur de l'endocarpe

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	21	115,6296	5,5062	5,0959	< 0,0001
Error	62	66,9914	1,0805		
Corrected Total	83	182,6210			

Annexe 4. Analyse de la variance de la largeur de l'endocarpe

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	21	310,2019	14,7715	9,8459	< 0,0001
Error	62	93,0168	1,5003		
Corrected Total	83	403,2187			

Annexe 5. Analyse de la variance du poids de l'endocarpe

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	21	20,6630	0,9840	99,9480	< 0,0001
Error	62	0,6104	0,0098		
Corrected Total	83	21,2733			

Annexe 6. Analyse de la variance de la forme de l'endocarpe

Source	DF	Sum of squares	Mean squares	F	Pr > F
Model	21	17,2381	0,8209	5,6548	< 0,0001
Error	62	9,0000	0,1452		
Corrected					
Total	83	26,2381			

Annexe 7 : Corrélations et cosinus carré entre les variables morphologiques et les axes principaux (F1 et F2)

Variables	Principaux axes				
	CP1		CP2		Plan factoriel 1-2
	Corr	Cos ² %	Corr	Cos ² %	Cos ² %
V1 : F longueur (L)	-0,089	0,8	0,814	66,3	67,1
V2 : F largeur (l)	-0,329	10,8	-0,011	0	10,8
V3 : F rapport (L/l)	0,231	5,3	0,723	52,3	57,6
V4 : Fr longueur (L)	-0,494	24,4	0,122	1,5	25,9
V5 : Fr largeur (l)	0,924	85,3	-0,319	10,2	95,5
V6 : Fr rapport (L/l)	-0,664	44,1	0,473	22,4	66,5
V7 : Fr poids	0,960	92,1	-0,135	1,8	93,9
V8 : E longueur (L)	0,723	52,3	-0,163	2,6	54,9
V9 : E largeur (l)	0,749	56,1	0,342	11,7	67,8
V10 : E rapport (L/l)	-0,360	13	-0,685	46,9	59,9
V11 : E poids	0,822	67,6	0,383	14,7	82,3

Annexe 8 : Résultat du test cophenétique

N = 1653 points

Mean X = 0.8216 SSx = 1.6173

Mean Y = 0.8216 SSy = 2.5881

Tests for association :

Matrix correlation: $r = 0.79051$ (= normalized Mantel statistic Z)

Approximate Mantel t-test: $t = 17.7506$

Prob. random Z < obs. Z: $p = 1.0000$

Annexe 9 : Résultats de la valeur de K calculer par STRUCTURE

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
2	20	-2303.230000	20.728803	—	—	—
3	20	-2176.830000	22.033828	126.400000	11.905000	0.540306
4	20	-2062.335000	45.525889	114.495000	6.860000	0.150683
5	20	-1954.700000	29.720045	107.635000	41.680000	1.402421
6	20	-1888.745000	64.272229	65.955000	10.210000	0.158856
7	20	-1812.580000	54.070145	76.165000	5.410000	0.100055
8	20	-1741.825000	35.120632	70.755000	10.415000	0.296549
9	20	-1681.485000	37.046291	60.340000	82.720000	2.232882
10	20	-1703.865000	139.960856	-22.380000	1.525000	0.010896
11	20	-1727.770000	172.277100	-23.905000	81.270000	0.471740
12	20	-1670.405000	169.452115	57.365000	68.275000	0.402916
13	20	-1681.315000	133.740441	-10.910000	78.570000	0.587481
14	20	-1770.795000	308.431158	-89.480000	125.665000	0.407433
15	20	-1734.610000	315.006326	36.185000	25.920000	0.082284
16	20	-1672.505000	178.803381	62.105000	173.195000	0.968634
17	20	-1783.595000	339.322755	-111.090000	201.150000	0.592798
18	20	-1693.535000	134.622866	90.060000	105.530000	0.783894
19	20	-1709.005000	162.089149	-15.470000	21.260000	0.131162
20	20	-1745.735000	161.974066	-36.730000	—	—

Résumé

L'utilisation de la biodiversité dans le cadre de l'amélioration végétale présuppose une analyse des génotypes existants localement et adaptés à des environnements particuliers. Dans le cadre de l'amélioration de la culture de l'olivier « *Olea europaea.L* » nous avons réalisé une prospection et une collecte de cultivars provenant de différentes régions en Algérie (Collection et verger), ensuite déterminer des descripteurs phénotypiques, des marqueurs biochimiques et moléculaires capable d'identifier les cultivars ayant des traits intéressants pour une meilleure gestion et exploitation de ces ressources génétiques d'olivier en Algérie. Au total Vingt-trois descripteurs (quantitatifs et qualitatifs) morphologiques du COI, 11 paires d'amorces microsatellite polymorphes présélectionnées disponibles dans la littérature et treize paramètres analysés pour les huiles monovariétales ont été utilisés pour détecter la variabilité inter et intra-cultivars et identifié les paramètres les plus discriminatifs pour distinguer entre les cultivars d'oliviers locaux.

Neuf descripteurs quantitatifs relatif à l'endocarpe, le fruit, la feuille et sept descripteurs qualitatifs relatifs à l'endocarpe se sont avérés les plus discriminants car ils contribuent le plus dans la variabilité. Pour les caractères biochimiques de l'huile seul trois paramètres, le taux en acide oléique, le taux en acide gras insaturée et la teneur en polyphénol totaux sont discriminants et permettent la visualisation de trois groupes distincts de cultivars. Enfin grâce à ces 11 marqueurs microsatellites, nous avons pu mettre en évidence la diversité au sein de nos 26 cultivars ainsi que le rapprochement entre les neuf pools génétiques obtenus. L'utilisation des techniques moléculaires comme les microsatellites s'avère importante car elle est complémentaire à celle des descripteurs morphologiques et biochimique de l'huile.

Mots clés : olivier, diversité génétique, amorces microsatellite, descripteurs COI, huile monovariétale.

Abstract

The use of biodiversity in the context of plant breeding presupposes an analysis of existing genotypes locally adapted to particular environments. As part of improving the cultivation of the olive "*Olea europaea.L*" we conducted a survey and a collection of cultivars from different regions in Algeria (Collection and orchard), then determine phenotypic descriptors, biochemical and molecular markers able to identify cultivars with interesting features for better management and exploitation of genetic resources in Algeria. Altogether twenty-three morphological descriptors (quantitative and qualitative) of COI, 11 polymorphic microsatellite primers available in literature and thirteen parameters analyzed for monovarietal oils were used to detect the variability between and within cultivars and identified the most discriminative parameters to distinguish between local olive cultivars.

Nine quantitative descriptors on the endocarp, fruit, leaf, and seven qualitative descriptors related to the endocarp have proven to be the most discriminating because they contribute most to the variability. For the biochemical characteristics of the oil only three parameters, the rate of oleic acid, the rate in unsaturated fatty acid and total polyphenol content are discriminating and allow the visualization of three distinct groups of cultivars. Finally the 11 microsatellite markers were able to highlight the diversity within our 26 cultivars and the rapprochement between the nine gene pools obtained. The use of molecular techniques such as microsatellites proves important because it is complementary to the morphological and biochemical descriptors of oil.

Keywords: olive, genetic diversity, microsatellite primers, COI descriptors, monovarietal oil.

ملخص

إن استخدام التنوع البيولوجي في إطار التحسين النباتي يتطلب تحليلاً جينياً متواجداً محلياً و موافق لبيئات خاصة. في إطار تحسين زراعة الزيتون من نوعية *Olea europaea.L* لقد قمنا بعملية تنقيب وتجميع عدة أصناف من مختلف المناطق الجزائرية >تجميع وتشخيص< بعدها تحديد الوصفات المظهرية وكذا معلمات بيوكيماوية وجزئية قادرة على تحديد النوعيات التي تحتوي على خاصيات مهمة من أجل تسيير أحسن واستغلال أكمل لهذه الموارد الجينية للزيتون في الجزائر. هنالك ما مجموعه 23 مظهر شكلي (كمي وكيفي) خاص بالمجلس الدولي للزيتون "COI"، 11 زوجاً من الميكروساتيلات المعدة مسبقاً والمتوفرة في أعمال علمية سابقة و 13 عامل بيوكيماوي لسبع زيوت وحيدة الخاصة تم استخدامها من أجل التمييز بين أنواع الزيتون وتحديد من هم الأكثر تميزاً باختلافها على مواصفات مهمة من الناحية الزراعية. تسع مشخصات كمية ذات علاقة بالكارب الداخلي بالثمرة والورقة وسبع مشخصات كيفية ذات علاقة بالكارب الداخلي تم التأكد انهم أكثر تمييزية. بالنسبة للخاصيات البيوكيماوية للزيت هنالك ثلاث معاملات: تركيز حمض الاوليك، تركيز الاحماض الدسمة الغير مشبعة وكذا محتوى البوليفينول هم من يميزون بين ثلاث افواج مختلفة.

اخيراً بواسطة 11 ميكرو سات تمكنا من ايضاح التنوع داخل 26 صنف وكذا التقارب بين 9 تجمعات جينية . ان استخدام التقنيات الجزئية مثل ميكرو سات تعد بالغ الأهمية لأنها مكتملة للمشخصات المورفولوجيا وبيوكيماوية للزيت. **كلمات البحث:** الزيتون، والتنوع الجيني، ميكرو سات، واصفات COI، زيوت وحيدة الخاصة.