

# REPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



## MEMOIRE

Présenté pour l'obtention du diplôme de

## MASTER

## BIORESSOURCES ET AGRONOMIE

Option : Amélioration des ressources agricoles

Par

**CISSE Manohin**

## THEME:

---

**Analyse de la diversité génétique à partir des descripteurs de la graine et des marqueurs moléculaires (ISSR) de douze cultivars de mils originaire du Mali, du Burkina Faso et de la Côte d'Ivoire**

---

Date de soutenance : 30/09/2022

M. AYOLIE Koutoua, Maître de Conférences, UJLOG,

Président du jury

M. KONAN N'guessan Olivier, Maître de Conférences, UJLOG,

Directeur scientifique  
et Encadreur

M.GBOTTO Ahou Anique, Maitre-Assistant, UJLOG,

Examineur

Année Académique  
2021-2022

Numéro d'ordre :  
093-2022

## **DEDICACES**

Je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers :

À mon père Yacouba CISSE

À ma mère CISSE Nogodjuan

## REMERCIEMENTS

Ce mémoire est le fruit de l'intervention de nombreuses personnes, qui y ont apporté un appui scientifique, financier, moral et affectif. Ces personnes trouvent dans ces lignes l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à Madame **TIDOU Abiba Sanogo** épouse **KONE**, Professeur Titulaire d'Eco-toxicologie, Présidente de l'Université Jean Lorougnon Guédé de Daloa, pour son implication dans notre formation, pour sa hardiesse et la lutte qu'elle mène pour une Université prestigieuse.

A Monsieur **KONE Tidiani**, Professeur Titulaire d'Hydrobiologie, Vice-Président chargé de la pédagogie, de la vie universitaire, de la recherche, et de l'innovation technologique de l'Université Jean Lorougnon Guédé, pour son soutien dans l'insertion des étudiants à la vie universitaire et ses conseils tout au long de l'année universitaire.

A Monsieur **AKAFFOU Doffou Sélastique**, Professeur Titulaire de Génétique, Vice-Président de l'Université Jean Lorougnon Guédé chargé de la programmation et de la planification des relations extérieures, pour sa compétence et son expertise au service de l'Université.

A Madame **TONESSIA Dolou Charlotte**, Maître de Conférences en phytopathologie Directrice de l'UFR Agroforesterie, pour la qualité du travail et sa gestion rigoureuse de l'UFR.

A Monsieur **SOUMAHIN Éric** Maître-Assistant à l'Université Jean Lorougnon Guédé, responsable de la filière Bioressources du parcours Master, pour son effort qu'il n'a jamais cessé de déployer pour l'épanouissement et le développement de la recherche scientifique au sein du parcours qu'il dirige.

A Monsieur **KONAN N'guessan Olivier**, Maître de Conférences, pour avoir assuré l'encadrement et la direction scientifique de ce travail malgré ses nombreuses charges. Vous avez été pour moi une source de motivation, de courage, d'ambition et bien souvent de surpassement. Merci de m'avoir confié ce travail et d'avoir œuvré pour sa réalisation. Vous m'avez donné la confiance en soi, l'envie d'avancer et la volonté de faire en mieux. Vos qualités intellectuelles et humaines, votre amour pour le travail bien fait m'ont marqué. Merci pour vos conseils et vos encouragements généreusement offerts avec le sourire et la bonne

humeur. Je vous exprime mon admiration pour vos grandes qualités tant scientifiques qu'humain. Merci docteur.

J'adresse mes vifs remerciements aux membres du jury, qui ont bien voulu consacré une partie de leur temps à l'examen de mon travail :

A Monsieur **AYOLIE Koutoua**, Maître de Conférences, à l'Université Jean Lorougnon Guédé, d'avoir accepté de présider ce jury, malgré ses nombreuses occupations universitaires.

A Madame **GBOTTO Annique**, Maître de Conférences, à l'Université Jean Guédé d'avoir accepté d'exercer cette tâche en tant qu'examinatrice de ce mémoire.

Je remercie Professeur **YATTY** pour la disposition du matériel (appareil de labo).

Mes remerciements vont à l'endroit de Monsieur **KOUADIO Kouamé Leonard**, doctorant dans le laboratoire d'amélioration de la production agricole pour sa disponibilité ses conseils surtout pour son aide et son encouragement tout au long de cette étude.

Enfin, à tous nos camarades de promotion qui nous ont soutenus d'une manière ou d'une autre durant nos études dans la rédaction du présent document.

Que toutes les personnes que nous avons oubliées de citer trouvent dans ce dernier paragraphe nos sincères reconnaissances et nos remerciements distingués.

## TABLE DES MATIERES

|   |    |
|---|----|
| DEDICACES.....  | 1  |
| REMERCIEMENTS .....   | 2  |
| TABLE DES MATIERES .....  | 4  |
| LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES .....  | 6  |
| LISTE DES TABLEAUX.....   | 8  |
| INTRODUCTION .....  | 1  |
| GENERALITES .....   | 1  |
| 1.1 Origine, diversification et domestication .....                             | 4  |
| 1.2 Description systématique et éléments de Botanique .....                     | 4  |
| 1.3 Description de la plante.....   | 5  |
| 1.4 Exigences écologiques .....   | 7  |
| 1.5 Usages.....   | 8  |
| 1.6 Importance nutritionnel et économique du mil.....                           | 9  |
| 1.6.1 Importance nutritionnel .....   | 9  |
| 1.6.2 Importance économique .....   | 10 |
| 1.7 Analyse de la diversité génétique.....                                      | 10 |
| 1.7.1 Définition de la diversité génétique .....                                | 10 |
| 1.7.2 Étude de diversité.....   | 10 |
| 1.7.3 Marqueurs morphologiques.....   | 11 |
| 1.7.4 Marqueurs biochimiques.....   | 11 |
| 1.7.5 Marqueurs moléculaires.....   | 11 |
| 2. MATERIEL ET METHODES .....   | 15 |
| 2.1 Matériel .....  | 15 |
| 2.1.1 Matériel végétal .....  | 15 |
| 2.1.2 Matériel technique .....  | 16 |
| 2.1.2.1 Matériel technique utilisé au champ.....                                | 16 |
| 2.1.2.2 Matériels techniques utilisé au laboratoire.....                        | 16 |
| 2.2 METHODES .....  | 18 |
| 2.2.1 Caractérisation des semences de mil des différents cultivars étudiés..... | 18 |
| 2.2.2 Echantillonnage des feuilles des cultivars de mil .....                   | 20 |
| 2.2.3 Extraction d'ADN génomique des cultivars de mil .....                     | 21 |
| 2.2.4 Quantification et contrôle de la qualité des ADN extraits.....            | 23 |
| 2.2.4.1 Méthode spectrophotométrique : utilisation du NanoDrop.....             | 24 |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.2.4.2 | Méthode de l'électrophorèse sur gel d'agarose .....   | 24 |
| 2.2.5   | Amplification des ADN de mil par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) .....                         | 26 |
| 2.2.6   | Révélation des fragments de l'amplification PCR sur gel d'agarose .....                                   | 27 |
| 2.2.7   | Lecture des gels issus de l'électrophorèse .....  | 28 |
| 2.2.8   | Analyse statistique des données .....   | 28 |
| 3.      | RESULTATS ET DISCUSSION .....   | 30 |
| 3.1     | RESULTATS .....   | 30 |
| 3.1.1   | Caractérisation phénotypique des graines des cultivars de mils étudiés .....                              | 30 |
| 3.1.1.1 | Variabilité des paramètres quantitatifs .....   | 30 |
| 3.1.1.2 | Variabilité des paramètres qualitatifs .....  | 31 |
| 3.1.2   | Analyse multi variée des caractères phénotypiques des graines des mils étudiés .....                      | 32 |
| 3.1.2.1 | Analyse en composantes principales (ACP) .....  | 32 |
| 3.1.2.2 | Analyse de la distance génétique entre les cultivars sur la base des caractères<br>phénotypiques .....    | 34 |
| 3.1.2.3 | Quantité et qualité des ADN extraits .....  | 36 |
| 3.1.2.4 | Analyse des profils ISSR et niveaux de polymorphismes .....   | 36 |
| 3.1.2.5 | Analyse de la diversité génétique des populations de mil à travers les statistiques<br>descriptives ..... | 39 |
| 3.1.2.6 | Différenciation génétique et flux de gènes des populations .....  | 39 |
| 3.1.2.7 | Relation génétique entre les douze cultivars de mils étudiés .....  | 40 |
| 3.2     | Discussion .....  | 43 |
|         | Conclusion .....  | 47 |
|         | Références .....  | 48 |

## LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES

**A** : Adénine

**ACP** : Analyse en Composantes Principales

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AMOVA** : Analyse de la Variance Moléculaire

**ANOVA** : Analyse de variance

**ARN** : Acide Ribonucléique

**BET**: Bromure d'éthidium

**BF**: Burkina Faso

**C** : Cytosine

**CAH** : Classification Ascendante Hiérarchique

**CI** : Côte d'Ivoire

**CNRA** : Centre National de Recherche Agronomique

**ColGr** : Couleur des Graines

**CovGr** : Couverture des Graines

**CP** : Composante Principale

**DO** : Densité Optique

**DG** : Distance Génétique

**FAO** : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture

**FAOSTAT**: Base de données statistiques de l'organisation des Nations Unis pour l'alimentation et l'agriculture

**FoGr** : Forme des Graines

**G** : Guanine

**GST** : Coefficient de différenciation génétique

**GST** : Différenciation Génique

**He** : diversité génétique de Nei

**Hs** : Diversité génétique intra-population moyenne

**HSD** : Différence honnêtement significative

**Ht** : Diversité Génétique Totale

**I** : index d'information de Shannon

**IBPGR**: Conseil international des ressources phylogénétiques

**ICRISAT**: Institut international de recherche sur les cultures des zones tropicales semi-arides

**IDT** : Technologie intégré de l'ADN

**ISSR** : Répétition de la séquence inter-simple

**LargGr** : Largeur de la Graine

**LongGr** : Longueur de la Graine

**ML** : Mali

**Na** : Nombre d'allèles observé

**Nb LP** : Nombre de Loci Polymorphes

**Ne** : Nombre effectif d'allèles

**Nm** : Flux génétique

**P100Gr** : Poids de 100 Graines

**PCR** : Réaction en chaîne par polymérase

**PPL** : Pourcentage de Loci Polymorphes

**RNase** : Ribonucléase

**SG** : Similarité Génétique

**T** : Thymine

**TBE** : Tris Borate EDTA

**UjLoG** : Université Jean Lorougnon Guédé



## **LISTE DES TABLEAUX**

|   |    |
|---|----|
| Tableau I: Différents cultivars de Mil étudiés .....  | 15 |
| Tableau II: Amorces utilisées avec leur caractérisation .....   | 26 |
| Tableau III: Variation de caractères quantitatifs des grains de mils étudiés .....  | 31 |
| Tableau IV: Variation des caractères qualitatifs observés sur les graines de mils étudiés.....  | 32 |
| Tableau V: Coefficient de corrélation entre les caractères phénotypes.....  | 32 |
| Tableau VI: Analyse en composante principale des caractères phénotypiques .....   | 33 |
| Tableau VII: Matrice de distances Manhattan entre les paires de cultivars de mils étudiées...   | 35 |
| Tableau VIII: Concentrations (ng/ $\mu$ l) et pureté (DO 260/280) des extraits d'ADN des cultivars de mils étudiés.....   | 36 |
| Tableau IX: Nombre de loci et pourcentage de polymorphisme générés dans la population total de Mils.....  | 37 |
| Tableau X: Nombre de loci et pourcentage de polymorphisme générés dans chaque population de Mils étudiée .....  | 38 |
| Tableau XI: Valeurs des paramètres de diversité génétique estimés par le logiciel PopGene pour chaque population de mils.....   | 39 |
| Tableau XII: Mesure non biaisées de la similitude génétique (au-dessus de la diagonale) et de la distance génétique (en-dessous de la diagonale) de Nei entre les trois populations de mil étudié ..... | 40 |
| Tableau XIII: Matrice de distance génétique présentant les coefficient de dissimilarité de Jaccard entre les douze cultivars de mil sur base des données ISSR .....                                     | 42 |

## **LISTE DES FIGURES**

|   |    |
|---|----|
| Figure 1: Présentation schématique du pied, du grain et de l'épi du mil .....   | 6  |
| Figure 2: Photo présentant des panicules de mil .....   | 7  |
| Figure 3: Principe général de l'utilisation des marqueurs moléculaires pour la comparaison d'individus.....                                 | 13 |
| Figure 4: ISSR microsatellite présentant différentes répétitions (9, 13 et 11) du motif CA.....   | 13 |
| Figure 5: Fragment schématique d'ADN présentant des microsatellites (SSR) et des régions inter microsatellites (ISSR) .....                 | 14 |
| Figure 6: Semences des différents cultivars de mil étudiés .....  | 15 |
| Figure 7: Matériel techniques au champ.....   | 16 |
| Figure 8: Quelques matériels techniques utilisés au laboratoire .....   | 17 |
| Figure 9: Différentes formes possibles des graines de mil.....  | 19 |
| Figure 10: Différents types possible de couverture des graines de mil .....   | 20 |
| Figure 11: Parcelle expérimentale utilisée pour le prélèvement des feuilles des cultivars de mil étudiés .....                              | 20 |
| Figure 12: Prélèvement de feuilles de mil pour l'extraction d'ADN .....   | 21 |
| Figure 13: Quelques étapes de l'extraction de l'ADN des cultivars de mil étudiés.....   | 23 |
| Figure 14: Utilisation NanoDrop pour la quantification et le contrôle de la qualité des extraits d'ADN des cultivars de mil étudiés.....    | 24 |
| Figure 15: Quelques étapes du dosage sur gel d'agarose des extraits d'ADN de mil étudié ...   | 25 |
| Figure 16: Quelques étapes de la manipulation pour la réalisation de la PCR.....  | 27 |
| Figure 17: Produits d'amplification PCR en migration dans une cuve d'électrophorèse.....  | 28 |
| Figure 18: Projection des caractères et des cultivars de mils sur le plan factoriel de l'ACP : .  | 34 |
| Figure 19: Dendrogramme des 12 cultivars de mil basé sur les distances de Manhattan .....   | 35 |
| Figure 20: Visualisation des ADN génomiques extraits des douze cultivars de mils étudiés :  | 36 |
| Figure 21: Profils électrophorétique obtenus chez les 12 cultivars de mils étudiés .....  | 37 |
| Figure 22: Pourcentage de variance moléculaire (AMOVA).....   | 40 |
| Figure 23: Analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur les données ISSR.....  | 41 |
| Figure 24: Arbre non enraciné construit sur la base des coefficients de dissimilarité de Jaccard et de la méthode du neighbor-joining ..... | 42 |

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Le mil, *Pennisetum glaucum* (L.) R. Br., est une graminée annuelle de un à trois mètres de hauteur, originaire d'Afrique de l'Ouest. Il est connu en Côte d'Ivoire sous les noms de « gnon » ou « sagnon » en dioula, « suguélé » en senoufo ou « djoufous » en lobi. C'est une céréale particulièrement bien adaptée aux conditions de culture difficiles des régions sèches (sols pauvres, températures élevées, précipitations irrégulières) (Onsarigo & Kiambi, 2018). Par cette adaptation particulière, le mil supplante comme le maïs, le sorgho et le fonio ; ce qui en fait une excellente source de sécurité alimentaire pour de nombreuses populations des régions arides et semi-arides d'Afrique subsaharienne et d'Inde.

Le mil constitue l'aliment de base de nombreuses populations dans le monde. Il est la sixième céréale la plus importante, produite annuellement dans le monde après le blé, le riz, le maïs, l'orge et le sorgho (Sharma, 2001). Sa production annuelle mondiale est estimée à 30 463 642 tonnes avec comme principaux pays producteurs l'Inde (12 490 000 tonnes), le Niger (3 508 903 tonnes), la Chine (2 300 499 tonnes), le Nigéria (2 000 000 tonnes), et le Mali (1 921 171 tonnes) (FAOSTAT, 2020). La production annuelle ivoirienne s'élève à environ 70 000 tonnes (FAOSTAT, 2020). En Côte d'Ivoire, le mil représente la troisième céréale cultivée et consommée après le riz et le maïs (CNRA, 2005)

Sur le plan nutritionnel, le mil est particulièrement riche en protéines (11% de protéines, soit le même taux que le blé). Il contient aussi des vitamines B et des nutriments essentiels comme, le phosphore, le magnésium, le fer, le calcium et le zinc (Ramulu & Rao, 2003). La valeur nutritionnelle du mil est même supérieure à celle du riz, du sorgho et du maïs (Saritha *et al.*, 2017). Sa consommation est particulièrement recommandée pour les femmes enceintes, les enfants, les personnes âgées, les personnes souffrant d'anémie, de constipation (Ramulu & Rao, 2003), ou du cancer (Nambiar *et al.*, 2011a ; Amadou *et al.*, 2013). En Afrique et particulièrement en Côte d'Ivoire, outre les bières locales, plus d'une dizaine de mets sont issues de la transformation du grain : pâte (kourbakourba, tô), boule (donou), couscous, bouillie, dèguè, beignets etc. (Amadou *et al.*, 2013).

Hormis les grains, les autres parties de la plante de mil sont aussi exploitées: les glumes et les tiges sont utilisées comme combustibles; les tiges seules pour l'alimentation du bétail ou comme matériaux de construction ou d'art; les racines sont utilisées en médecine traditionnelle (McBenedict, 2015). Le mil procure aussi des revenus importants aux producteurs et aux commerçants de sa filière.

Le mil est incontestablement une culture importante, qui pourrait jouer un rôle essentiel dans les programmes d'amélioration de l'alimentation ainsi que dans les programmes de lutte contre l'insécurité alimentaire et la pauvreté. Mais plus encore, cette céréale se trouve aujourd'hui, au centre d'enjeux planétaires importants tels que le réchauffement de la planète. En effet, si ce réchauffement devait s'accompagner d'une extension majeure des zones semi-arides et arides, comme le prédisent plusieurs modèles, le mil pourrait devenir une des cultures majeures de la lutte contre la sécheresse et la faim. Ses caractéristiques génétiques pourraient alors s'avérer bien utiles pour les programmes d'amélioration génétique dans le monde entier. Cependant, en Côte d'Ivoire, cette plante importante fait encore partie des céréales secondaires qui bénéficient de beaucoup moins d'attention scientifique et gouvernementale que la paire riz-maïs. En conséquence, non seulement les surfaces cultivées en mil s'amenuisent, faisant craindre un risque d'érosion génétique, mais en outre, la culture souffre d'une série de problèmes de production, tels que la sensibilité aux maladies, le faible rendement et le cycle de production trop long des cultivars actuels. Ces problèmes impactent négativement le rendement net, et de ce fait, la production nationale ne satisfait pas la demande intérieure annuelle estimée à 120 000 tonnes (CNRA, 2005). Dans ce contexte, il urge de fournir aux producteurs de mil, des variétés améliorées plus productives, plus résistants au bio-agresseurs, et plus précoces. Un tel travail passe par la connaissance préalable de la diversité génétique de cette culture qui constitue une étape importante dans le développement de variétés élites. Au-delà des marqueurs morphologiques qui peuvent être influencé par l'environnement, les marqueurs moléculaires sont reconnus comme étant un instrument puissant pour évaluer la variabilité génétique et les corrélations entre les accessions d'une ressource génétique donnée. En Côte d'Ivoire, à part quelques rares travaux sur la caractérisation agromorphologique du mil (Ankanvou, 2012) il n'y a pas encore eu d'études de caractérisation moléculaire de géotypes de *P. glaucum*. Cette étude vise donc à évaluer la diversité génétique à partir des descripteurs de la graine et des marqueurs moléculaires (ISSR) de douze cultivars de mil ivoiriens, maliens, et burkinabés. Plus spécifiquement il s'agit de :

1. Caractériser les cultivars de mil étudiés à l'aide de descripteurs de la graine ;
2. Caractériser au moyen des marqueurs moléculaires ISSR les cultivars de mil
3. Déterminer la diversité génétique et les relations génétiques entre ces cultivars

Ce document, outre l'introduction et la conclusion suivie de quelques perspectives, s'articulera autour de trois parties. La première partie sera consacrée aux généralités sur le millet à l'analyse de la diversité génétique. Le matériel et la méthodologie d'étude employés

seront exposés dans la deuxième partie. La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus ainsi qu'à leur discussion.

# **GENERALITES**

## GENERALITES

### 1.1 Origine, diversification et domestication

L'origine probable du mil est située dans la partie centrale du désert du Sahara en Afrique de l'Ouest. Les évidences archéologiques ont été la découverte d'un grand nombre de graines de mil dans les ruines de Birimi dans le nord du Ghana (Manning *et al.*, 2011). Le résultat de la datation par le carbone radio-isotope a permis d'estimer que la plante a pu être cultivée dans cette région environ 2500 à 3500 avant J-C (D'Andrea *et al.*, 2001). Le mil domestiqué en Afrique de l'Ouest s'est propagé rapidement pour atteindre l'Inde 3000 avant J-C où différents cultivars ont été mis au point faisant de cette région le 2ème centre de diversification (Manning, 2010). C'est en Afrique de l'Ouest que la domestication est la plus avancée, ce qui laisse présager que cette région est le premier centre de domestication du mil. Aujourd'hui la plus grande diversité morphologique du mil se trouve au sud de l'Afrique de l'Ouest, au nord de la zone de forêt (Marchais *et al.*, 1993).

### 1.2 Description systématique et éléments de Botanique

La classification du mil selon Selon Brunken (1977) est la suivante :

|               |  |
|---------------|--|
| Règne végétal | : Plantae                              |
| Embranchement | : Magnoliophyta                        |
| Classe        | : Liliopsida                           |
| Ordre         | : Poales                               |
| Famille       | : Poaceae (ancienne Graminées)         |
| Sous-famille  | : Panicoideae                          |
| Tribu         | : Paniceae                             |
| Genre         | : <i>Pennisetum</i>                    |
| Espèce        | : <i>Pennisetum glaucum</i> (L.) R. Br |

Le genre *Pennisetum* comprend environ 80 espèces réparties dans toutes les régions tropicales. Le mil (*Pennisetum glaucum*) n'est pas étroitement apparenté à la plupart des autres espèces de *Pennisetum*, ce qui ne l'empêche pas de produire facilement des hybrides avec l'herbe à éléphant (*Pennisetum purpureum* Schumach., tétraploïde à  $2n = 28$ ). Le mil est une espèce diploïde avec sept paires de chromosomes (Manning *et al.*, 2011). La taille de son génome est d'environ 2,4 pg, comparable à celui du maïs. C'est une plante sexuée, hermaphrodite, allogame préférentielle grâce à une protogynie prononcée et anémophile.



L'ensemble de ces caractéristiques lui confère une grande hétérogénéité tant morphologique que génétique. Quatre groupes de cultivars (décrits au départ comme des races) peuvent être distingués chez le mil; ils reposent essentiellement sur la morphologie du grain et en partie sur leur répartition :

- Groupe Typhoides : grain obovoïde, à section circulaire, de 2,5–5,5 mm × 1,5–3 mm × 1–2,5 mm, inflorescence cylindrique ou ellipsoïdale, généralement de moins de 0,5 m de long ; c'est le groupe le plus primitif, le plus variable et à la répartition la plus vaste ; présent dans toute l'aire du mil en Afrique et en Inde, c'est probablement l'ancêtre des autres groupes.

- Groupe Globosum : grain globuleux, de plus de 2,5 mm de diamètre, inflorescence cylindrique, dépassant souvent 1 m ; très répandu dans le Sahel à l'ouest du Nigeria.

- Groupe Leonis : grain à contour oblancéolé, à section circulaire, de 4–6,5 mm × 2–2,5 mm × 2–2,5 mm, apex aigu, inflorescence cylindrique ; il s'agit du groupe dont l'aire est la plus restreinte, cultivé en Mauritanie, au Sénégal et en Sierra Leone.

- Groupe Nigritarum : grain obovoïde mais à section anguleuse, de 3–5 mm × 1,5–2,5 mm × 1,5–2 mm, inflorescence cylindrique ; très répandu dans les régions semi-arides du Nigeria au Soudan.

Sur le plan agronomique, on reconnaît en Afrique de l'Ouest deux principaux groupes de cultivars, sur la base de leur cycle de croissance : les cultivars du type Gero (ou Souna) à cycle court et les cultivars du type Maiwa (ou Sanio) à cycle long. Les cultivars Gero, moins sensibles à la photopériode, sont plus couramment cultivés et présentent une plus grande diversité génétique que les cultivars Maiwa, chez lesquels la date de floraison dépend fortement de la longueur du jour. Les types Maiwa sont cultivés dans les régions où la saison des pluies est plus longue et où le sorgho est la céréale principale, mais sur des sols plus pauvres et plus sujets à la sécheresse. Certains mils Maiwa, connus sous le nom de mils Dauro, sont semés en pépinière et repiqués au champ.

### **1.3 Description de la plante**

Le mil est une plante à port érigé, possédant des tiges épaisses et à hauteurs variant de 1,5 à 3 m (Figure 1), mais on peut trouver des mils de près de 4 mètres (Moumouni, 2014). L'appareil racinaire est de type fasciculé avec une seule racine séminale principale suivie de nombreuses racines adventives. Une des causes de la bonne adaptation du mil aux conditions pédoclimatiques de la zone semi- aride est son développement racinaire important, pouvant atteindre 300 cm de profondeur à la récolte (Ahmadi *et al.*, 2002 ; ROCAFREMI, 2002). Les

tiges du mil sont dressées et rigides avec des entre-nœuds pleins (Bouzou, 2009). Les entre-nœuds de la base s'allongent en dernier et sont plus courts. Les nœuds de la base sont



Figure 1: Présentation schématique du pied, du grain et de l'épi du mil. Source : <https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Mil/1002036>

Capables de donner des talles secondaires et tertiaires. Les nombres de talles productives varient de 1 à 7 (Anonyme, 2004). Le mil émet parfois des ramifications sur les nœuds supérieurs de la tige et donnent des panicules de petites dimensions (Illiassou, 2009). Les feuilles alternes et à nervures parallèles s'insèrent au niveau des nœuds. Elles sont formées d'une gaine entourant complètement la tige et d'un limbe lancéolé (Anonyme, 2004). Ses feuilles sont longues, glabres, assez minces, lisses ou poilues et mesurent jusqu'à 1 m de long. L'inflorescence est une panicule apicale raide, compacte des formes cylindrique et conique (Figure 2). Elle a généralement 2 à 3 cm de diamètre mais peut atteindre jusqu'à 18 cm de diamètre et 15 à 45 cm de longueur. Cependant, certains cultivars locaux (Zongo du Niger) peuvent atteindre 150 cm (Anonyme, 2004 ; Moumouni, 2014). La panicule est constituée par un rachis (axe central), droit, cylindrique, dur et épais de 8 à 9 mm. Il s'étend sur toute la longueur de l'inflorescence. Il est recouvert de poils doux et courts (Kadri ; 2019).



Figure 2: Photo présentant des panicules de mil. (Upadhyaya, 2008)

Les fruits sont des caryopses enveloppés dans des glumes et glumelles. Les graines sont de 3 à 5 mm de long, ovale à globuleuses, (IBPGR & ICRISAT, 1993). Leur couleur varie du gris cendre à légèrement bleue. Certaines variétés sont de couleur brun-grise, brun-jaune et même noire.

#### **1.4 Exigences écologiques**

En Afrique de l'Ouest, depuis les oasis du désert du Sahara (sous irrigation) jusqu'au nord du Sahel (qui se caractérise par 250 mm de précipitation annuelle), on trouve des cultivars de mil insensibles à la photopériode et mûrissant en 55–65 jours. Dans la zone où les précipitations sont de 250–400 mm, où des températures très élevées sont courantes, en particulier au moment de la plantation, c'est la céréale dominante. La température optimale pour la germination des graines de mil est de 33–35°C ; aucune germination n'a lieu en dessous de 12°C. Pour la production et le développement des talles, la température optimale est de 21– 24°C, et pour l'induction et le développement des épillets elle tourne autour de 25°C. Des températures extrêmement élevées avant l'anthèse diminuent la viabilité du pollen, la taille des panicules et la densité des épillets, ce qui réduit les rendements.

C'est une plante de pleine lumière à jours courts. La quantité ainsi que la répartition des pluies est très importante. De 600 à 1000 mm de pluies, on trouve surtout les mils tardifs. De 350 à 600 mm, on trouve des mils hâtifs. Le mil peut résister à la sécheresse en début de végétation et les besoins en eau sont importants depuis la montaison jusqu'à la maturité avec un maximum à l'épiaison. Une sécheresse au cours de la montaison, de la floraison et de la

maturation peut entraver la formation des grains. Cependant, c'est une céréale plus résistante à la sécheresse que le sorgho et le maïs et peu exigeante sur la nature du sol.

Presque toutes les terres conviennent à sa culture à condition qu'elles ne soient pas imperméables et gorgées d'eau. Le mil supporte toutes sortes de types de sols, en particulier les sols légers et acides. Son système racinaire dense et étendu lui permet de pousser sur des sols pauvres en nutriments. Le mil ne tolère pas l'asphyxie racinaire, les excès d'eau ; le sol doit être drainé et aéré. C'est sur les terres légères qu'il donne les meilleurs résultats. . Une fois établie, la culture est relativement tolérante à la salinité. (SAINT-CLAIR, 1987).

## **1.5 Usages**

### **❖ *Alimentation humaine***

Le mil est l'aliment de base de plus d'une centaine de millions de personnes dans certaines parties de l'Afrique tropicale et de l'Inde. Décortiqué et réduit en farine, il se consomme sous la forme d'une bouillie consistante (le "tô") ou d'un gruau en Afrique, ou d'un pain non levé (le "chapatti") en Inde. Dans plusieurs préparations en Inde, ce sont les graines grillées que l'on utilise. En Afrique, il existe d'autres préparations telles que le couscous, des produits qui rappellent le riz, des amuse-gueule faits de mélanges avec des légumes secs, le dèguè (mélange avec du lait), ainsi que des boissons fermentées et non fermentées. Aujourd'hui la farine de mil est utilisée pour la confection industrielle de plusieurs formes d'aliments pour bébé et enfants.

### **❖ *Alimentation animale***

Les tiges du mil sont utilisées comme fourrage pour l'alimentation du bétail. En dehors de l'Afrique et de l'Inde, le mil se cultive surtout en tant que fourrage vert pour l'ensilage, le foin et la pâture.

### **❖ *Matériaux de construction et d'œuvre d'art***

Les tiges du mil s'emploient couramment comme matériaux entrant dans la construction des greniers, des maisons, des clôtures. Ils sont aussi utilisés pour la fabrication de toitures, de portes, de lits traditionnels ou pour la confection de nombreux œuvres d'arts.

### **❖ *Production d'éthanol***

Les biomasses utilisées pour la fabrication d'éthanol peuvent se distinguer en fonction de la matière première, soit les biomasses amylacées, sacchariques et cellulosiques. La biomasse cellulosique dont le mil sucré fait partie, est avantageuse, du fait que l'efficacité de la fermentation et le bilan énergétique sont supérieurs à ceux des biomasses amylacées. Le mil sucré a été dès lors utilisé pour produire de l'éthanol au Canada (Bernardes, 2012).

### ❖ *Santé humaine*

En médecine traditionnelle africaine, le grain était jadis appliqué pour soigner les problèmes pulmonaires, la lèpre, la blennorragie et les empoisonnements, et le grain broyé servait de vermifuge pour les enfants. Une décoction de racine se boit pour traiter la jaunisse ; la vapeur d'extraits de l'inflorescence est prise en inhalation par les enfants souffrant de maladies respiratoires. La richesse des grains de mil en calories fait d'ailleurs que sa consommation est spécialement recommandée aux enfants, aux convalescents, aux personnes âgées et aux femmes enceintes (Bekoye, 2011). La consommation du mil est également très indiquée pour les personnes souffrant d'anémie. Le mil contient une quantité élevée de fer (8mg/100g) et de Zinc (3,1mg/ 100g) (NIN, 2003), qui peut aider à augmenter le taux d'hémoglobines. La teneur élevée en fibres (1,2g/100g) du mil peut être largement utilisé pour préparer des aliments pour les personnes qui ont besoin d'alimentation riche en fibres, en particulier, il est utile dans le traitement de l'obésité et des problèmes de constipation (Ramulu & Rao, 2003). Le mil contient un niveau élevé de composés phénoliques antioxydants surtout des flavonoïdes, pouvant inhiber le développement des tumeurs par conséquent, ceux-ci peuvent avoir des propriétés anticancéreuses. Ces composés sont concentrés dans le péricarpe et les testas. Étant donné que traditionnellement, l'ensemble du grain du mil est moulu, les produits fabriqués à base de la farine offriraient des bienfaits pour la santé par les flavonoïdes et les phénols (Nambiar *et al.*, 2011a).

### ❖ *Nématicide*

Depuis que l'on a découvert que le mil était capable de faire disparaître les nématodes des lésions de racines (*Pratylenchus penetrans*), on l'utilise de plus en plus au Canada en remplacement de la fumigation du sol dans la culture du tabac et de la pomme de terre.

### ❖ *Autres usages*

Outre les usages communément connus, les tiges de mil (chaumes) sont utilisées pour servir de combustible et les tiges fendues en deux sont utilisées en vannerie. Dans certaines régions, les grains sont utilisés dans des rituels.

## **1.6 Importance nutritionnel et économique du mil**

### **1.6.1 Importance nutritionnel**

Comparé aux autres céréales telles que le riz, le blé et le maïs, le mil a une valeur nutritionnelle élevée (Gupta, 2009; Amadou *et al.*, 2013). Il est riche en vitamines B, en potassium, phosphore, magnésium, fer, zinc, cuivre et manganèse (Ramulu & Rao, 2003), la valeur nutritionnelle du mil est supérieure à celle du riz, du sorgho et du maïs (Saritha *et al.*,

2017). Le mil assure la sécurité alimentaire avec une dizaine de repas issues de la transformation du grain (pâte (kourbakourba), boule (donou), couscous, bouillie, dégué, beignets) chez 85% de la population (Amadou *et al.*, 2013).

## **1.6.2 Importance économique**

Sa production mondiale est estimée à 30 463 642 tonnes avec une superficie de 32 117 837 ha (FAOSTAT, 2020). En Afrique, on note une production de 13 806 107 tonnes pour 19 723 660 ha (FAOSTAT, 2020). Les cinq premiers pays producteurs en 2020 ont été: Inde (12 490 000 tonnes), Niger (3 508 903 tonnes), Chine (2 300 499 tonnes), Nigéria (2 000 000 tonnes), Mali (1 921 171 tonnes) (FAOSTAT, 2020). En Cote d'Ivoire, selon la FAOSTAT, la production annuelle du mil s'élevait à 69 465 tonnes en 2020 avec une superficie de 82 525 d'hectare et le Burkina Faso est à 957 000 tonnes.

Le mil procure, aussi, des revenus importants aux producteurs et aux commerçants de la filière.

## **1.7 Analyse de la diversité génétique**

### **1.7.1 Définition de la diversité génétique**

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes d'un individu, d'une population, d'une espèce ou d'une communauté. En d'autres termes, la diversité génétique est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique. La diversité génétique représente le fondement de la biodiversité (Parizeau, 1997). La diversité génétique est extrêmement importante car elle représente le matériel de base sur lequel peut agir la sélection. Elle peut de plus se concevoir comme une assurance permettant l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales (Lewin, 1992).

### **1.7.2 Étude de diversité**

L'utilisation de la diversité dans un programme de sélection passe inévitablement par son estimation et par le choix du type de marqueur susceptible de la traduire le plus fidèlement possible. En effet, les différentes méthodes d'analyse de la diversité génétique sont basées sur des marqueurs qui renseignent sur le niveau de polymorphisme génétique (De Vienne, 1998). Trois types de marqueurs sont largement utilisés pour l'évaluation de la variabilité génétique. Ce sont les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires. Ces marqueurs sont utilisés pour la caractérisation des individus. Ils permettent de connaître la diversité génétique des organismes et de les classer à partir des analyses.

### **1.7.3 Marqueurs morphologiques**

Les marqueurs morphologiques font partie des premiers outils utilisés dans la gestion de germoplasme (Stanton *et al.*, 1994). Etablis sur la base des caractères morphologiques, ils permettent de distinguer les individus grâce à leurs caractéristiques phénotypiques, comme par exemple le cycle de maturité, le rythme de croissance, la forme des feuilles, la pilosité, etc. (Pernès, 1984 & Van der Maesen, 1990). Ils sont d'utilisations faciles, moins chers et permettent d'examiner et de classer de grandes quantités de germoplasme (FAO, 1995). Quoiqu'ils soient d'un grand intérêt dans les études de diversité génétique (Anderson *et al.*, 2006), ces marqueurs ont, cependant, beaucoup de limites. Ils sont en nombre limité, rarement codominants, non neutres, peu polymorphes et souvent influencés par des facteurs environnementaux (De Vienne & Santoni, 1998 ; Matus & Hayes, 2002).

### **1.7.4 Marqueurs biochimiques**

C'est grâce à la technique de l'électrophorèse sur gel qu'il a été possible d'utiliser les marqueurs biochimiques qui mettent en évidence les variantes protéiques (allozymes). Cette technique est basée sur une migration différentielle des protéines à travers un gel sous l'effet d'un champ électrique. La migration est alors fonction de la conformation et du poids moléculaire des protéines et de la charge électrique globale. Les études des allozymes deviennent alors un outil standard pour l'analyse de la variation biochimique et fournissent le premier moyen non biaisé d'estimer la variabilité du génome (Harry, 2001). Ils révèlent le polymorphisme de séquences de certaines protéines et donc, de façon indirecte le polymorphisme des séquences d'ADN à partir desquelles les protéines sont traduites. Les marqueurs biochimiques sont considérés généralement comme neutres vis-à-vis des conditions environnementales (Ouazzani *et al.*, 1993).

Les marqueurs biochimiques ont été largement utilisés pour des études de diversité génétique et de génétique des populations. Cependant, les marqueurs biochimiques présente le défaut de ne pas être toujours suffisamment polymorphes pour permettre l'étude des populations (Harry, 2001).

### **1.7.5 Marqueurs moléculaires**

L'ADN, constituant des chromosomes, contient l'information génétique d'un individu. L'ADN est constitué de 4 bases azotées Adénine (A), Thymine (T), Guanine (G) et Cytosine (C). L'ordre de succession de ces bases tout le long des chromosomes constitue l'information génétique contenue dans l'ADN. Il existe, entre deux variétés et même à l'intérieur d'une

même variété, une multitude de différence dans cet ordre de succession : il peut s'agir de la substitution ponctuelle d'une base par une autre ou encore de l'insertion d'un fragment d'ADN en un lieu précis du chromosome. L'utilisation d'un marqueur moléculaire permet de visualiser l'une, voire plusieurs de ces différences. Ainsi, les marqueurs moléculaires correspondent à des différences nucléotidiques existant au niveau de la molécule d'ADN (d'où le terme moléculaire). Ils révèlent donc directement le polymorphisme de l'ADN, les séquences ciblées correspondant ou non à des séquences codantes. En définitif, le marqueur moléculaire pourrait être défini comme « un locus polymorphe » capable de renseigner sur le génotype de l'individu qui le porte (Samouelian *et al.*, 2009).

Il existe différents types de marqueurs moléculaires correspondant à différentes techniques. Le principe de base est toutefois identique. Pour comparer, par exemple, les empreintes génétiques de deux variétés, l'ADN est extrait des cellules à partir d'un échantillon de feuilles (Figure 3). Au sein de cet ADN, la ou les séquences cibles sont multipliée en des millions de copies par un procédé appelé PCR (Polymerase Chain Reaction). Enfin, la différence de taille entre les séquences des deux variétés est mise en évidence par électrophorèse : les molécules d'ADN se déplacent dans un gel sous l'influence d'un courant électrique ; la vitesse de déplacement étant fonction de la taille des fragments. Chaque marqueur moléculaire va donc donner une empreinte génétique de chaque variété ; cette empreinte peut se comparer à un code barre permettant d'identifier la variété. Les marqueurs moléculaires permettent donc de caractériser un génome de manière fiable, spécifique et rapide (De Vienne, 1998). Ils évitent nombre de complications dues aux effets environnementaux agissant sur les caractères en regardant directement la variation existant au niveau de l'ADN. Les marqueurs moléculaires sont donc très utiles pour l'examen et la sélection de ressources génétiques dans les programmes de sélection (De Vienne, 1998).



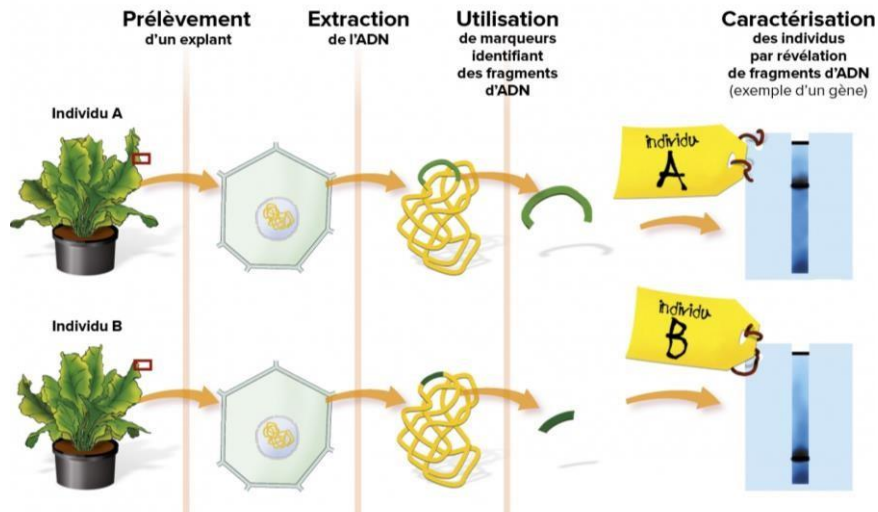


Figure 3: Principe général de l'utilisation des marqueurs moléculaires pour la comparaison d'individus (source : Gnis, 2018)

### ❖ Marqueurs ISSR

Parmi les différents types de marqueurs moléculaires disponibles (RFLP, AFLP, RAPD, SSR, ISSR, SNP, etc.), les marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat ou amplification des régions inter-microsatellites) sont utiles pour l'évaluation de la diversité génétique en raison de leur simplicité et de leur coût relativement faible par rapport aux autres marqueurs moléculaires. Cette technique, principalement développée par Zietkiewicz *et al.* (1994) et Wu *et al.* (1994) est basée sur l'amplification par PCR des régions entre les microsatellites. Un microsatellite (SSR : Simple Sequences Repeats) est une séquence d'ADN constituée de répétitions d'un petit motif de 2, 3 ou 4 bases (Figure 4).

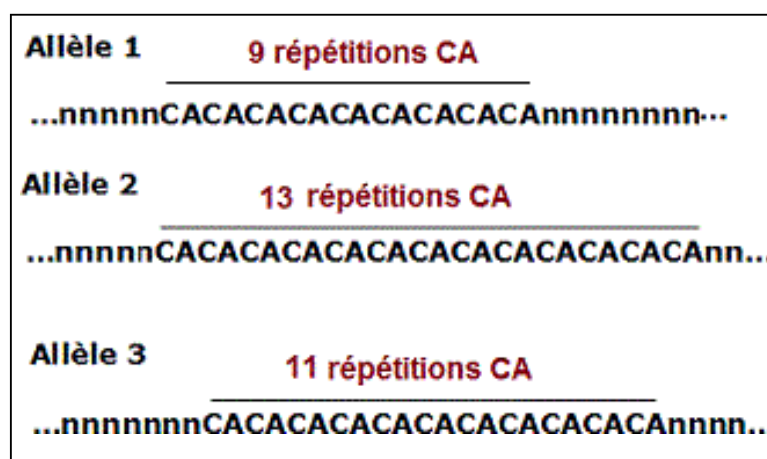


Figure 4: ISSR microsatellite présentant différentes répétitions (9, 13 et 11) du motif CA (Source : Tagu, 1999)

Les SSR sont très variables et distribués régulièrement le long du génome de toutes les espèces animales et végétales. Ce type de séquence, très fréquent dans l'ADN présente une variabilité élevée entre variétés (différences au niveau du nombre de répétitions du motif). Contrairement au SSR, les ISSR sont les régions présentes entre les répétitions microsatellites (Figure 5) et la technique ISSR vise l'amplification dans ces régions. Dans cette technique on, utilise une amorce constituée d'une séquence de microsatellites et parfois d'une partie arbitraire (amorces ancrées, en 5' ou en 3'). Par la suite, en effectuant une simple PCR, il y aura amplification de fragments flanqués de microsatellites. Contrairement à l'utilisation d'amorces spécifiques des régions flanquant les microsatellites, il n'est pas nécessaire de connaître ici la séquence étudiée. Cette technique permet d'amplifier un grand nombre de fragments d'ADN par réaction, et est supérieure aux marqueurs RAPD en termes de détection de polymorphismes et de reproductibilité (Zietkiewicz *et al.*, 1994 ; Quian *et al.*, 2001 ; Ye *et al.*, 2008). L'usage d'amorces plus longues que pour les RAPD (jusqu'à 17 bases contre 10 à 12 généralement utilisées dans les analyses RAPD) contribue à cette reproductibilité (Charters *et al.*, 1996). Les amplicons polymorphes peuvent être séparés sur un gel d'agarose ou gel de polyacrylamide. La technique d'amplification inter microsatellites est une technique flexible et peut être utilisée pour les études de diversité génétique, de génétique des populations, pour la taxonomie moléculaire, la recherche de mutants somatiques et la cartographie etc. (Yin *et al.*, 2002). Elle a principalement été employée jusqu'à présent dans des études de diversité d'espèces forestières ou agronomiques (Gupta *et al.*, 2008) souvent en complément d'une autre technique (RAPD ou RFLP) ou parfois à des fins de comparaison.

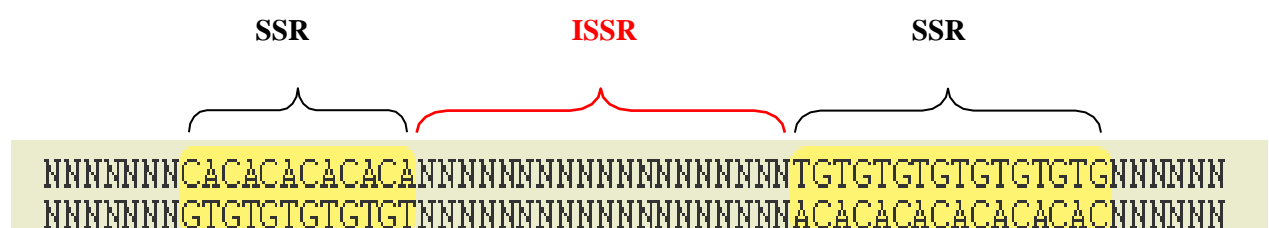


Figure 5: Fragment schématique d'ADN présentant des microsatellites (SSR) et des régions inter microsatellites (ISSR) (Source : Tagu, 1999)

# **MATERIEL ET METHODES**

## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1 Matériel

#### 2.1.1 Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé au cours de cette étude était constitué de jeunes feuilles prélevées sur les plantes issues de semences de douze cultivars de Mil provenant de la Côte d'Ivoire, du Mali et du Burkina Faso (tableau I). La figure 7 présente les semences de mil utilisé pour cette étude.

Tableau I: Différents cultivars de Mil étudiés

| N°d'ordre | Identifiant | Origine       |
|-----------|-------------|---------------|
| C1        | CI#1        | Côte d'Ivoire |
| C2        | CI#2        | Côte d'Ivoire |
| C3        | CI#3        | Côte d'Ivoire |
| C4        | CI#4        | Côte d'Ivoire |
| C5        | CI#5        | Côte d'Ivoire |
| C6        | ML#1        | Mali          |
| C7        | ML#2        | Mali          |
| C8        | ML#3        | Mali          |
| C9        | ML#4        | Mali          |
| C10       | ML#5        | Mali          |
| C11       | BF#1        | Burkina Faso  |
| C12       | BF#2        | Burkina Faso  |

CI : Côte d'Ivoire ML : Mali, BF : Burkina Faso

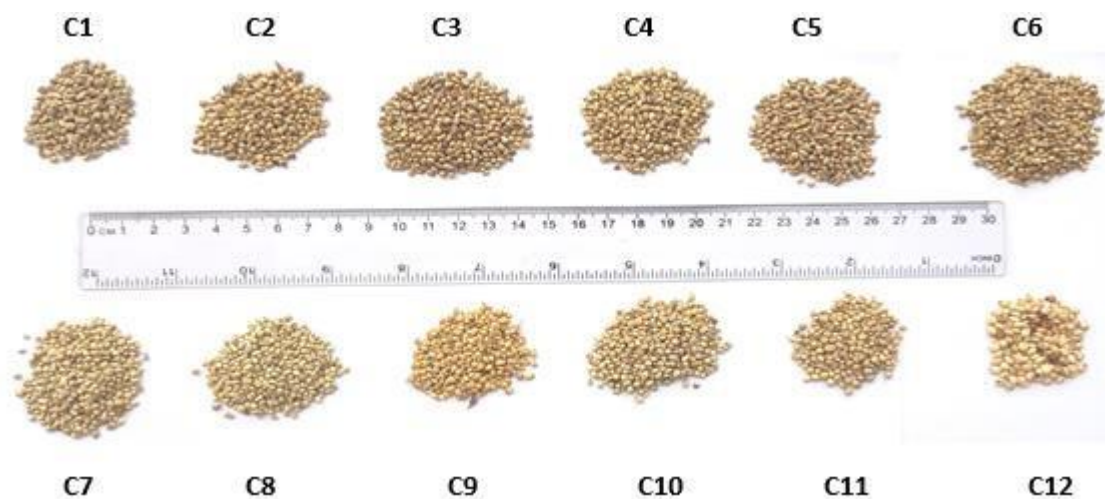


Figure 6: Semences des différents cultivars de mil étudiés

Côte d'Ivoire : C1-C5, Mali : C6-C10, Burkina Faso : C11-C12

## 2.1.2 Matériel technique

### 2.1.2.1 Matériel technique utilisé au champ

Cette étude a nécessité du matériel dont des dabas (Figure 7a) et des machettes (Figure 7b) qui ont servi à désherber et à entretenir la parcelle.

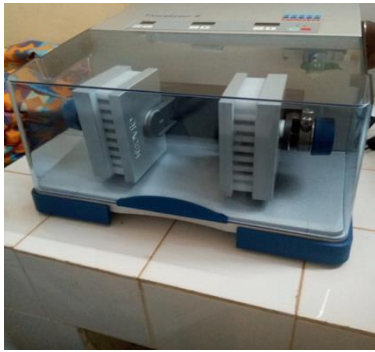


Figure 7: Matériel techniques au champ : a) Daba ; b) Machette

### 2.1.2.2 Matériels techniques utilisé au laboratoire

Pour les travaux au laboratoire, plusieurs instruments (Figure 8) ont été utilisés :

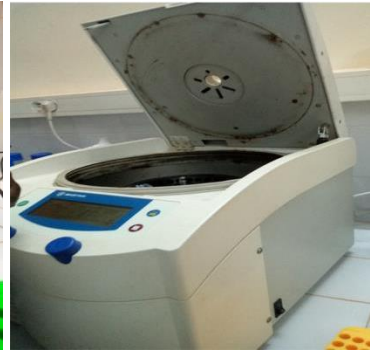
- Un broyeur automatique pour broyer les échantillons de feuilles fraîches ;
- Une balance électronique de précision pour les pesées;
- Une centrifugeuse pour séparer les mélanges en différentes phases ;
- Un vortex pour assurer l'homogénéisation des solutions ;
- Un bain-marie pour incuber les échantillons aux températures voulues ;
- Un Nano Drop pour mesurer la concentration et la pureté des extraits d'ADN ;
- Des micropipettes pour prélever avec précision les volumes de solutions inférieures ou égales à 1000  $\mu\text{L}$ ;
- Une cuve de migration pour l'électrophorèse de l'ADN sur gel d'agarose ;
- Des moules pour la polymérisation des gels d'agarose ;
- Un trans-illuminateur photographique pour visualiser et à photographier les bandes d'ADN après migration ;
- Un thermocycleur pour réaliser les PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ;
- Une plaque chauffante magnétique qui permet la dissolution du gel d'agarose ;
- Un pied à coulisse électronique pour la mesure de la longueur et largeur des graines de mil.



Broyeur automatique



Balance électronique



Centrifugeuse



Vortex



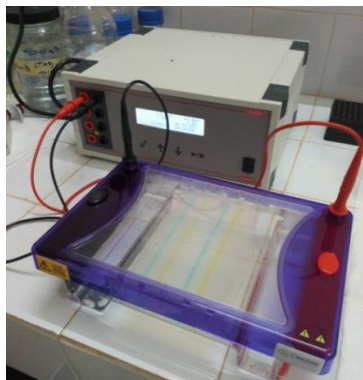
Bain-marie



NanoDrop



Micropipettes



Cuve de migration



Moule



Trans-illiminateur



Termocycleur



Agitateur magnétique

Figure 8: Quelques matériels techniques utilisés au laboratoire

## **2.2 METHODES**

### **2.2.1 Caractérisation des semences de mil des différents cultivars étudiés**

Dès leurs réceptions, les graines des différents cultivars de mil étudiés ont été caractérisées au moyen de descripteurs de types quantitatifs et qualitatifs. Les descripteurs quantitatifs utilisés sont :

- Longueurs des graines : Les longueurs de 10 graines par cultivars sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse électronique ;
- Largeurs des graines : Les largeurs de 10 graines par cultivars sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse électronique,
- Poids de 100 graines : Trois lots de 100 graines par cultivars sont pesés sur une balance électronique de précision.

Les paramètres qualitatifs considérés sont :

- Couleur des graines : La couleur des graines de chaque cultivar est déterminée par observation visuelle en utilisant les descripteurs « couleurs des graines du mil » homologués par l'IBPGR/ICRISAT (International Board for Plant Genetic Resources / International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics) qui sont :

|   |        |   |            |   |              |
|---|--------|---|------------|---|--------------|
| 1 | Ivoire | 3 | Gris       | 7 | Brun         |
| 2 | Crème  | 5 | Gris foncé | 8 | Violet       |
| 3 | Jaune  | 6 | Gris brun  | 9 | Violet foncé |

- Forme des graines : La forme des graines est déterminée par observation visuelle en utilisant les descripteurs « formes des graines du mil » homologués par l'IBPGR/ICRISAT et présenté dans la figure9.

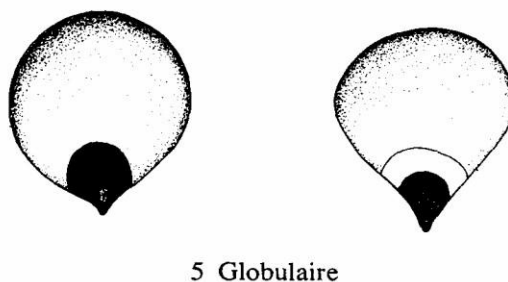
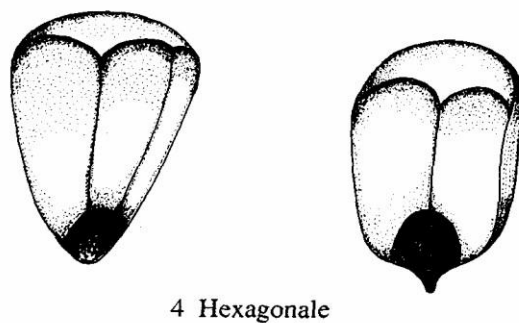
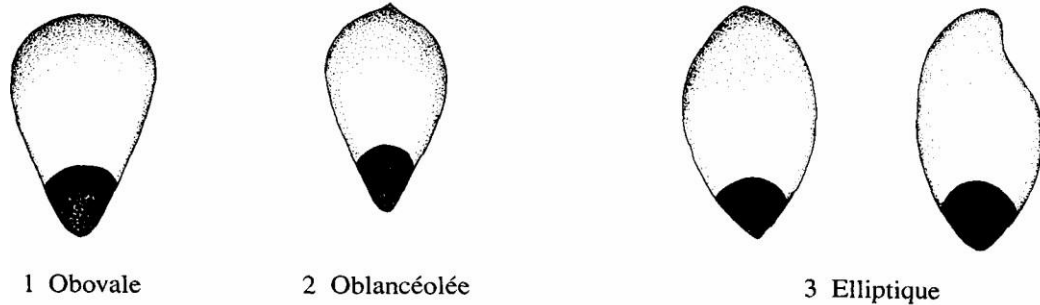


Figure 9: Différentes formes possibles des graines de mil (source : l'IBPGR/ICRISAT)

- Couverture de la graine : la couverture de la graine est déterminée par observation visuelle en utilisant les descripteurs « couvertures de la graine » homologués par l'IBPGR/ICRISAT et illustré par la figure 10.



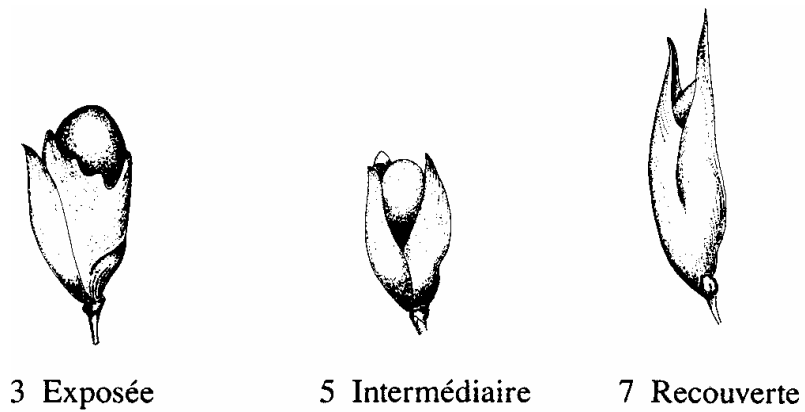


Figure 10: Différents types possible de couverture des graines de mil

### 2.2.2 Echantillonnage des feuilles des cultivars de mil

Les semences de mil collectées ont été mises en culture sur le site expérimental de l'Université Jean Lorougnon Guédé (UJLOG) selon un dispositif en bloc complet randomisé de Fischer. Quatre répétitions ont été réalisées avec 10 plants par cultivar dans chaque répétition. Les plants étaient séparés de 0,5 m entre les lignes et les blocs étaient séparés de 2 m. Cette expérimentation au champ (Figure 11) a été utilisée pour fournir des feuilles pour l'analyse moléculaire qui fait objet de la présente étude.



Figure 11: Parcelle expérimentale utilisée pour le prélèvement des feuilles des cultivars de mil étudiés.

Les feuilles jeunes et saines ont été échantillonnées sur cinq pieds par cultivar en raison d'une rondelle d'ouverture de tube eppendorf par pied (Figure 12). Les tubes contenant les feuilles sont placés dans une glacière contenant de la glace pilée puis transportés au laboratoire. Chaque tube renferme à terme cinq rondelles de feuille et peut ainsi servir pour constituer un « bulk DNA » (mélange d'ADN) lors de l'extraction. La méthode du « bulk DNA » (Mefti & Bourzerzou, 2012) permet de prendre en compte, lors des analyses, la variabilité qui pourrait exister à l'intérieure de chaque cultivar. La méthode du « Bulk DNA » est une méthode largement utilisée pour l'évaluation de la diversité chez les plantes (Reyes-Val *et al.*, 2013).



Figure 12: Prélèvement de feuilles de mil pour l'extraction d'ADN :

a) jeune plant sain de mil ; b) un tube éppendorf de 2 mL utilisé pour le prélèvement ; c, d, e) utilisation du tube pour le prélèvement d'une rondelle de feuille ; f) Rondelle prélevée dans le tube

### 2.2.3 Extraction d'ADN génomique des cultivars de mil

Les ADN génomiques totaux des 12 cultivars de mil ont été extraits (Figure 13) suivant le protocole CTAB modifié comme suit. Après prélèvement des feuilles, deux-billes en tungstène sont ajoutés dans chaque tube (Figure 13). Les tubes contenant les microbilles et les échantillons de feuilles sont ensuite placés dans un broyeur automatique (Tissuelyser II, Qiagen). Les échantillons sont alors broyés selon le programme 2 fois 1 min 50 s à une

fréquence de 30 secousses par seconde. Il est ajouté au broyat 800  $\mu\text{L}$  d'une solution de lyse Promega supplémenté de PVP et de mercaptoéthanol (en raison de 0,015 g et 10  $\mu\text{l}$  respectivement pour 5 ml de solution de lyse) préchauffée à 65°C. Ce mélange est mixé à l'aide d'un vortex pendant une dizaine de secondes puis mis dans un bain marie à 65°C pendant une heure pour la lyse des cellules. Après refroidissement à la température ambiante pendant 5 minutes, 3  $\mu\text{L}$  de RNase sont ajoutés suivis d'une incubation à l'étuve à 37°C pendant 15 min afin d'éliminer les ARN. Pour précipiter les protéines 800  $\mu\text{L}$  de chloroforme / alcool-isoamylique (24 : 1) fraîchement préparée sont ajoutés dans chaque tube. Le mélange est mixé par inversion une cinquantaine de fois et centrifugé pendant 20 minutes à 6 200 g pour séparer les protéines et les débris végétaux de l'ADN. Un volume de 600  $\mu\text{L}$  du surnageant contenant l'ADN est délicatement pipeté et mis dans un microtube de 1,5 ml. Le même volume en isopropanol froid est ajouté. Le contenu de chaque tube est délicatement mélangé par inversion jusqu'à ce que l'isopropanol permette à l'ADN de se condenser et former un filament visible. Les tubes sont mis à -20 ° C pendant 1 h puis centrifugés à 6200 g pendant 20 min pour tasser l'ADN en un culot au fond des tubes. Les différents surnageants sont par la suite vidés pour ne conserver que les culots (représentant l'ADN) pour la suite de l'opération. Un volume de 600  $\mu\text{L}$  d'une solution d'éthanol 70 % est ajouté dans chaque tube pour laver l'ADN délicatement par une succession d'inversion/redressement pendant 2 à 3 minutes. Une dernière centrifugation à 6200 g pendant 10 minutes est réalisée et les surnageants sont soigneusement vidés pour ne conserver que le culot d'ADN. Les tubes sont inversés sur du papier essuie-tout pendant 5 minutes pour vider totalement l'éthanol et sécher les parois. Ils sont ensuite mis à l'étuve à 60 ° C pendant 10 à 20 min pour sécher l'ADN. Un volume de 100  $\mu\text{L}$  de solution de réhydratation d'ADN (TE) est ajouté par tube et l'ensemble laissé sur la paille toute une nuit à température ambiante pour résuspendre l'ADN. Les solutions d'ADN sont finalement stockées à 4 ° C au réfrigérateur pour les manipulations ultérieures.



Figure 13: Quelques étapes de l'extraction de l'ADN des cultivars de mil étudiés :

a) Ajout de deux microbilles dans un tube contenant des échantillons de feuilles ; b) Broyage des échantillons de feuilles dans un broyeur automatique (TissueLyser); c) Ajout du tampon de lyse aux broyats de feuilles ; d) Homogénéisation du mélange par vortex ; e) Mise des tubes au bain marie à 65°C; f) Centrifugation des échantillons; g) Ajout d'une solution d'isopropanol aux surnageants; h) Condensation de l'ADN dans l'isopropanol.

#### 2.2.4 Quantification et contrôle de la qualité des ADN extraits

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur extraction. Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer la concentration et vérifier la qualité des ADN de mil extraits. Il s'agit de :

- La spectrophotométrie basée sur la mesure de l'absorbance de l'ADN dans l'UV
- La méthode de l'électrophorèse sur gel d'agarose

#### 2.2.4.1 Méthode spectrophotométrique : utilisation du NanoDrop

Le NanoDrop qui est un spectrophotomètre, développé pour l'analyse de micro- volumes d'acides nucléiques (ADN, ARN) et de protéines hautement concentrées a été utilisé. Deux  $\mu\text{L}$  de chaque solution d'ADN ont été déposés sur la surface de mesure du NanoDrop (Figure 14) et le bras a été rabattu. Instantanément, en moins de 10 secondes, l'absorbance de la solution d'ADN à 260 nm est mesurée et sa concentration est automatiquement calculée. Parallèlement, l'appareil détermine la pureté de l'échantillon en mesurant l'absorbance à 280 nm et en donnant le ratio  $A_{260} / A_{280}$ . Une solution d'ADN est considéré comme ayant une bonne pureté quant le ratio  $A_{260} / A_{280}$  est dans la fourchette 1,8 – 2,0. Une fois des résultats satisfaisant obtenues et les concentrations connues, il été procédé à des dilutions pour produire des solutions d'ADN de travail de 100  $\mu\text{L}$  ayant une concentration de 50  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .



Figure 14: Utilisation NanoDrop pour la quantification et le contrôle de la qualité des extraits d'ADN des cultivars de mil étudiés :

a) Surface de mesure recevant une goutte de 2  $\mu\text{L}$  de solution d'ADN ; b) Bras du NanoDrop à rabattre sur la surface de mesure pour effectuer l'analyse.

#### 2.2.4.2 Méthode de l'électrophorèse sur gel d'agarose

La méthode du gel d'agarose a été réalisée pour vérifier la présence de l'ADN dans nos extraits et confirmer les résultats obtenus par l'analyse au NanoDrop. Un gel d'agarose de 1 % a été utilisé pour cette analyse. Pour cela, 1,5 g d'agarose ont été pesés (Figure 15a) et dissouts dans 150 ml de tampon 0,5x TBE (Tris Borate EDTA) sur plaque chauffante (Figure 15b). Après un léger refroidissement (à environ 50 ° C), 3  $\mu\text{l}$  de BET (bromure d'éthidium)

ont été ajoutés à la solution d'agarose. Cette solution, mélangée au BET a été ensuite versé dans un moule équipé d'un peigne, puis laissée à température ambiante pour polymérisation (Figure 15c). Pendant ce temps, les échantillons d'ADN ont été préparés en utilisant pour chaque échantillon 4  $\mu$ L de bleu de charge (à base de bromophénol) et 6  $\mu$ L d'ADN.

Après solidification de l'agarose le peigne est enlevé (Figure 15d) et le gel est placé dans une cuve de migration rempli du tampon 0,5x TBE (Figure 15e et 15f). Les échantillons préparés (Bleu de charge + ADN) ont été déposés dans les puits créés par les dents du peigne (Figure 15g). L'électrophorèse a été effectuée à 100 V pendant 30 minutes (Figure 15h). L'ADN de chaque cultivar a finalement été révélé au transilluminateur à UV et photographié (Figure 15i).

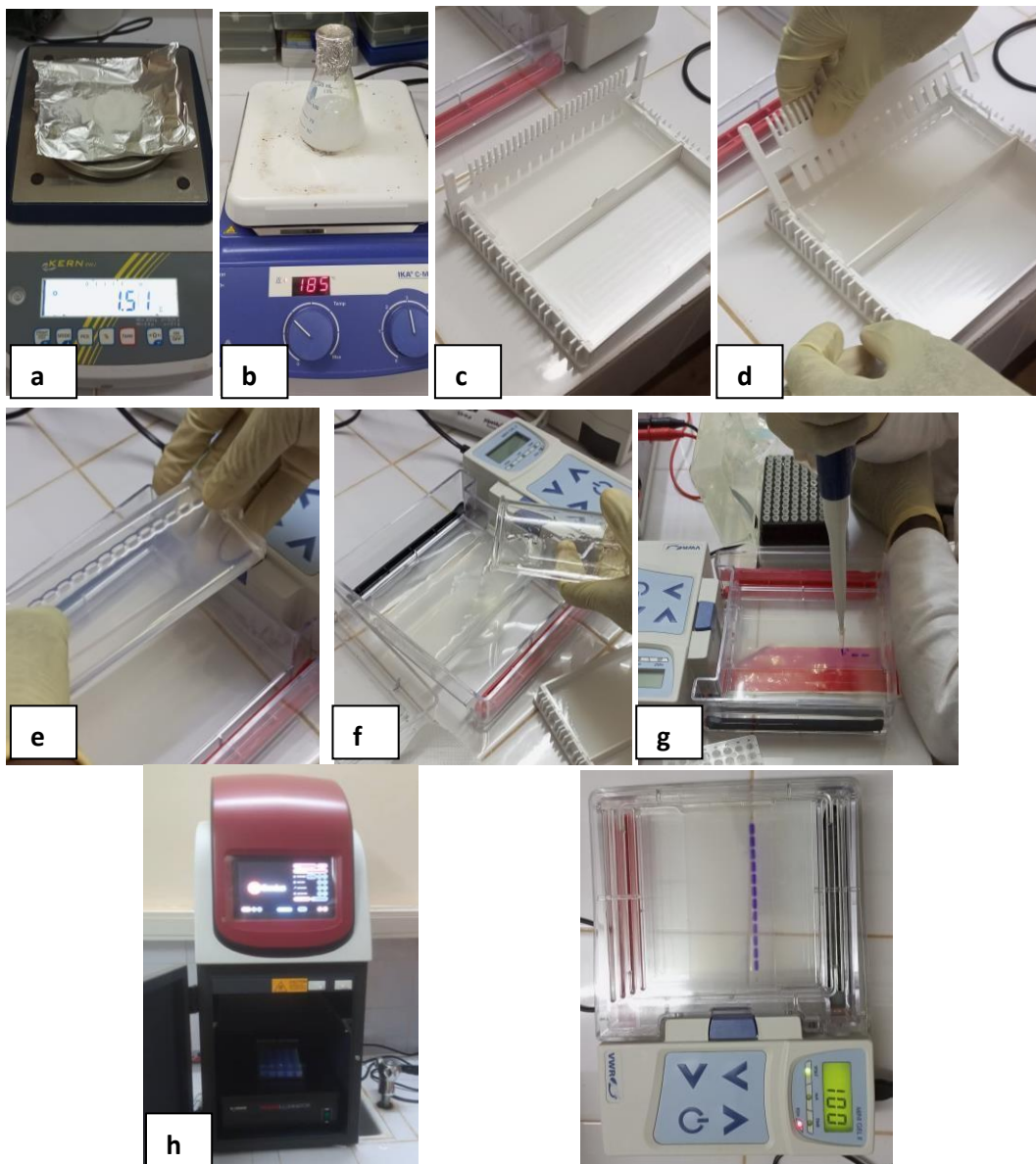


Figure 15: Quelques étapes du dosage sur gel d'agarose des extraits d'ADN de mil étudié

a) Pesée de l'agarose ; b) Dissolution de l'agarose dans du 0.5x TBE ; c) Polymérisation de la solution d'agarose dans le moule de coulée équipé d'un peigne ; d) Retrait du peigne après solidification de l'agarose ; e) Transfert du gel d'agarose dans la cuve de migration ; f) Remplissage de la cuve avec le tampon de migration ; g) Dépôt des ADN dans les puits du gel ; h) Electrophorèse à 100 V ; i) Visualisation et photographie du gel dans le transilluminateur.

## 2.2.5 Amplification des ADN de mil par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne)

### a) Amorces ISSR utilisées : caractéristiques et reconstitution et dilution

La PCR nécessite l'utilisation d'oligonucléotides servant d'amorces pour pouvoir amplifier les séquences d'ADN cibles. Dix amorces ISSR synthétisés par le fournisseur d'acides nucléiques IDT (Integrated DNA Technologies) à Coralville (Iowa, Etats Unis) ont été utilisées pour la présente étude. Les différentes caractéristiques de ces amorces sont résumées dans le tableau II.

Tableau II: Amorces utilisées avec leur caractérisation

| Amorces     | Séquences                | Températures de demi-dénaturation (Tm) |
|-------------|--------------------------|--|
| ISSR 1      | 5'-CACTCCTCCTCCTCCTCC-3' | 56,2°C                                 |
| ISSR N7     | 5'-GTG GTGGTGGTGGTGYC-3' | 57,9°C                                 |
| ISSR 09     | 5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC-3' | 57,7°C                                 |
| ISSR 857    | 5'-ACACACACACACACACCG-3' | 57,7°C                                 |
| ISSR DAT    | 5'-GAGAGAGAGAGAGAAC-3'   | 44°C                                   |
| ISSR N6     | 5'-GAAGAAGAAGAAGAARC-3'  | 42,9°C                                 |
| ISSR 17899A | 5'-CACACACACACAAG-3'     | 43,3°C                                 |
| ISSR 807    | 5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'  | 47°C                                   |
| ISSR 887    | 5'-GCATCTTCTCTCTCTCTC-3' | 47,9°C                                 |
| ISSR 17899B | 5'-GGCAACAACAACAACA-3'   | 48,6°C                                 |

Les amorces ISSR reçus étaient sous forme lyophilisées. Pour les reconstituer, les tubes ont d'abord été brièvement centrifugé (8 000 tours/min pendant 30 secondes) pour faire descendre toute la poudre d'amorce au fond de chaque tube. Ensuite, pour chaque amorce, le volume d'eau (eau distillée doublement autoclavée) demandé par le fournisseur pour une reconstitution de 100 µM a été ajouté dans le tube correspondant. Après deux minutes à température ambiante les amorces ont été incubées à 60 ° C pendant 10 min. Finalement une brève centrifugation a été réalisée pour recueillir l'entièreté des solutions au fond des tubes. Ces solutions d'amorces de 100 µM ainsi reconstitué ont représenté nos solutions stock. A

partir de ces solutions stock, des solutions de travail de 100  $\mu$ l à 10  $\mu$ M ont été préparées par dilution : 10  $\mu$ l de solution stock + 90  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O. Les solutions d'amorces ont été conservées à -20 °C.

### b) Amplification des ADN de mils étudiés

La PCR a été réalisée pour chaque échantillon dans un volume réactionnel de 15  $\mu$ L contenant 3  $\mu$ L de tampon PCR 5 X, 1,5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 0,3  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 4  $\mu$ L d'amorce ISSR 10  $\mu$ M, 0,08  $\mu$ L de Taq polymérase 5 U, 2  $\mu$ L d'ADN (50 ng/ $\mu$ l) et 4,12  $\mu$ L d'eau distillée autoclavée. L'amplification a été effectuée dans un Thermocycleur Labnet MultiGene™ OptiMax. Le programme utilisé comprenant une première étape de dénaturation initiale à 94 °C pendant 2 minutes ; suivie d'une seconde étape de 35 cycles comprenant une dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, une hybridation à la température d'hybridation de l'amorce ( $T_m - 5^\circ$  C) pendant 2 minutes et une élévation à 72 °C pendant 2 minutes ; et enfin une dernière étape d'élévation finale à 72 °C pendant 4 minutes. La figure 16 montre quelques étapes de la manipulation pour la réalisation de la PCR.

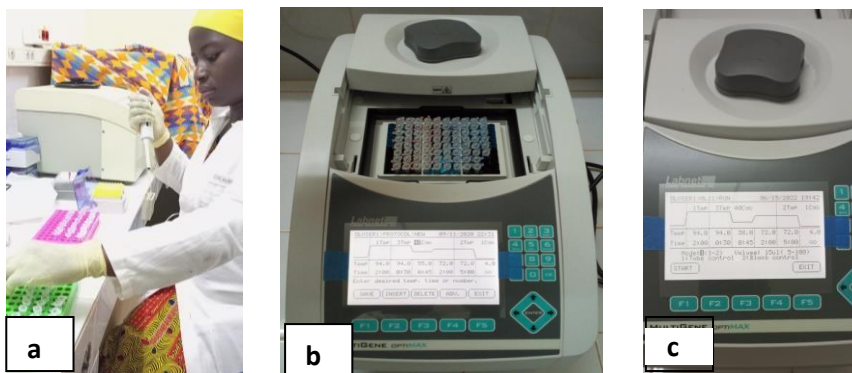


Figure 16: Quelques étapes de la manipulation pour la réalisation de la PCR

a) Préparation du mélange réactionnel pour PCR ; b) Echantillons dans le thermocycleur ; c) Thermocycleur en marche avec l'affichage du programme d'amplification.

### 2.2.6 Révélation des fragments de l'amplification PCR sur gel d'agarose

Dans une cuve d'électrophorèse horizontale (Figure 17), les produits d'amplification ont été soumis à une électrophorèse à 100 V durant 45 minutes sur gel d'agarose à 2 % contenant du BET (Bromure d'Ethidium). Le tampon de migration était constitué de 0,5X TBE (Tris Borate EDTA). A la fin de la migration, les produits amplifiés ont été révélés et photographiés sous lumière ultra-violet à l'aide d'un trans-illuminateur photographique.



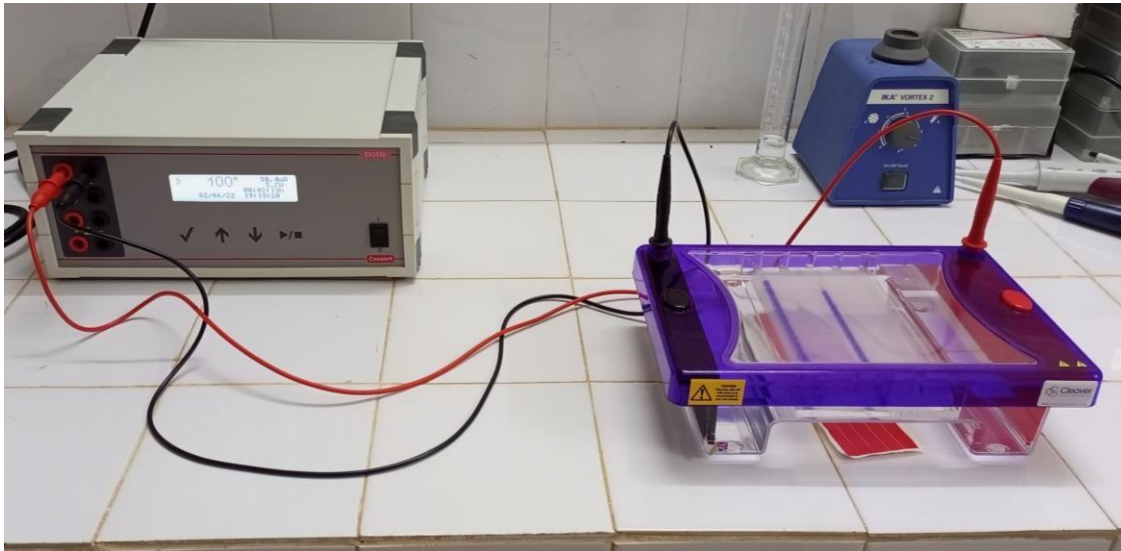


Figure 17: Produits d'amplification PCR en migration dans une cuve d'électrophorèse

### 2.2.7 Lecture des gels issus de l'électrophorèse

Chaque bande représente un seul locus biallélique. Seules les bandes brillantes et discernables ont été prises en compte dans les analyses. Une matrice de données binaires a été construite en notant les bandes ISSR en tant que caractères de présence (1) ou d'absence (0). La lecture visuelle des gels a permis d'établir une matrice binaire 0/1 traduisant respectivement l'absence/présence de bandes à chacun des locus, pour chaque cultivar de mil étudié. Seules les bandes claires et bien visibles ont été prises en compte comme marqueurs ISSR.

### 2.2.8 Analyse statistique des données

Les données phénotypiques collectées sur les graines des mils ont été analysées avec le logiciel Statistica 7.1. Une analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été réalisée pour apprécier la significativité statistique des différences observées entre les cultivars pour les caractères étudiés. Les moyennes ont été comparées par le test HSD de Tukey (test de la différence vraiment significative, HSD signifie « Honestly Significant difference ») au seuil de  $p < 0,05$ . Les relations entre variables ont été étudiées grâce à la matrice de corrélations totales et à une Analyse en Composantes Principales (ACP). Les relations entre les cultivars ont été analysées par l'ACP et la classification ascendante hiérarchique (CAH).

Les données moléculaires ont été analysées à partir des logiciels PopGene 1.31, GenALEX 6.5, FreeTree et TreeView (Win32, version 5.2). Pour chaque amorce, le nombre total de bandes et le taux de polymorphisme ont été calculés. Des estimations de la diversité génétique au sein et entre les populations ont été obtenues avec le logiciel PopGene. Le pourcentage de

loci polymorphes (PPL), la diversité des gènes de Nei (He) et l'indice d'information de Shannon (I) ont été calculés. Pour l'évaluation de la différenciation génétique des populations, la diversité génétique totale ( $H_t$ ), la diversité génétique intra-population moyenne ( $H_s$ ), le coefficient de différenciation génétique ( $G_{ST}$ ) et le flux génétique ( $N_m$ ) de populations ont été calculés. L'analyse de la variance moléculaire (AMOVA) a été utilisée pour évaluer statistiquement la répartition de la variabilité génétique au sein et entre les populations à l'aide du programme GenAlex. De plus, le logiciel GenALEX a permis une analyse multivariée. Elle a consisté en une analyse en coordonnées principales (PCoA) afin de visualiser les tendances de la distance génétique entre les cultivars. Cette PCoA a été fondée sur les corrélations pour transformer les variables, dans notre cas les marqueurs ISSR, en variables synthétiques ou axes. Cette analyse a permis ainsi de définir les marqueurs qui contribuent le mieux à la description de la structuration de la variabilité et d'obtenir une projection des variétés selon leur ressemblance.

Enfin, la matrice binaire obtenue a été traitée avec le logiciel FreeTree pour générer une matrice de distance génétique présentant les coefficients de dissimilarité de Jaccard entre les douze cultivars de mil sur la base des données ISSR. Une analyse typologique a ensuite été réalisée en utilisant la méthode du neighbor-joining du logiciel FreeTree ; ce qui a permis d'élaborer, grâce au programme TreeView, un dendrogramme montrant l'inter-relation entre les cultivars.

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

### **3. RESULTATS ET DISCUSSION**

#### **3.1 RESULTATS**

##### **3.1.1 Caractérisation phénotypique des graines des cultivars de mils étudiés**

###### **3.1.1.1 Variabilité des paramètres quantitatifs**

Le tableau III présente la dispersion des valeurs moyennes des caractères quantitatifs mesurés sur les graines des cultivars de mils étudiés. L'examen du tableau révèle l'existence de variabilités manifestée par la constitution de plusieurs groupes homogènes suite à l'analyse de la variance. Ainsi, la longueur des graines a varié de 3,02 mm à 3,85 mm et trois groupes ont été observés. Le groupe des cultivars à graines les plus courtes est représenté par les cultivars ivoirien CI#2 (3,02 mm) et malien ML#3 (3,11 mm). Le cultivar burkinabé BF#2 forme à lui seul, le groupe des mils ayant les plus longues graines (3,85 mm). Tous les autres cultivars (cultivars ivoiriens CI#1, CI#3, CI#4, CI#5, cultivars maliens ML#1, ML#2, ML#4, ML#5 et le cultivar burkinabé BF#1) ont présenté des longueurs de graines intermédiaires comprise entre 3,17 et 3,64 mm. La largeur des graines a varié de 1,97 à 2,90 mm, et a exhibé six groupes. Les cultivars maliens ML#3 (1,97mm) et ML#1 (2,03 mm) ont constitué le groupe ayant les graines les moins larges. Tandis que le cultivar burkinabé BF#2 a encore présentées les valeurs les plus élevés (2,90 mm). Il a constitué à lui seul encore le groupe des mils à grains les plus larges. La largeur des graines des autres cultivars de mils étudiés était entre 1,97 et 2,90 mm.

La plus grande variabilité des paramètres des graines a été observée avec le poids de 100 graines. Les valeurs de ce paramètre allaient de 0,49 g à 1,21 g et 8 groupes ont été manifestés. Le groupe des mils à graines les plus légères comprenait 4 cultivars maliens ML#2 (0,54 g), ML#3 (0,49 g), ML#4 (0,54 g) et ML#5 (0,51 g). Et comme pour les paramètres précédents, le cultivar BF#2 s'est encore illustré par sa valeur de poids de 100 graines la plus élevée (1,21 g). Il a représenté à lui seul le groupe des cultivars à graines les plus lourdes.

Tableau III: Variation de caractères quantitatifs des grains de mils étudiés

| Cultivars | LongGr<br>(mm) | LargGr<br>(mm) | P100Gr<br>(g) |
|-----------|----------------|----------------|---------------|
| CI#1      | 3,59 ±0,40 b   | 2,12 ±0,47 c   | 0,79 ±0,02 g  |
| CI#2      | 3,02 ±0,46 a   | 2,10 ±0,16 b   | 0,69 ±0,01 d  |
| CI#3      | 3,57 ±0,54 b   | 2,13 ±0,38 c   | 0,74 ±0,02 e  |
| CI#4      | 3,64 ±0,71 b   | 2,17 ±0,31 c   | 0,68 ±0,01 d  |
| CI#5      | 3,32 ±0,28 b   | 2,19 ±0,17 c   | 0,65 ±0,02 c  |
| ML#1      | 3,39 ±0,57 b   | 2,03 ±0,28 a   | 0,57 ±0,03 b  |
| ML#2      | 3,17 ±0,38 b   | 2,22 ±0,46 c   | 0,54 ±0,08 a  |
| ML#3      | 3,11 ±0,56 a   | 1,97 ±0,28 a   | 0,49 ±0,04 a  |
| ML#4      | 3,45 ±0,33 b   | 2,53 ±0,15 d   | 0,54 ±0,02 a  |
| ML#5      | 3,23±0,36 b    | 2,33 ±0,34 c   | 0,51 ±0,03 a  |
| BF#1      | 3,19 ±0,44 b   | 2,59 ±0,34 e   | 0,76 ±0,02 f  |
| BF#2      | 3,85±0,39 c    | 2,90 ±0,31 f   | 1,21 ±0,03 h  |

LongGr : Longueur de la graine ; LargGr : Largeur de la graine ; P100Gr : Poids de 100 graines

### 3.1.1.2 Variabilité des paramètres qualitatifs

Très peu de variabilités inter-cultivars ont été observées pour certains des caractères qualitatifs étudiés. Cependant une grande variabilité a été observée pour d'autres (Tableau IV). La couleur des graines a présenté la plus grande variabilité avec 7 couleurs observées : Gris brun (CI#1 et CI#4), Gris foncé (CI#2, CI#3, CI#5 et ML#5), Jaune (ML#1), Brun (ML#2), Gris (ML#3), Crème (ML#4), Ivoire (BF#1) et Blanc (BF#2).

Pour la forme des graines, essentiellement quatre types ont été observés : Hexagonale (CI#1), Oblancéolée (CI#2), Obovale (CI#3, CI#4, ML#3 et ML#4) et globulaire (CI#5, ML#1, ML#2, ML#5, BF#1, BF#2).

Trois types de couverture de la graine ont été observés : Recouverte pour le cultivar ivoirien CI#1, la graine, Intermédiaire pour les cultivars CI#2, ML#1 et ML#2, et Exposée pour les cultivars CI#3, CI#4, CI#5, ML#3, ML#4, ML#5 et BF#1. Il a été impossible de déterminer la couverture de graine du cultivar burkinabé BF#2 parce que toutes les graines reçus étaient complètement décortiquées.

Tableau IV: Variation des caractères qualitatifs observés sur les graines de mils étudiés

| <b>Cultivars</b> | <b>ColGr</b> | <b>FoGr</b> | <b>CovGr</b>  |
|------------------|--------------|-------------|---------------|
| CI#1             | Gris brun    | Hexagonale  | Recouverte    |
| CI#2             | Gris foncé   | Oblancéolée | Intermédiaire |
| CI#3             | Gris foncé   | Obovale     | Exposée       |
| CI#4             | Gris brun    | Obovale     | Exposée       |
| CI#5             | Gris foncé   | Globulaire  | Exposée       |
| ML#1             | Jaune        | Globulaire  | Intermédiaire |
| ML#2             | Brun         | Globulaire  | Intermédiaire |
| ML#3             | Gris         | Obovale     | Exposée       |
| ML#4             | Crème        | Obovale     | Exposée       |
| ML#5             | Gris foncé   | Globulaire  | Exposée       |
| BF#1             | Ivoire       | Globulaire  | Exposée       |
| BF#2             | Blanc        | Globulaire  | Absent        |

ColGr : Couleur des graines ; FoGr : forme des graines ; CovGr : Couverture des graines

### 3.1.2 Analyse multi variée des caractères phénotypiques des graines des mils étudiés :

#### 3.1.2.1 Analyse en composantes principales (ACP)

##### - Corrélation des caractères

Les corrélations pour chaque paire de caractères phénotypiques des graines ont été évaluées à l'aide des coefficients de corrélation de Pearson (Tableau V). Ces coefficients variaient de -0,03 à 0,67. La matrice générée pour les six caractères a révélé la plus forte corrélation pour le poids et la longueur des graines (0,67) ; viennent ensuite le poids et la largeur des graines (0,65), le poids et la couleur des graines (0,60), et enfin la longueur et la couleur des graines (0,50). Les plus faibles corrélations ont été observées entre la largeur et la couverture des graines (-0,07) et la longueur et la forme des graines (-0,03). Les corrélations des autres paires de caractères étaient intermédiaires.

Tableau V: Coefficient de corrélation entre les caractères phénotypes des graines de mils étudiées

|               | <b>LongGr</b> | <b>largGr</b> | <b>P100Gr</b> | <b>ColGr</b> | <b>ForGr</b> | <b>CovGr</b> |
|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| <b>LongGr</b> | 1,00          |               |               |              |              |              |
| <b>LargGr</b> | 0,43          | 1,00          |               |              |              |              |
| <b>P100Gr</b> | <b>0,67</b>   | <b>0,65</b>   | 1,00          |              |              |              |
| <b>ColGr</b>  | <b>0,50</b>   | 0,22          | <b>0,60</b>   | 1,00         |              |              |
| <b>ForGr</b>  | -0,03         | 0,33          | 0,23          | 0,19         | 1,00         |              |
| <b>CovGr</b>  | 0,19          | -0,07         | 0,35          | 0,43         | 0,35         | 1,00         |

LongGr : Longueur de la graine ; LargGr : Largeur de la graine ; P100Gr : Poids de 100 graines ; ColGr : Couleur des graines ; FoGr : forme des graines ; CovGr : Couverture des graines.

### - Composantes principales

L'analyse en composantes principales (ACP) a transformé les six variables (caractères) phénotypiques étudiées en six composantes principales (CP). Le Tableau VI présente les pourcentages de variation expliqués par les six CP, leur valeur propre et les scores factoriels des six caractères étudiés. L'examen de ce tableau montre que la première composante principale (CP1) a le plus contribué (46,70 %) à la variabilité totale et la dernière composante principale (CP6) a eu la plus faible contribution (2,61 %). Les valeurs propres des CP variaient de 0,16 à 2,80. Les valeurs propres permettent de déterminer combien de composantes principales retenir. Les composantes ayant des valeurs propres inférieures à 1 sont à exclure (Shah *et al.* 2018). Les trois premières CP (CP1, CP2 et CP3) ont eu des valeurs propres supérieures à 1. Elles influencent donc de façon significative la variabilité des cultivars. Ces trois CP expliquent cumulativement 84,66 % de la variabilité totale des cultivars. Cependant, les deux premières CP, avec une variance cumulée de 67,19% (46,70% pour CP1 et 20,49% pour CP2), expliquent plus de la moitié de la variabilité totale. Par conséquent, le seul plan constitué par les axes de ces deux CP (CP1, CP2) permet d'explicitier l'information totale et a été de ce fait utilisé pour les analyses ACP. Dans ce plan, l'axe 1 (CP1) est plus associé à la longueur des graines (score factoriel de -0,45 chez PC1 contre - 0,34 chez CP2), au poids des graines (-0,55 contre -0,15) et à la couleur des graines (-0,45 contre -0,16). Tandis que l'axe 2 (CP2) est plus lié aux caractères forme des graines (0,50 contre -0,24) et couverture de la graine (0,67 contre -0,29). Le caractère largeur de la graine à une pondération égale pour les deux axes (-0,39 et -0,39) et n'est donc associé à aucun des deux axes.

Tableau VI: Analyse en composante principale des caractères phénotypiques des graines de mils étudiées montrant les vecteurs propres, les valeurs propres et les variances totales et cumulées.

| <b>Caractère</b>     | <b>CP 1</b> | <b>CP 2</b> | <b>CP 3</b> | <b>CP 4</b> | <b>CP 5</b> | <b>CP 6</b> |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| LongGr               | -0,45       | -0,34       | 0,30        | -0,27       | 0,71        | 0,12        |
| LargGr               | -0,39       | -0,39       | -0,53       | -0,08       | -0,33       | 0,54        |
| P100Gr               | -0,55       | -0,15       | 0,00        | -0,15       | -0,35       | -0,73       |
| ColGr                | -0,45       | 0,16        | 0,35        | 0,78        | -0,10       | 0,19        |
| ForGr                | -0,24       | 0,50        | -0,66       | 0,16        | 0,46        | -0,17       |
| CovGr                | -0,29       | 0,67        | 0,25        | -0,52       | -0,22       | 0,30        |
| Valeur propre        | 2,80        | 1,23        | 1,05        | 0,44        | 0,32        | 0,16        |
| Variance total (%)   | 46,70       | 20,49       | 17,47       | 7,32        | 5,41        | 2,61        |
| Variance cumulée (%) | 46,70       | 67,19       | 84,66       | 91,98       | 97,39       | 100,00      |

CP : Composante principale ; LongGr : Longueur de la graine ; LargGr : Largeur de la graine ; P100Gr : Poids de 100 graine ; ColGr : Couleur des graines ; FoGr : forme des graines ; CovGr : Couverture des graines

### - Cercle de corrélation et regroupement des cultivars sur le plan factoriel

Un plan à deux dimensions a été réalisé sur la base des deux premiers CP. Ce plan factoriel a permis de visualiser de façon graphique l'association des caractères étudiés (Tableau VI) à travers un cercle de corrélations (Figure 18). La projection des cultivars sur le plan factoriel a montré leur distribution et leur association. L'analyse de cette projection laisse entrevoir 4 groupes de cultivars. Le groupe 1 comprend le cultivar burkinabé BF#2 qui se démarque nettement des autres cultivars. Le groupe 2 comprend les cultivars BF#1, CI#3, CI#4, ML#3 et ML#4. Le groupe 3 est constitué des cultivars CI#2, CI#5, ML#1, ML#2 et ML#5. Le cultivar CI#1 restant forme le groupe 4.

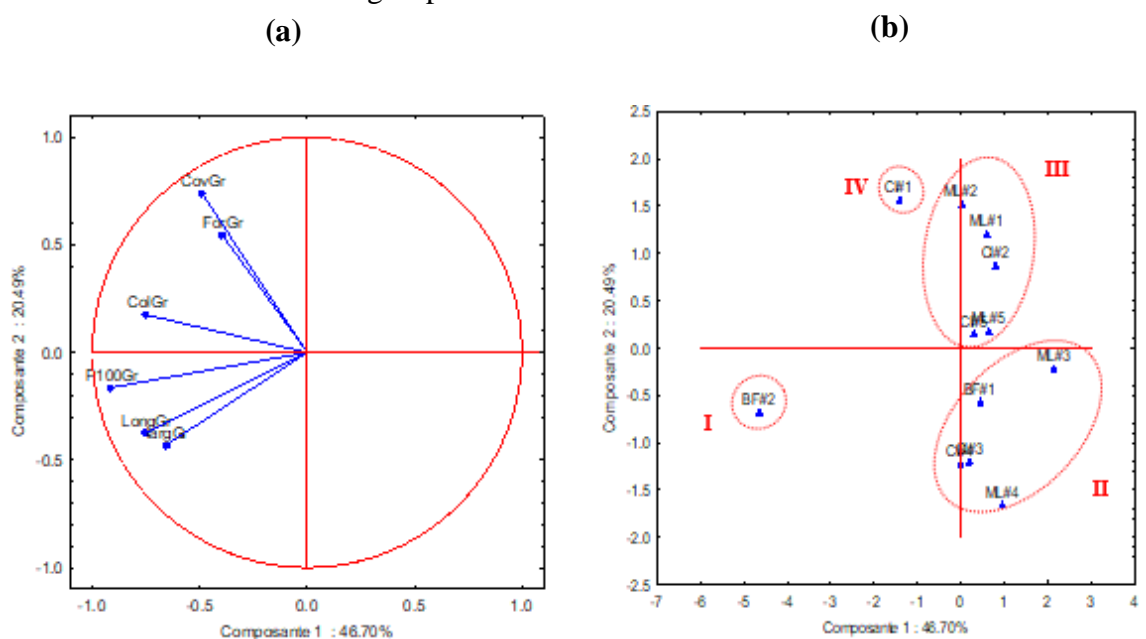


Figure 18: Projection des caractères et des cultivars de mils sur le plan factoriel de l'ACP :

a) Cercle de corrélation de l'ACP montrant les corrélations et les poids des caractères phénotypiques des graines des cultivars de mil ; b) Distribution et association des douze cultivars de mils dans le plan factoriel. LongGr : Longueur de la graine ; LargGr : Largeur de la graine ; P100Gr : Poids de 100 graines ; ColGr : Couleur des graines ; FoGr : forme des graines ; CovGr : Couverture des graines

### 3.1.2.2 Analyse de la distance génétique entre les cultivars sur la base des caractères phénotypiques

Les distances génétiques entre les paires de cultivars de mil ont été mesurées à l'aide des distances de Manhattan sur la base des six caractères de graines étudiés. La matrice de distance est présentée dans le tableau VII. L'examen de ce tableau montre que les distances génétiques entre toutes les paires possibles de cultivars ont varié de 0,37 à 15,45 avec une moyenne de 7,62. La paire de cultivars la plus éloignée est formée par les cultivars burkinabé BF#2 et malien ML#4. La distance génétique la plus faible est enregistrée entre les cultivars



ivoiriens CI#5 et malien ML#5. Les cultivars burkinabés BF#2 se démarquent de tous les autres cultivars avec une distance moyenne de 10,60 supérieures à la moyenne générale de 7,62.

Tableau VII: Matrice de distances Manhattan entre les paires de cultivars de mils étudiées.

|      | CI#1  | CI#2  | CI#3  | CI#4  | CI#5        | ML#1 | ML#2  | ML#3  | ML#4         | ML#5 | BF#1  | BF#2 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------------|------|-------|-------|--------------|------|-------|------|
| CI#1 | 0,00  |       |       |       |             |      |       |       |              |      |       |      |
| CI#2 | 5,69  | 0,00  |       |       |             |      |       |       |              |      |       |      |
| CI#3 | 8,08  | 3,62  | 0,00  |       |             |      |       |       |              |      |       |      |
| CI#4 | 7,20  | 4,70  | 1,16  | 0,00  |             |      |       |       |              |      |       |      |
| CI#5 | 6,48  | 5,43  | 4,39  | 5,36  | 0,00        |      |       |       |              |      |       |      |
| ML#1 | 6,52  | 5,56  | 8,45  | 9,50  | 4,30        | 0,00 |       |       |              |      |       |      |
| ML#2 | 4,77  | 5,42  | 8,68  | 7,66  | 4,29        | 4,42 | 0,00  |       |              |      |       |      |
| ML#3 | 9,94  | 4,42  | 1,87  | 2,91  | 5,60        | 7,42 | 9,36  | 0,00  |              |      |       |      |
| ML#4 | 11,80 | 7,01  | 3,71  | 4,69  | 7,58        | 7,58 | 11,59 | 2,95  | 0,00         |      |       |      |
| ML#5 | 6,85  | 5,63  | 4,76  | 5,74  | <b>0,37</b> | 4,50 | 4,21  | 5,50  | 7,44         | 0,00 |       |      |
| BF#1 | 10,91 | 9,71  | 8,86  | 9,95  | 4,64        | 4,94 | 8,59  | 7,96  | 5,54         | 4,55 | 0,00  |      |
| BF#2 | 8,46  | 10,15 | 12,53 | 11,48 | 8,80        | 8,98 | 5,03  | 14,40 | <b>15,45</b> | 8,89 | 12,44 | 0,00 |

Le dendrogramme généré à partir de la matrice de distance montre les relations entre les 12 cultivars étudiés (Figure 19). Tous les cultivars étaient distincts les uns des autres mais ont formés 4 groupes majeurs à un niveau de similarité de 60%. Ces quatre groupes s'apparentent aux quatre groupes obtenus avec ACP. Le groupe 1 comprend le cultivar burkinabé BF#2 ; le groupe 2 cultivars ML#4, ML#3, CI#2, CI#3, CI#4, groupe 3 les cultivars BF#1, ML#1, ML#2, ML#5 et CI#5 ; le groupe 4, le cultivar CI#1.

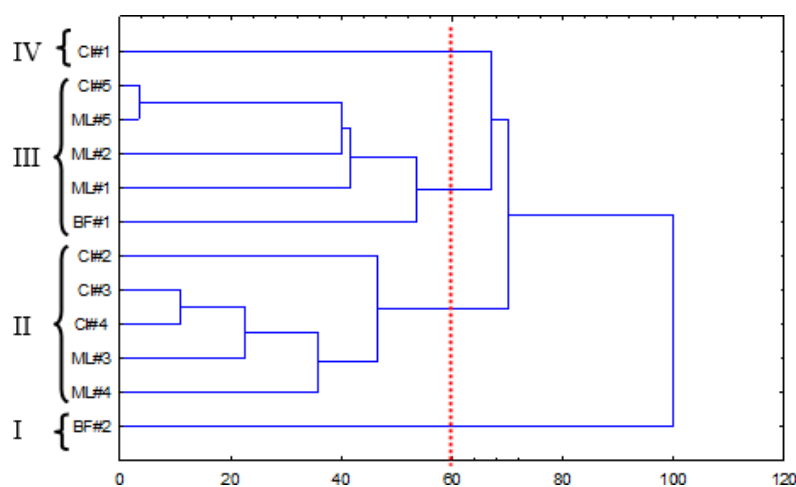


Figure 19: Dendrogramme des 12 cultivars de mil basé sur les distances de Manhattan et montrant quatre groupes principaux à un niveau de similarité de 60%.

### 3.1.2.3 Quantité et qualité des ADN extraits

Les résultats de la mesure au Nanodrop de la quantité et de la qualité des extraits d'ADN sont présentés dans le tableau VIII. Les quantités des extraits variaient en moyenne de 53,95 (CI#1) à 486,35 (CI#3) ng/μL. Quant à la qualité (DO 260/280), elle variait de 1,19 (CI#3) à 1,58 (ML#4).

Tableau VIII: Concentrations (ng/μl) et pureté (DO 260/280) des extraits d'ADN des cultivars de mils étudiés

| Cultivars | Concentration (ng/μl) |          |         | Pureté (DO 260/280) |          |         |
|-----------|-----------------------|----------|---------|---------------------|----------|---------|
|           | Mesure 1              | Mesure 2 | Moyenne | Mesure 1            | Mesure 2 | Moyenne |
| CI#1      | 53,00                 | 54,90    | 53,95   | 1,43                | 1,43     | 1,43    |
| CI#2      | 167,80                | 173,30   | 170,55  | 1,54                | 1,50     | 1,52    |
| CI#3      | 572,90                | 399,80   | 486,35  | 1,17                | 1,20     | 1,19    |
| CI#4      | 132,00                | 151,50   | 141,75  | 1,37                | 1,33     | 1,35    |
| CI#5      | 118,40                | 106,90   | 112,65  | 1,41                | 1,45     | 1,43    |
| ML#1      | 58,80                 | 73,60    | 66,20   | 1,38                | 1,32     | 1,35    |
| ML#2      | 71,50                 | 78,30    | 74,90   | 1,53                | 1,49     | 1,51    |
| ML#3      | 260,40                | 256,00   | 258,20  | 1,29                | 1,32     | 1,31    |
| ML#4      | 98,90                 | 97,00    | 97,95   | 1,59                | 1,56     | 1,58    |
| ML#5      | 193,00                | 195,10   | 194,05  | 1,44                | 1,44     | 1,44    |
| BF#1      | 63,00                 | 65,80    | 64,40   | 1,41                | 1,41     | 1,41    |
| BF#2      | 157,30                | 172,00   | 164,65  | 1,51                | 1,45     | 1,48    |

L'examen des solutions d'ADN sur agarose a montré la présence d'ADN avec des profils relativement bons, comme le montre la figure 20.

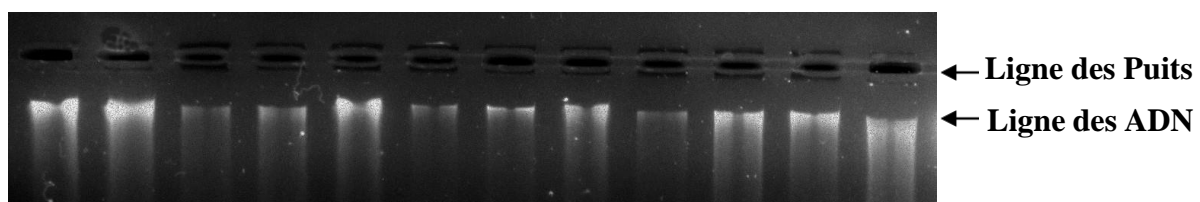


Figure 20: Visualisation des ADN génomiques extraits des douze cultivars de mils étudiés :

1) CI#1 ; 2) CI#2 ; 3) CI#3 ; 4) CI#4 ; 5) CI#5 ; 6) ML#1 ; 7) ML#2 ; 8) ML#3 ; 9) ML#4 ; 10) ML#5 ; 11) BF#1 ; 12) BF#2

### 3.1.2.4 Analyse des profils ISSR et niveaux de polymorphismes

Des amplifications ont été observées chez tous les cultivars de mils étudiées (Figure 21). La lecture des profils d'amplifications obtenus a permis de mettre en évidence 139 loci au total

(Tableau IX). Parmi ces loci, 122 se sont avérés polymorphes, soit un taux de polymorphisme de 87,77%. Le nombre de loci révélés par amorce variait de 7 (ISSR 17899B) à 24 (ISSR N6). Le nombre de loci polymorphes par amorce variait également de 7 (ISSR 17899B) à 24 (ISSR N6). Le taux de polymorphisme par amorce se rangeait de 58,33 à 100%. Sur les 10 amorces utilisées cinq amorces (ISSR 1, ISSR DAT, ISSR N6, ISSR 887 et ISSR 17899B) ont eu les taux de polymorphisme les plus élevés (100%). L'amorce ISSR 807 a fourni le plus petit taux de polymorphisme (58,33%). La moyenne de loci polymorphes produits était de 12,2 loci par amorce.

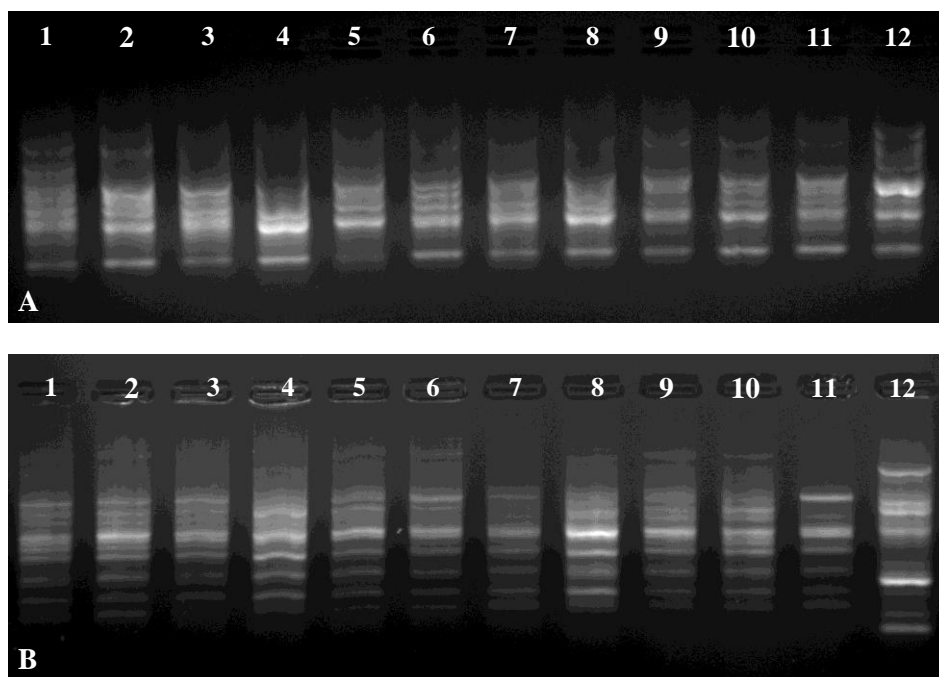


Figure 21: Profils électrophorétiques obtenus chez les 12 cultivars de mils étudiés :

- 1) CI#1 ; 2) CI#2; 3) CI#3; 4) CI#4; 5) CI#5; 6) ML#1; 7) ML#2; 8) ML#3; 9) ML#4; 10) ML#5; 11) BF#1; 12) BF#2, A) ISSR 857 ; B) ISSR 17899A

Tableau IX: Nombre de loci et pourcentage de polymorphisme générés dans la population totale de mil

| Amorces ISSR | Nb total de loci révélés | Nb de loci Polymorphe | Taux de loci polymorphes (%) |
|--------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|
| ISSR 1       | 12                       | 12                    | 100                          |
| ISSR N7      | 19                       | 14                    | 73,68                        |
| ISSR 09      | 14                       | 13                    | 92,86                        |
| ISSR 857     | 12                       | 11                    | 91,67                        |
| ISSR DAT     | 9                        | 9                     | 100                          |
| ISSR N6      | 24                       | 24                    | 100                          |
| ISSR 17899A  | 18                       | 13                    | 72,22                        |
| ISSR 807     | 12                       | 7                     | 58,33                        |

|              |            |            |              |
|--------------|------------|------------|--------------|
| ISSR 887     | 12         | 12         | 100          |
| ISSR 17899B  | 7          | 7          | 100          |
| <b>Total</b> | <b>139</b> | <b>122</b> | <b>87,77</b> |

Le tableau X présente les résultats des analyses des profils électrophorétiques pour chaque population de mil (cultivar ivoirien, cultivar malien et cultivar Burkinabé). L'examen de ce tableau montre que le nombre le plus élevé de loci a été révélé chez les cultivars burkinabés avec 120 loci, contre 104 loci chez les cultivars ivoiriens et 102 loci chez la population malienne. Les cultivars burkinabés ont également enregistré le nombre de loci polymorphes le plus élevé (74 loci polymorphes) ; ils ont été suivis par les cultivars maliens (65 loci polymorphes), puis les cultivars ivoiriens (59 loci polymorphes). Les pourcentages de polymorphisme variaient de 56,73% (cultivars ivoiriens) à 63,73 % (cultivars maliens). La population burkinabé de mil a montré un polymorphisme de 61,67 %. En ce qui concerne le nombre de loci spécifiques à chaque population, les cultivars burkinabés ont montré le plus grand nombre de loci uniques (29 loci) ; ils ont été suivis par les cultivars ivoiriens (4 loci) puis maliens (2). Ce nombre élevé de loci uniques provient surtout du cultivar BF#2.

Tableau X: Nombre de loci et pourcentage de polymorphisme générés dans chaque population de mil étudiée.

| Amorces<br>ISSR          | Pop. ivoirienne |               |              | Pop. Malienne |               |              | Pop. Burkinabée |               |              |
|--------------------------|-----------------|---------------|--------------|---------------|---------------|--------------|-----------------|---------------|--------------|
|                          | Nb total loci   | Nb loci Poly. | % loci poly. | Nb total loci | Nb loci Poly. | % loci poly. | Nb total loci   | Nb loci Poly. | % loci poly. |
| ISSR 1                   | 9               | 5             | 55.56        | 8             | 8             | 100.00       | 10              | 6             | 60.00        |
| ISSR N7                  | 12              | 5             | 41.67        | 14            | 8             | 57.14        | 17              | 11            | 64.71        |
| ISSR 09                  | 11              | 8             | 72.73        | 9             | 3             | 33.33        | 11              | 9             | 81.82        |
| ISSR 857                 | 10              | 9             | 90.00        | 6             | 3             | 50.00        | 10              | 5             | 50.00        |
| ISSR DAT                 | 6               | 4             | 66.67        | 6             | 6             | 100.00       | 8               | 6             | 75.00        |
| ISSR N6                  | 20              | 15            | 75.00        | 21            | 21            | 100.00       | 21              | 11            | 52.38        |
| ISSR 17899A              | 12              | 5             | 41.67        | 12            | 3             | 25.00        | 16              | 10            | 62.50        |
| ISSR 807                 | 8               | 1             | 12.50        | 11            | 5             | 45.45        | 10              | 4             | 40.00        |
| ISSR 887                 | 9               | 3             | 33.33        | 9             | 2             | 22.22        | 10              | 9             | 90.00        |
| ISSR 17899B              | 7               | 4             | 57.14        | 6             | 6             | 100.00       | 7               | 3             | 42.86        |
| <b>Total</b>             | <b>104</b>      | <b>59</b>     | <b>56.73</b> | <b>102</b>    | <b>65</b>     | <b>63.73</b> | <b>120</b>      | <b>74</b>     | <b>61.67</b> |
| <b>Nb de Loci unique</b> |                 | <b>4</b>      |              |               | <b>2</b>      |              |                 | <b>29</b>     |              |

### 3.1.2.5 Analyse de la diversité génétique des populations de mil à travers les statistiques descriptives

Les valeurs des paramètres de diversité génétique (Na : nombre d'allèles observé ; Ne : nombre effectif d'allèles ; He : diversité génétique de Nei ; I : index d'information de Shannon) ont été déterminées à partir des données ISSR et sont présentées dans le tableau XI. Les valeurs les plus élevées de ces paramètres ont été enregistrées chez les cultivars burkinabés (Na= 1,5324 ; Ne=1,3764 ; He=0,2205 et I=0,3219). Les cultivars ivoiriens ont présenté les paramètres de diversité les plus bas (Na=1,4173 ; Ne= 1,3061 ; He= 0,1671 et I=0,2428). Les indices de diversité génétique des cultivars maliens se situaient entre ceux des cultivars burkinabés et ivoiriens avec les valeurs suivantes : Na=1,4604 ; Ne=1,3381 ; He= 0,1853 et I=0,2692. Au niveau de l'ensemble de la population cultivars étudiée, la diversité génétique était relativement plus élevée (Na=1,8849 ; Ne=1,3949 ; He=0,2431 et I=0,3807).

Tableau XI: Valeurs des paramètres de diversité génétique estimés par le logiciel PopGene pour chaque population de mil

| Pop                | Na     | Ne     | He     | I      | Nb LP | PLP (%) |
|--------------------|--------|--------|--------|--------|-------|---------|
| Côte d'Ivoire (CI) | 1,4173 | 1,3061 | 0,1671 | 0,2428 | 58    | 41,73   |
| Mali (ML)          | 1,4604 | 1,3381 | 0,1853 | 0,2692 | 64    | 46,04   |
| Burkina Faso (BF)  | 1,5324 | 1,3764 | 0,2205 | 0,3219 | 74    | 53,24   |
| CI+ML+BF           | 1,8849 | 1,3949 | 0,2431 | 0,3807 | 123   | 88,49   |

Na: nombre d'allèles observé; Ne: nombre effectif d'allèles; He: diversité génétique de Nei (1973); I: index d'information de Shannon; Nb LP : nombre de loci polymorphes ; PPL: pourcentage de loci polymorphes.

### 3.1.2.6 Différenciation génétique et flux de gènes des populations

La différenciation génétique des populations de mil étudiée, telle que calculée par l'AMOVA (Figure 22), a montré que 8% de la variation totale était située entre les populations et 92% de la variation totale provenait de l'intérieur des populations. Le coefficient de différenciation génétique (GST) était de 0,2935 et le flux génétique (Nm) était de 1,2037. Les mesures non biaisées de similarité génétique (SG) de Nei et de distance génétique (DG) entre les trois populations de mil étudié sont recensées dans le tableau XII. Les distances génétiques entre les trois populations variaient de 0,0351 à 0,15660. La plus grande distance génétique (0,15660) a été enregistrée entre les populations maliens et burkinabés ; tandis que la plus petite (0,0351) a été trouvée entre les populations ivoiriens et maliens. Les similitudes génétiques entre les populations étaient fortes et variaient entre 0,8551 (populations de mils burkinabé et malien) et 0,9655 (populations ivoiriens et maliens).

### Pourcentage de variance moléculaire

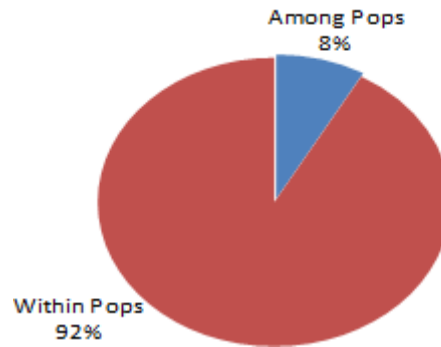


Figure 22: Pourcentage de variance moléculaire (AMOVA)

Tableau XII: Mesure non biaisée de la similitude génétique (au-dessus de la diagonale) et de la distance génétique (en-dessous de la diagonale) de Nei entre les trois populations de mil étudiées.

|               | Pop ivoiriens | Pop maliens | Pop burkinabé |
|---------------|---------------|-------------|---------------|
| Pop ivoiriens |               | 0,9655      | 0,8617        |
| Pop maliens   | 0,0351        |             | 0,8551        |
| Pop burkinabé | 0,1488        | 0,1566      |               |

#### 3.1.2.7 Relation génétique entre les douze cultivars de mils étudiés

Les relations génétiques entre les douze cultivars de mils ont mis en évidence une analyse en coordonnées principales (PCoA). Les première et deuxième coordonnées principales ont représenté 44,77 % (respectivement 30,24 % et 14,53 %) de la variation totale. Le résultat de la PCoA est présenté dans la Figure 23. La PCoA démarque ostensiblement et indiscutablement le cultivar burkinabé BF#2 de tous les autres cultivars de mil. Un autre cultivar qui est relativement bien démarqué des autres est le cultivar malien ML#1. Mais, la PCoA ne montre aucune relation claire entre le regroupement des cultivars de mil en fonction de leur origine géographique. En effet, les cultivars ivoiriens, maliens et burkinabés sont regroupés sur le plan de la PCoA indépendamment de leur origine géographique et les groupes ne sont pas bien discernables.

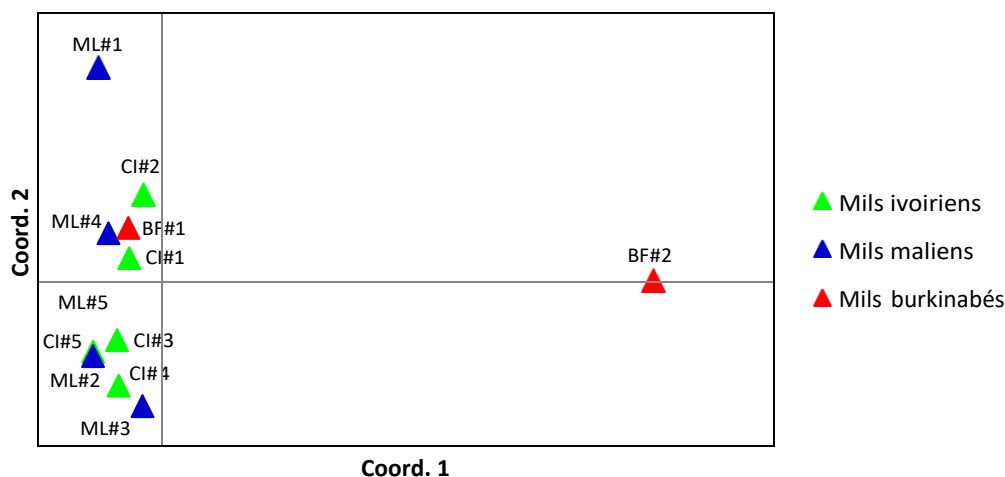


Figure 23: Analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur les données ISSR et montrant les relations entre les douze cultivars de mil étudiés.

Pour visualiser autrement les relations génétiques entre les cultivars de mil et recueillir des informations complémentaires une matrice de dissimilarité (ou dissemblance) a été élaborée (Tableau XIII) en déterminant les coefficients de dissemblance de Jaccard pour chaque paire de cultivar. La détermination de chaque coefficient était basée sur le nombre de loci différents entre chaque paire de cultivars. Fondamentalement, la valeur des coefficients de Jaccard entre deux cultivars est une indication de leur similitude génétique ou dissemblance génétique. Une paire de cultivars avec une valeur plus élevée est plus différente qu'une paire avec une valeur inférieure Konan *et al.*, (2020). Les coefficients de dissemblance de Jaccard obtenus, variaient de 0,159 à 0,740 avec une moyenne de 0,355. La plus faible dissemblance génétique (0,159), autrement dit la plus forte ressemblance génétique a été notée entre les cultivars ivoiriens CI#5 et maliens ML#2. La plus grande dissemblance génétique a été observée entre les cultivars maliens ML#1 et burkinabés BF#2 (coefficient de dissemblance de 0,740). Par ailleurs, le cultivar BF#2 s'est montré notablement dissemblable aux autres cultivars avec des coefficients de dissemblance largement au-dessus de la moyenne. Ses coefficients de dissemblance variaient de 0,590 à 0,740, avec une moyenne de 0,626 pratiquement le double de la moyenne observée pour l'ensemble des cultivars qui était de 0,355.

Un arbre non enraciné a été construit par l'analyse des données sur la base des coefficients de dissimilarité de Jaccard et de la méthode du neighbor-joining (Figure 24). Cet arbre a divisé les douze cultivars de mil étudiés en trois groupes (I, II, III). Le groupe I comprenait les

cultivars BF#2 et ML#3 ; le groupe II les cultivars CI#3, ML#5, CI#5, ML#2 et CI#4 ; et enfin les cultivars ML#4, CI#2, ML#1, CI#1 et BF#1 formaient le groupe III.

Tableau XIII: Matrice de distance génétique présentant les coefficients de dissimilarité de Jaccard entre les douze cultivars de mil sur base des données ISSR

|      | CI#1  | CI#2  | CI#3  | CI#4  | CI#5         | ML#1         | ML#2  | ML#3  | ML#4  | ML#5  | BF#1  | BF#2 |
|------|-------|-------|-------|-------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| CI#1 | 0     |       |       |       |              |              |       |       |       |       |       |      |
| CI#2 | 0,293 | 0     |       |       |              |              |       |       |       |       |       |      |
| CI#3 | 0,286 | 0,266 | 0     |       |              |              |       |       |       |       |       |      |
| CI#4 | 0,333 | 0,351 | 0,230 | 0     |              |              |       |       |       |       |       |      |
| CI#5 | 0,347 | 0,275 | 0,207 | 0,238 | 0            |              |       |       |       |       |       |      |
| ML#1 | 0,453 | 0,386 | 0,433 | 0,471 | 0,412        | 0            |       |       |       |       |       |      |
| ML#2 | 0,284 | 0,319 | 0,236 | 0,247 | <b>0,159</b> | 0,419        | 0     |       |       |       |       |      |
| ML#3 | 0,361 | 0,396 | 0,319 | 0,314 | 0,310        | 0,517        | 0,299 | 0     |       |       |       |      |
| ML#4 | 0,247 | 0,187 | 0,217 | 0,267 | 0,244        | 0,356        | 0,272 | 0,351 | 0     |       |       |      |
| ML#5 | 0,258 | 0,217 | 0,169 | 0,239 | 0,174        | 0,404        | 0,244 | 0,326 | 0,187 | 0     |       |      |
| BF#1 | 0,247 | 0,319 | 0,275 | 0,326 | 0,322        | 0,361        | 0,292 | 0,337 | 0,290 | 0,244 | 0     |      |
| BF#2 | 0,606 | 0,590 | 0,598 | 0,630 | 0,636        | <b>0,740</b> | 0,639 | 0,639 | 0,605 | 0,590 | 0,617 | 0    |

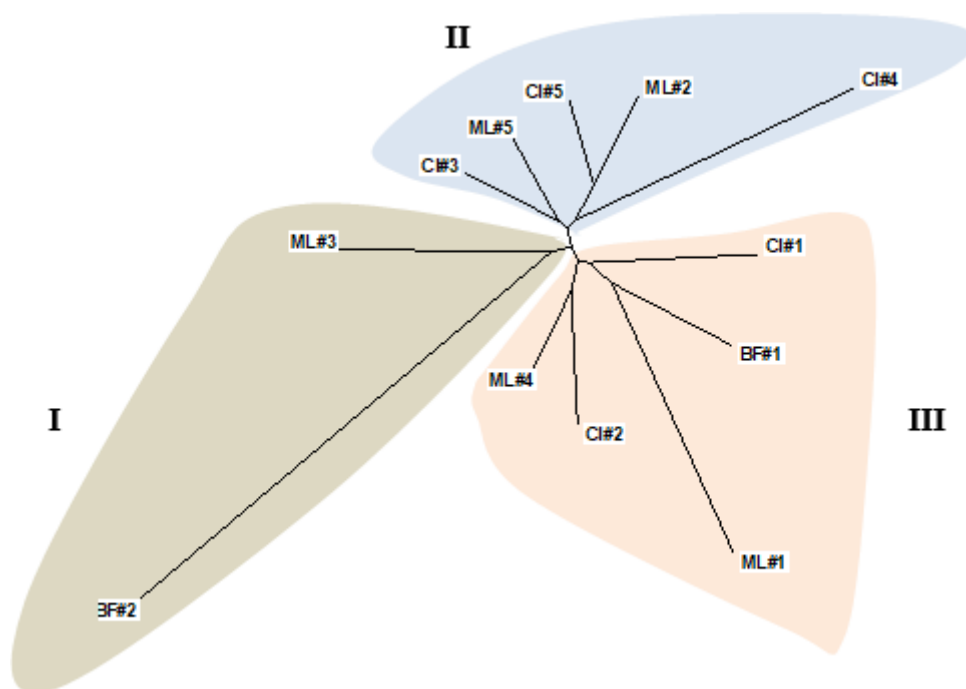


Figure 24: Arbre non enraciné construit sur la base des coefficients de dissimilarité de Jaccard et de la méthode du neighbor-joining et montrant les relations au sein des cultivars de mils étudiés



## 3.2 Discussion

Dans cette étude, douze cultivars de mil en provenance de la Côte d'Ivoire, du Mali et du Burkina Faso ont fait l'objet d'une évaluation de la diversité génétique à l'aide de descripteurs phénotypiques de la graine et de marqueurs moléculaires ISSR. L'évaluation de la diversité génétique au sein d'une ressource génétique présente un intérêt pour la conservation et la sélection variétale. En conséquence, la mise en évidence de cette variabilité est essentielle dans la description des ressources génétiques. Cela peut être réalisée tant par des approches phénotypiques, que par des techniques moléculaires. Dans la présente étude, les deux approches ont été explorées. Concernant la première, l'analyse de variance des six caractères phénotypiques utilisés pour caractériser les cultivars de mil a révélé l'existence d'une variabilité inter et intra populations qui peut être utilisée pour discriminer les cultivars. En général, les études morphologiques chez les cultivars d'Afrique de l'ouest ont très souvent révélé une grande variabilité phénotypique (Sattler *et al.*, 2017). Selon Pucher *et al.*, (2015) ; la diversité des cultivars en Afrique de l'Ouest, même au sein d'un groupe limité, serait liée au fait que cette partie de l'Afrique est l'un des centres d'origine et de diversification de cette culture. Parmi les caractères quantitatifs des graines, le poids des grains a constitué une variable assez discriminante entre les cultivars car probablement beaucoup moins influencé par les critères de sélection du paysan comme l'a rapporté Zangre *et al.*, (2009). Par contre, au niveau des caractères qualitatifs, la fréquence dominante de la couleur grise et de la forme obovale/globulaire pourrait être attribuée à la préférence des consommateurs pour ces caractères, conduisant à leur sélection par l'agriculteur au cours des cultures année après année. Ce même résultat a été obtenu par Abdulhakeem (2019) sur la diversité morphologique des cultivars au nord du Nigéria.

L'ACP et la classification ascendante hiérarchique (CAH) basée sur les caractères phénotypiques des graines ont regroupé les cultivars étudiés en quatre groupes. Globalement, ce regroupement montre des groupes contenant des cultivars provenant de pays différents ; ce qui indique qu'il n'y a aucune association entre la variabilité phénotypique observée et la répartition géographique des cultivars. Selon Abdulhakeem (2019) cela pourrait être attribué aux mouvements transfrontaliers des semences de mil courants depuis des lustres entre les agriculteurs africains. Une grande différenciation a été mise en évidence entre le cultivar Burkinabé BF#2 et tous les autres cultivars. Cette grande différence explicitement manifestée tant à travers les distances génétiques qu'à travers la formation d'un groupe clairement isolés par l'ACP et le CAH et comprenant uniquement BF#2, suggère la présence chez ce cultivar

d'un nombre important de gènes différents de ceux des autres cultivars étudiés. BF#2 apparaît donc comme un cultivar intéressant pour l'amélioration génétique du mil.

Au niveau de l'analyse moléculaire, toutes les amorces ISSR utilisées ont donné avec succès des amplifications chez tous les cultivars de mils étudiés. Ce succès traduit la réussite des extractions d'ADN et montre que la quantité et la qualité obtenue de chaque extrait étaient suffisantes pour permettre des amplifications. Ce résultat traduit aussi l'efficacité du protocole utilisé pour la PCR et la révélation des amplicons. Les dix amorces utilisées ont révélé un nombre élevé de loci (139 loci). Cela confirme la capacité des marqueurs ISSR utilisés à amplifier de nombreux fragments d'ADN par individu (Ye *et al.*, 2008). Sur les 139 loci révélés, 122 se sont montrés polymorphes soit un taux de polymorphisme de 87,77 %. Ce haut taux de polymorphisme montre que les amorces utilisées sont très informatives en termes de mise en évidence du polymorphisme chez le mil. Ce résultat indique que les marqueurs ISSR sont potentiellement efficaces pour la caractérisation de différents génotypes de mil. Selon Mahmoud & El-Mansy (2012), l'efficacité de ce marqueur dominant de type microsatellite est due à sa capacité à révéler les variations des nombreuses régions inter-microsatellites dispersées dans les génomes. En fait, cette classe de marqueurs moléculaires est basée sur des répétitions inter-tandem de courtes séquences d'ADN (Shrivastava *et al.*, 2018). Ces régions se trouvent entre les nombreuses répétitions microsatellites des génomes et offrent un grand potentiel pour déterminer les différences intra et inter-génomiques (Shrivastava *et al.* 2018 ; Husnudin *et al.* 2019).

Les cultivars burkinabés ont exhibé le plus grand nombre de loci polymorphes (74 loci polymorphes contre 65 et 59 pour les cultivars maliens et ivoiriens respectivement). De même, les valeurs des paramètres de diversité génétique, notamment la diversité génétique de Nei ( $H_e$ ) et l'indice de diversité de Shannon ( $I$ ) des cultivars burkinabés ( $H_e=0,2205$  et  $I=0,3219$ ), étaient plus élevées que celles des cultivars maliens ( $H_e= 0,1853$  et  $I=0,2692$ ) et ivoiriens ( $H_e=0,1671$  et  $I=0,2428$ ). Ces résultats indiquent une plus grande diversité génétique des cultivars burkinabés ; viennent ensuite les cultivars maliens, tandis que les cultivars ivoiriens présentaient la plus faible diversité génétique. La valeur du paramètre de diversité génétique de Nei de l'ensemble des cultivars étudié, toute population confondue, était de  $H_e=0,2431$ . Cette valeur est assez faible comparée à la moyenne de  $H=0,53$  obtenu par Onsarigo, (2018) sur des cultivars primitifs d'Afrique de l'ouest. Le résultat de la présente étude suggère donc la présence d'une faible diversité génétique au sein de l'ensemble des cultivars étudiés, malgré le taux de polymorphisme élevée des amorces. Des résultats

comparables ont également été obtenus par Bougma *et al.*, (2021) qui rapporte un faible niveau de diversité génétique du cultivar cultivé aujourd'hui en Afrique sub-saharienne. Selon cet auteur, l'érosion génétique des espèces cultivées de mil dans plusieurs pays d'Afrique subsaharienne s'accroît. Pour lui, l'érosion génétique due aux actions anthropiques a réduit la diversité génétique du mil cultivé. Mariac *et al.* (2006) de leur côté, en comparant la quantité d'allèles entre les accessions sauvages et cultivées de mil ont obtenu une richesse allélique plus faible chez le mil cultivé par rapport au type sauvage. Le faible niveau de diversité génétique du mil cultivé aujourd'hui, en Afrique subsaharienne pourrait être attribué aux changements climatiques et aux contraintes biotiques conduisant à des pressions de sélection qui au fil du temps diminuent la diversité génétique. En effet, face aux contraintes, les agriculteurs ruraux ont tendance à sélectionner les cultivars pour des critères de performance agronomique et de résistance au détriment de la conservation des ressources génétiques (Bougma *et al.* 2021). Ainsi, Dagba *et al.* (2018) rapporte l'abandon de certains cultivars locaux de mil par les producteurs béninois, face aux diverses contraintes signalées. Au regard du faible niveau de diversité génétique observé, notamment des cultivars ivoiriens, un plan de collecte pour constituer une collection de base des mils cultivés et primitifs serait une option pour la conservation et pour soutenir les programmes de sélection de cette espèce.

Les paramètres de différenciation génétique entre les populations de cultivars étudiées (cultivars ivoiriens, cultivars maliens et cultivars burkinabés) ont donné des valeurs assez faibles. Ainsi l'AMOVA a révélé que seulement 8 % de la variation totale résidait entre les populations. Quant au coefficient de différenciation génétique (GST), sa valeur de 0,2935 signifie que seulement 29,35% de la variabilité totale pouvait être attribués à la différenciation entre les populations de cultivars étudiées. Ces résultats indiquent l'existence d'une forte similitude entre les différentes populations de cultivars étudiés. Cela se confirme par les très faibles distances génétiques non biaisées de Nei trouvées entre les trois groupes de cultivars (entre les cultivars ivoiriens et maliens, cultivars ivoiriens et burkinabés et entre cultivars burkinabés et maliens). Parallèlement, les valeurs de similitude de Nei sont fortes (entre cultivars burkinabés et maliens, entre cultivars ivoiriens et burkinabés et entre cultivars ivoiriens et maliens). Cette faible distance génétique et étroite similitude génétique entre les cultivars ivoiriens, burkinabés et maliens signifie que ces groupes de cultivars partagent étroitement le même patrimoine génétique. Cela pourrait résulter d'un mouvement soutenu de semences entre ces pays. En effet, la proximité des populations du nord de la Côte d'Ivoire (zone de production du mil) tant géographiquement que culturellement avec le Mali et le Burkina Faso

permet une fréquence élevée d'échange de semences entre agriculteurs ; ce qui expliquerait la presque homogénéité génétique observée dans cette étude. Des résultats similaires ont été rapportés par Bougma *et al.*(2021) sur la forte similitude de populations de mils provenant de régions géographiquement différents mais ayant des échanges réguliers et permanents de semences entre agriculteurs.

L'analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur les données ISSR n'a montré aucun regroupement des cultivars selon leur origine. Globalement, des cultivars de différentes origines étaient associés ensemble. La PCoA révèle donc que la structuration de la diversité génétique des cultivars de mils étudiés est indépendante de leur origine géographique, exactement comme dans le cas des caractères phénotypiques de la graine. L'Arbre nonenraciné construit sur la base des coefficients de dissimilarité de Jaccard et de la méthode d'agrégation de neighbor-joining confirme ce schéma de regroupement. Chacun des trois groupes fournis par cet arbre contient des cultivars de différentes origines. Ce manque de correspondance entre la classification moléculaire et l'origine géographique montre qu'il existe une grande similitude génétique entre les groupes de mils étudiés. Comme mentionné précédemment dans le cas de l'analyse phénotypique, cela pourrait être lié à l'échange de semences entre agriculteurs des différentes régions qui a fortement contribué au mélange des accessions. Des résultats similaires d'analyses moléculaires ont été trouvés par d'autres auteurs comme Mariac *et al.* (2006), Bashir *et al.* (2014), Adeoti *et al.*, (2017) montrant que l'origine géographique ne reflète pas nécessairement la diversité génétique des accessions de culture faisant l'objet de fréquents échanges entre agriculteurs.

Les résultats de la PCoA et de l'arbre non enraciné ont isolé clairement le génotype BF#2, pareillement comme dans l'analyse phénotypique, indiquant indubitablement une forte différence génétique entre ce cultivar de mil et les autres cultivars. Le grand nombre de loci uniques enregistré chez les cultivars burkinabé (29 loci uniques contre 4 pour les cultivars ivoiriens et 2 pour les maliens) est dû à ce cultivar BF#2. Ce résultat suggère la possibilité pour ce matériel d'héberger un grand nombre de gènes unique lui conférant un patrimoine génétique singulier intéressant pour la sélection. En effet, selon Mohammed, (2018) les individus avec des profils d'ADN les plus distincts sont susceptibles de contenir le plus grand nombre de gènes unique potentiellement utiles agronomiquement et en amélioration variétale. Néanmoins, cette trop grande singularité de BF#2 dans ce contexte d'homogénéité manifesté par les mils étudié suggère qu'une attention particulière soit accordé à ce cultivar lors de la caractérisation agromorphologique des mils étudiés en cours actuellement à UJLoG.

# **Conclusion**

## Conclusion

Cette étude a clairement montré qu'il était possible de produire de très bonnes amplifications chez des accessions de *P. glaucum* avec des amorces ISSR et d'utiliser les empreintes génétiques générées pour étudier la diversité et les relations génétiques entre différents mils. Les résultats des analyses ISSR ont révélé l'existence d'une diversité génétique relativement modérée au sein des cultivars de mils étudiés et un faible degré de différenciation génétique entre les différentes provenances. Les analyses multivariées ont mis en exergue une structuration de la diversité génétique indépendante de l'origine géographique des cultivars laissant supposer un taux d'échanges régulier de semences transfrontalier. Les regroupements morphologiques et moléculaires ont néanmoins isolé un cultivar burkinabé (BF#2) qui est très génétiquement éloigné des autres cultivars et qui pourrait posséder des gènes uniques intéressants pour l'amélioration variétale. Hormis quelques variations mineures dans les regroupements, l'analyse phénotypique et moléculaire ont donné des informations globalement assez comparables. Parmi les dix amorces ISSR (ISSR 1, ISSR DAT, ISSR N6, ISSR 887, ISSR 17899B et ISSR 807) utilisées six amorces sont polymorphes.

Au terme de cette étude, les résultats appellent la recommandation que des efforts urgents soient entrepris pour élargir le pool génétique du mil cultivé. Pour ce faire les perspectives suivantes pourraient être envisagées :

1. Une étude similaire doit être menée avec un plus grand nombre d'accessions pour consolider les résultats obtenus.
2. Un plan de collecte de mils cultivés et primitifs doit être élaboré pour constituer une banque de matériel génétique diversifié utile pour la conservation et pour soutenir les programmes d'amélioration variétale.
3. La collection réalisée doit être caractérisée par des descripteurs agromorphologiques et des marqueurs moléculaires afin d'identifier les génotypes les plus divergents et utilisables dans des programmes d'hybridation visant à fournir aux producteurs des variétés de mils plus diversifiées et capable de faire face aux contraintes biotiques et abiotiques.
4. Il est également impératif d'intégrer les agriculteurs dans les programmes de conservation et d'amélioration de la culture parce qu'ils jouent un grand rôle dans le maintien du patrimoine génétique du mil. Une telle stratégie permettra la sélection végétale participative dans un cadre où les agriculteurs et les sélectionneurs travailleront ensemble pour développer des variétés d'intérêt acceptées de tous.

## **REFERENCES**

## Références

- Abdulhakeem A., Ahmed F. O., Omoniyi A. M., Kayode O. I. & Yusuf D.O.A. (2019). Genetic diversity studies for morphological traits in pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) landraces of Northern Nigeria. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, , 07 (02), 060–070.
- Adeoti K., Djedatin G., Ewedje E., Beule T., Santoni S., Rival A. et Jaligot E. (2017). Assessment of genetic diversity among cultivated Pearl millet (*Pennisetum glaucum*, Poaceae) accessions from Benin, West Africa. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 16 (15), pp. 782-790,
- Akanvou L., Akanvou R., Kouakou C. K., N'da H. A. & Koffi K. G. C. (2012) de la diversité agro morphologique des accessions de mil [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] collectées en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences* 50: 3468– 3477 Evaluation.
- Amadou, I, Gounga, M E, & Le, G-W: (2013). Millets: Nutritional composition, some health benefits and processing - A Review. *Emir. J. Food Agric.* 25, 501- 508.
- Anderson M., Schulze-Kraft R., Peters M., Hincapie B. & Lascano C. (2006). Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research*, **96**: 387- 406.
- Anonyme. 2004. Evaluation de l'impact de techniques d'intensification sur la production de mil à l'échelle du territoire du Niger, p. 186
- Bashir E. M. A., Abdelbagi M. A., Adam M. A., Albrecht E. M., Heiko K. P. & Hausmann B. I. G. (2014). Characterization of Sudanese pearl millet germplasm for agromorphological traits and grain nutritional values. *Plant Genet. Resour.* 12:35-47.
- Bekoye M: (2011). Caractérisation chimique et minérale des grains de mil [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] de Côte d'Ivoire. In "Int. J. Biol. Chem. Sci. ", Vol. 5, pp. 2039- 2044
- Bernardes A.D.P., (2012). Rendement en biomasse et en sucres et valeur nutritive du millet perlé sucré et du sorgho sucré en fonction de la date de récolte et du délai entre le hachage et le pressage du fourrage (Doctoral dissertation, Université Laval). [www.theses.ulaval.ca/2012/29074/29074.pdf](http://www.theses.ulaval.ca/2012/29074/29074.pdf)
- Bougma L. A., Ouedraogo M. H., Ouoba A., Zoure A. A., Sawadogo N. , & Sawadogo M. (2021). Genetic Differentiation for Gene Diversity among Pearl Millet (*Pennisetum*



- glaucum* (L.) R. Br.) Landraces As Revealed by SSR Markers. International Journal of Agronomy, Volume 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6160903>
- C. Mariac, V., Luong I., Kapran *et al.*, (2006) “Diversity of wild and cultivated pearl millet accessions (*Pennisetum glaucum* [L.] R.Br.) in Niger assessed by microsatellite markers,” Theoretical and Applied Genetics, vol. 114, no. 1, pp. 49–58,.
- CNRA (2005). Bien cultiver le mil en Côte d’Ivoire
- Dagba R. A., Missihoun A. A., Sedah P., Agbo R. I. & Agbangla C. (2018). Genetic diversity of cultivated millet varieties (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) in Benin Using Microsatellite Markers (SSR) and impact of farmer’s practices on their genetic structuring. Journal of Natural Product and Plant Resources, 8 (3): 23-40
- D'Andrea AC, Klee M and Casey J: 2001. Archaeobotanical evidence for pearl millet (*Pennisetum glaucum*) in sub- Saharan West Africa. Antiquity 75, 341- 348.
- De Vienne & Santoni S. (1998). Les principales sources de marqueurs moléculaires. In : Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologie végétales. *Institut national de la recherche agronomique*, Paris (France) 15-47.
- De Vienne D. (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. *Inra édition*, 200 p.
- FAO ( Food and Agriculture Organisation) (1995). Production year book. *FAO*, Rome (Italy) 49p.
- FAOSTAT (2020). Agricultural production, crop primary database. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome. <http://faostat.fao.org/faostat/>. Consulté le 22/02/2022.
- Gupta S., Souframanien J. & Gopalakrishna T. (2008). Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. *Genome*, 51: 628-637
- Harry M. (2001). Génétique moléculaire et évolutive. *Editions Maloine*, Paris (France), 39 p.
- Hausmann B. I. G. (2017). Characterization of West and Central African accessions from a pearl millet reference collection for agromorphological traits and Striga Resistance. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 16(3); 260–272
- Husnudin U. B., Daryono B. S. & Purnomo. (2019). Genetic variability of Indonesian Eggplant (*Solanum melongena*) based on ISSR markers. *Biodiversitas* 20 (10): 3049- 3055.

- IBPGR ET ICRISAT. (1993). Descripteurs du mil pénicillaires [*Pennisetum glaucum* (L) R. Br]. Conseil international des ressources phytogénétiques, Rome, Italie; Institut International de Recherches sur les Culture des Zones Workshop, Nwanze KF, Youm O (ed). ICRISAT Center Patancheru: Patancheru; 135-145.
- Illiassou Y. (2009). Evaluation de l'effet de l'application périodique de l'urine hygiénisées sur la culture de mil (*Pennisetum glaucum*). Mémoire, Université Abdou Moumouni de Niamey, Niamey ; p. 39.
- Kadri A., Halilou H. et Karimou I. (2019). Culture du mil [*Pennisetum glaucum* (L) R. Br] et ses contraintes à la production: une revue). *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 13(1): 503-524
- Konan N.O., Akaffou M.A., Kouadio L., Akaffou D.S & Mergeai G. (2020). Genetic diversity of exotic and local eggplants (*solanum* spp.) cultivated in Côte d'Ivoire based on ISSR markers. *Biodiversitas*, pages 3650-2657.
- Kouakou C .V., Béné J.C. K., Kouamé A. N., Kouamé Y. C., Bamba K. (2017). Diversity Distribution and Social Structure of Monkey Species in Forest Fragment of Gbetitapea, Central Western Ivory Coast. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 1(8): 127-143.
- Lewin, B. (1992). *Genes. Flamarion médecine\_sciences*
- Mahmoud M. I. & El-Mansy A. B. (2012). Molecular identification of eggplant cultivars (*Solanum melongena* L.) using ISSR markers. *J Appl Sci Res* 8 (1): 69-77.
- Manning K: 2010. A developmental history for early West African agriculture. In "West African Archaeology New developments, new perspectives Edited by Philip Allsworth- Jones", Vol. 2164 pp. 12. BAR International.
- Manning, K., Pelling, R., Higham, T., Schwenniger, J.L., et Fuller, D.Q. 2011. 4500-Year old domesticated pearl millet (*Pennisetum glaucum*) from the Tilemsi Valley, Mali: new insights into an alternative cereal domestication pathway. *J. Archaeol. Sci.* 38(2):312-322.
- Marchais L, Tostain S and Amoukou I: 1993. Signification taxonomique et évolutive de la structure génétique des mil s pénicillaires. In "Le mil en Afrique, " (S. Hamon, ed.), pp. 119-1 28. ORSTOM, Paris, France.
- Mariac C., Luong V., Kapran I., Mamadou A., Sagnard F., Deu M., Chantereau J., Gerard B., Ndjeunga J., Bezancon G., Pham J. L. et Vigouroux Y. (2006). Diversity of wild and

- cultivated pearl millet accessions (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) in Niger assessed by microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 114:49-58.
- McBenedict B. (2015). The Genetic Diversity Of *Pennisetum Glaucum* (L.) R. Br. (Pearl Millet) Landraces In Namibia. Thèse , University Of Namibia, 169 p
- Mohammed H. I. & Hamza N. B. (2018). Genetic Diversity Analysis of Forty Pearl Millet (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br) Accessions from Sudan Using Agronomical Descriptors and DNA Molecular Markers. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 9 : 322-337.
- Nambiar VS, Dhaduk J, Sareen N, Shahu T. & Desai R: 2011a. Potential functional implications of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) in health and disease. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 1, 62.
- NIN: 2003. Nutritive value of Indian Foods, Ed Gopalan and Deosthale. (N. I. o. Nutrition, ed.). NIN, Hyderabad. [www.trove.nla.gov.au/work/17516887](http://www.trove.nla.gov.au/work/17516887)
- Onsarigo M.N. & Kiambi D.K. (2018). Evaluation of genetic diversity of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) landraces from West Africa using microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 17 : 1339-1351
- Ouazzani N., Lumaret R., Villemur P. & Giusto Di F (1993). Leaf allozyme variation in cultivated and wild olive trees (*Olea europaea* L). *Journal Heredity*, 84 : 34-42
- Parizeau M. H. (1997). La biodiversité (livre). *De Boeck et Larcier*, Département Boeck et Larcier, Université Paris Bruxelles (Belgique), 121 p.
- Pernès J. (1984). Gestion ddes ressources génétiques des plantes. *Tome 2 Manuel, Agence de coopération culturelle et technique, Paris* (France), 346 p.
- Pucher A., Sy O., Ignatius I. Angarawai, Gondah J., Zangre R., Ouedraogo M., Moussa D., Sanogo S., Boureima, C., Hash T., Bettina I.G. & Haussmann (2015). Agromorphological Characterization of West and Central African Pearl Millet Accessions. *crop science*, 55 : 737-748
- Quian W., Ge S. & Hong, D. (2001). Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 102 : 440- 449.
- Ramulu P & Rao PU: (2003). Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits. *Journal of Food Composition and Analysis* 16, 677-685.
- SAINT-CLAIR (P.M.): Les cultures vivrières, Tome II, Les cultures importantes de l'espace tropical, 1987, 137 p.

- Samouelian F., Gaudin V. & Boccara M (2009). Génétique moléculaire des plantes. Versailles (France), Editions Quae, 208 p.
- Saritha A, Durgaraju C, Srivastava RK, Kanakadurga K, Reddy N, Sharma R, Katiyar P. & Dangi K. S. (2017). Genetic Variability for Downy Mildew Disease Incidence in Mapping Population Parents of Pearl Millet. *Int. J. Pure App. Biosci*, 5(4): 689-697.
- Sattler F. T., Sanogo M. D., Kassari I. A., Angarawai I. I., Gwadi K. W., Dodo H. & Sharma A. (2001). Marker-assisted Improvement of Pearl Millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] Downy mildew resistance in elite hybrid parental line (Doctoral thesis, Chaudhary Charan Singh Haryana Agricultural University, Hisar, India).
- Sattler F. T., Sanogo M. D., Kassari I. A., Angarawai I. I., Gwadi K. W., Dodo H. & Haussmann. (2017). Characterization of west and central African accessions from a pearl millet reference collection for agro-morphological traits and Striga resistance. *Plant Genetic Resources* 16, 1-13.
- Shah I.A., Khan I., Mir S.A., Pukhta M.S., Dar Z.A & Lone A. (2018) Genetic Diversity by Multivariate Analysis Using R Software. *International Journal of pure & Applied Bioscience* 6(3). 81-190.
- Shrivastava S., Sharma S., Das P. (2018). Screening and identification of molecular marker for fingerprinting of brinjal hybrids and its parental lines. *Int J Curr Biotechnol* 6 (1) :1-5.
- Stanton M., Stewart J., Percival A. & Wendel J. (1994). Morphological diversity and relationships in A-genome cottons, *Gossypium arboreum* and *G. herbaceum*. *Crop Science*. 34 : 519-527.
- Upadhyaya H.D., Reddy K.N. & Sastry D.V.S.S.R. 2008. Directives pour la régénération : mil à chandelles. In: Dulloo M.E., Thormann I., Jorge M.A. and Hanson J., editors. Crop specific regeneration guidelines [CD-ROM]. CGIAR System-wide Genetic Resource Programme (SGRP), Rome, Italy. 10 pp.
- Ye Y., Zhang J., Ning G. & Bao M. (2008). A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae* **118** : 1-7.
- Yin T., Zhang X., Huang M., Wang M., Zhuge Q., Tu S. & Wu R. (2002). Molecular linkage maps of the *Populus* genome. **45**: 541-55.
- Zangre R. G., Sawadogo M., Ouedraogo M. et Balma D. (2009) Caractérisation et stratification d'une collection de mil (*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.) du Burkina Faso. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3(5): 1042-1056,

Zietkiewicz E., Rafalski A. & Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176-183.

## Résumé

Le mil est une céréale importante, qui pourrait jouer un rôle essentiel dans les programmes de lutte contre l'insécurité alimentaire et la pauvreté. Cependant, en Côte d'Ivoire, il fait encore partie des céréales secondaires qui souffrent d'une série de problèmes de production (sensibilité aux maladies, faible rendement, long cycle de production) par manque d'attention scientifique soutenue. Pour améliorer cette plante, il est important d'explorer sa diversité génétique. C'est dans cette optique que douze cultivars de mil ivoiriens, maliens et burkinabés ont fait l'objet d'une analyse moléculaire (ISSR) et d'une caractérisation phénotypique des graines. Les dix amorces ISSR utilisées ont révélé 139 loci dont 122 se sont montrés polymorphes soit un taux de polymorphisme de 87,77 %. Cependant, les paramètres de diversité génétique ont montré l'existence d'une diversité génétique relativement modérée et un faible degré de différenciation génétique entre les différentes provenances, faisant craindre la présence d'une érosion génétique. Les analyses multivariées ont mis en évidence une structuration de la diversité génétique indépendante de l'origine géographique des cultivars, laissant supposer un taux d'échanges transfrontaliers régulier de semences. Les regroupements phénotypiques et moléculaires ont néanmoins isolé un cultivar burkinabé (BF#2) qui est très génétiquement éloigné des autres et qui pourrait posséder des gènes uniques intéressants pour l'amélioration variétale.

**Mots clés :** mil, diversité génétique, phénotypiques, moléculaires

## Abstract

Millet is an important cereal, which could play a key role in programs to combat food insecurity and poverty. However, in Côte d'Ivoire, it is still one of the coarse grains that suffers from a series of production problems (susceptibility to diseases, low yield, long production cycle) due to a lack of sustained scientific attention. To improve this plant, it is important to explore its genetic diversity. It is with this in mind that twelve cultivars of Ivorian, Malian and Burkinabe millet were subjected to molecular analysis (ISSR) and phenotypic characterization of the seeds. The ten ISSR primers used revealed 139 loci of which 122 were found to be polymorphic, giving a polymorphism rate of 87.77%. However, the genetic diversity parameters showed the existence of a relatively moderate genetic diversity and a low degree of genetic differentiation between the different provenances, raising fears of the presence of genetic erosion. The multivariate analyzes highlighted a structuring of the genetic diversity independent of the geographical origin of the cultivars, suggesting a rate of regular cross-border exchange of seeds. The phenotypic and molecular groupings nevertheless isolated a Burkinabe cultivar (BF#2) which is very genetically distant from the others and which could possess unique genes of interest for varietal improvement.

**Keywords:** millet, genetic diversity, phenotypic, molecular