



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master
Domaine : science de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Biodiversité et physiologie végétale

Thème

Electrophorèse des protéines du pois (*pisum sativum* L) : cas des variétés cultivés en Algérie

Par : ANANI Leila

le : 11/07/2021

Jury d'évaluation:

Président : LABBANI Zelikha Pr. Université Mentouri Constantine.

Encadreur : HAMMOUDA.-BOUSBIA Dounia. MCA Université Mentouri Constantine.

Examinatrice : ZOGHMAR Meriem . MCB Université des frères Mentouri Constantine.

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2020/2021

Remerciement

Au terme de ce travail,

*D'abord, nous remercions ALLAH, Le Tout Puissant, Omnipotent,
Clément pour avoir guidé et soutenu nos pas et nous a donné le
courage et la volonté pour mener à terme ce travail.*

Le présent travail a été réalisé au niveau du laboratoire de CRBT

Centre de Recherche de Biotechnologie

Nous voudrions remercier du fond du cœur Notre encadreur

*Madame **HAMMOUDA BOUSBIA Dounia** (MCA- UFM*

*Constantine), qui a encadré cette étude au quotidien et avoir
proposé ce thème et nous avoir formés tout au long de ce travail.*

*Nous lui disons merci encore pour sa totale disponibilité et sa
modestie à notre égard. Nous tenons à remercier les membres de*

jury

*Madame la présidente du jury : **Dr. LAABANI ZELIKHA***

***professeure a** l'Université des Frères Mentouri Constantine 1*

qui à accepter et bien voulu nous faire

*Madame la Examinatrice: **ZOGHMAR MERIEME** MCB-UFM*

Constantine

Qui a examiner ce modeste travail .

*Nos vifs remerciements sont adressés pareillement à tous mes
enseignants et à toute l'équipe BPV y compris mes amis de la*

promo.

*En fin et profondes reconnaissances à tous ceux qui ont participé de
près ou de loin à la réalisation de ce travail mais qui ne sont pas cités*

ici, nous les remercions tous chaleureuse.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

A mes parents pour leurs sacrifices, leur soutien et leur prières tout au long de
mes études.

Leila

Résumé :

Les fabacées sont considérées comme la troisième plus grande famille, qui comprend plus de 727 genres et 20000 espèces. Le genre *Pisum* compte de 180 à 210 espèces.

Le genre *pisum* ont une grande importance économique et agricole. L'étude du SDS-PAGE pour les protéines de stockage des graines (protéines soluble et non soluble) ont été réalisées sur treize variétés de *Pisum sativum* L (recueillies auprès de l'Algérie, pour découvrir les relations phylogénétiques entre ces espèces.

L'électrophorèse des protéines est une méthode d'analyse d'un mélange de protéines par une électrophorèse sur gel. Elle repose sur la capacité des protéines chargées à migrer au travers des pores d'un gel lorsqu'on applique un courant électrique.

L'électrophorèse est une technique chimique d'analyse des masses des molécules. Si on maîtrise la porosité fine du gel, les molécules vont migrer vers le pôle électrique opposé de leur charge en fonction de leur taille.

nous nous sommes intéressés à l'analyse biochimique des protéines totales, en utilisant la technique de SDS –PAGE, d'une part et d'autre part, à l'analyse de la variabilité génétique grâce aux marqueurs microsattlites, et ceci sur treize variétés de *pisum sativum* L.

De plus la classification hiérarchique illustrant les relations entre les treize variétés appartenant à l'espèce (*pisum sativum* L), a montré que ces derniers sont généralement assez distants sauf les variétés Guifilo, Guiferdo, Aroubia, Combadoz, Dorian, Sara, Sefrou, Aroubia, sirmakelvedon présente un taux de similarités de 95%.

Mots clés : *pisum sativum* L, SDS PAGE, électrophorèse.

Summary

Fabaceae are considered the third largest family, which includes over 727 genera and 20,000 species. The genus *Pisum* has 180 to 210 species

The *Pisum* species are of great economic and agricultural importance. The SDS-PAGE study for seed storage proteins (soluble and non-soluble proteins) was carried out on thirteen species of *Pisum sativum* (collected from Algeria, for discover the phylogenetic relationships between these species

Protein electrophoresis is a method of analyzing a mixture of proteins by gel electrophoresis. It relies on the ability of charged proteins to migrate through the pores of a gel when an electric current is applied.

Electrophoresis is a chemical technique for analyzing the masses of molecules. If we control the fine porosity of the gel, the molecules will migrate to the opposite electric pole of their charge depending on their size

We are interested in the biochemical analysis of total proteins, using the technique of SDS -PAGE, on the one hand and on the other hand, in the analysis of genetic variability thanks to microsatellite markers, and this on thirteen varieties of *Pisum sativum*.

In addition, the hierarchical classification illustrating the relationships between the thirteen varieties belonging to the species (*Pisum sativum* L), showed that the latter are generally quite distant except for the varieties Guifilo, Guiferdo, Aroubia, Combadoz, Dorian, Sara, Sefrou, Aroubia, sirmakelvedon presents a similarity rate of 95%.

Key words: *Pisum sativum* L, SDS PAGE, electrophoresis.

نبذة مختصرة

تعتبر الفصيلة البقولية ثالث أكبر عائلة تضم أكثر من 727 جنساً و 20000 نوعاً. يحتوي جنس *Pisum* على 180 إلى 210 نوعاً. تعتبر أنواع البازيلاء ذات أهمية اقتصادية وزراعية كبيرة. تم إجراء دراسة SDS-PAGE لبروتينات تخزين البذور (البروتينات القابلة للذوبان وغير القابلة للذوبان) على ثلاثة عشر نوعاً من *Pisum sativum* L (تم جمعها من الجزائر ، لاكتشاف العلاقات التطورية بين هذه الأنواع . يعتبر الفصل الكهربائي للبروتين طريقة لتحليل خليط من البروتينات بواسطة الرحلان الكهربائي للهلام. يعتمد على قدرة البروتينات المشحونة على الهجرة عبر مسام الهلام عند تطبيق تيار كهربائي. الرحلان الكهربائي هو تقنية كيميائية لتحليل كتل الجزيئات. إذا تحكنا في المسامية الدقيقة للجيل ، فسوف تهاجر الجزيئات إلى القطب الكهربائي المقابل لشحنتها اعتماداً على حجمها. نحن مهتمون بتحليل البروتينات الحيوي للبروتينات الكلية ، باستخدام تقنية SDS-PAGE ، من ناحية ومن ناحية أخرى ، في تحليل التباين الجيني بفضل علامات *microsatellite* ، وهذا على ثلاثة عشر نوعاً من *Pisum sativum* L. بالإضافة إلى ذلك ، أظهر التصنيف الهرمي الذي يوضح العلاقات بين الأنواع الثلاثة عشر التي تنتمي إلى الأنواع (*Pisum sativum* L) ، أن النوع الأخير بعيد جداً بشكل عام باستثناء الأصناف sirmakelvedon ، Aroubia ، Sefrou ، Sara ، Dorian ، Combadoz ، Aroubia ، Guiferdo ، Guifilo لديها نسبة تشابه 95%

الكلمات الأساسية: *Pisum sativum* L ، SDS PAGE ، الرحلان الكهربائي.

SOMMAIRE

Introduction	01
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	02
I-présentation générale sur les légumineuses.....	03
.1.définition des légumineuses.....	03
.2.caractéristique des légumineuses.....	.03
.3.Fixation de L'azote.....	04
.4.utilisation des légumineuses.....	05
.4.1.Légumineuse et Alimentation Animal.....	05
.4.2.Légumineuse et Alimentation Humain.....	06
• .4.3. légumineuse et usage industriel...07	
.5.Légumineuse en Algérie.....	07
.6.le petit pois.....	07
.6.1.Origine et Historique.....	07
.6.2.Taxonomie du petit pois.....	08
.6.3.Caractères généraux du petit pois.....	11
.6.4.Diversité génétique	12
.6.5.Importance des variétés locale et nécessite de leur conservation ...	14
.6.6.Ressources phylogénétique	14
.6.7.Erosion génétique	15

7. Conservation des variétés du paye.....16

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....21

II-1 Matériel végétal.....22

II-2 Technique chimiques des protéines.....22

2-1-Analyse moléculaires des protéines22

2-.1-1-...extraction et électrophorèse des protéines.....22

2-1-2-Electrophorèse des protéines par SDS PAGE.....23

2-1-3-Préparation du tampon d'extraction des protéines.....24

2-1-4-extraction des protéines.....25

2-1-5-L'électrophorèse.....25

2-1-6-la coloration.....26

2-1-7-la décoloration.....26

2-1-8- la photographie.....26

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....27

III-1. Electrophorèse des protéines totales.....29

III-2 Analyse biochimique.....29

1-Paramètre Biochimique..... 29

1-1-Etude de l'électrophorèse gramme.....33

1-2-Analyse du polymorphisme.....34

2-Classification hiérarchique.....36

Conclusion général.....38

Annexe.....39

Références bibliographiques.....	42
---	-----------

LISTE DES FIGURES :

- Figure 1 : la stipule du pois09
- Figure 2 : différents type de feuilles de pois.....10
- Figures 3 : schéma général d'une plante de pois11
- Figures 4 : la fleures de pois 12
- Figures5 : comparaison de trois types de feuilles.....15
- Figures 6 :Gel électro-phorétique des protéines totales des grains des variétés de.....30
Pisum sativum L.
- Figure07 :Gel électro-protéique des protéines totales des variétés de *pisum sativum* L.
traitent avec un system d'imagerie biorad GEL **DOC XR (Gui2,Gui
1,Lat,Inc,Sef,Com)**.....**31**
- Figure 08 :Gel électro-phorétique des protéines totales des grains des variétés de.....32
Pisum sativum L.
- Figure09 :Gel électro-protéique des protéines totales des variétés de *pisum sativum* traitent
avec un system d'imagerie biorad GEL **DOC XR(Sef,Com,Aro,Sir,Sar,Kel,Ulr,Onw)**...**33**
- Figure 10 : SDS PAGE dendrogramme de 13 variétés de graines de *pisum sativum* L.basé sur
le model de bandes de protéines a l'aide de l'analyse en grappe UPGMA (SM).

Liste des tableaux

Tableau 1 : les différentes variétés du pois.....	22
Tableau02 : Valeurs de poids moléculaires et présence /absence de protéines de grains solubles totales dans les variétés de pois SDS PAG	32
Tableau 03: subdivision des groupes.....	36

Liste des abréviations :

FAO :organisationdes nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

MADR : ministère de l'agriculture et du développement rural.

UPGMA :Unweighted pair groupeméthode with arimetic mean

CRBT : centre de recherche de biotechnologie

SDS: Sodium DodécylSulfate

PAGE: PolyAcrylamide gel

UNESCO : Organisation des nations unies pour l'éducation, la science et la culture

Introduction

Le Pois (*Pisum Sativum*L.) est largement cultivé dans le monde et c'est La deuxième légumineuse la plus consommée après le Pois Chiche et incontestablement la culture de jardin la plus populaire.

Il s'agit d'une légumineuse de courte durée appartenant a la famille des légumineuses ou des fabacées (**Singh Et Al., 2007**). En tant que riche source de protéines, de Glucides et de Vitamines, les pois jouent un rôle important dans la nutrition humaine. Consommée principalement sous forme de pois verts, la production totale dans le monde est d'environ 8,3 millions de tonnes (FAO, 2008). la valeur économique du pois est principalement due a la composition chimique de ses graines.

les graines de pois, selon le cultivar et les environnements de culture, contiennent 18 a 35% de protéines, 20 a 50% d'amidon, 4 a 10% de sucres, 0,6 a 1,5% de matières grasses , 2-10% de cellulose, 2-4% de minéraux et 9-15% d'eau (**Sumner et Al. 1980**).

Les protéines de stockage des graines ont été utilisées comme marqueurs Génétiques dans quatre domaines principaux:

- L'analyse de la diversité génétique au sein et entre les accessions,
- La domestication des plantes en relation avec la conservation et la sélection des ressources génétiques,
- L'établissement de relations génomiques
- Comme outil d'amélioration des cultures (**Iqbal et al., 2005; Hameed et Al., 2009a; Hameed et Al., 2012b**).

La caractérisation du matériel génétique est importante pour l'évaluation des ressources génétiques et l'utilisation de génotypes précieux a des fins de conservation et de sélection (**Hamrick et Al., 1991; Crawford et Al., 2001**).

Les marqueurs biochimiques ont reçu plus d'attention au cours des années de la part des généticiens des cultures pour l'évaluation de la génétique. pour séparer et caractériser les protéines du pois, l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS) est l'une des techniques les plus utilisées (**Coata et Plomion, 2005**).

Le but de la présente étude est de déterminer les relations génétiques entre plusieurs variétés (locales et introduites) appartenant à l'espèce *Pisum sativum* L. a l'aide du profil protéique.

Le travail comporte 3 chapitres :

- Le premier chapitre porte sur une analyse bibliographique de l'espèce d'étude de *Pisum sativum* L.
- Le 2^{ème} chapitre est consacré à la méthodologie de travail adopté au laboratoire.
- Le dernier chapitre est consacré aux résultats et discussions.

On clôture ce travail par une conclusion dont laquelle on récapitule les connaissances acquises lors de ce travail suivis par des perspectives.

Chapitre I :

Références Bibliographiques

I-présentation générale sur les légumineuses

1. Définition des légumineuses

Les légumineuses (ce qui signifie légume dont le fruit est une gousse) comptent 714 genres et plus de 18 000 espèces (**Lewis et al., 2005**). Elles appartiennent à la famille des fabacées, dans laquelle on retrouve le haricot, le lupin, le pois, la lentille, l'arachide, la luzerne, le trèfle, le soja, la cacahuète, le mimosa ou l'acacia. Les légumineuses avec les graminées sont les deux familles botaniques les plus utiles à l'alimentation dans le monde (Klein et al., 2014), notamment grâce aux légumineuses. Ces dernières sont riches en protéines végétales (entre 20% et 40% sur les graines sèches), en glucides lents et en fibres, ainsi qu'en vitamines (B et C) et minéraux (fer, magnésium, potassium, calcium). Aujourd'hui, les cultures de légumineuses alimentent deux filières :

- La première pour l'alimentation animale représentée par les légumineuses fourragères (luzerne, pois, trèfle, soja, etc.)
- La deuxième pour l'alimentation humaine, ce sont les légumineuses à graines (haricots, lentilles, pois, pois chiches, fèves, etc.) (**Denhartigh et al., 2015**).

2. Caractéristiques des légumineuses

Les Légumineuses Sont Caractérisées Par :

- Au niveau de l'appareil végétatif. Les légumineuses ont représentées par des plantes à port très variable. Herbacées, annuelle ou vivaces.
- Les feuilles alternes, stipulées (les stipules sont parfois peu visibles sont primitivement composées). L'évolution foliaire conduit à des feuilles réduites : disparition de la foliole terminale.
- Des fleurs papilionacées (en forme de papillon) pour la plupart des espèces cultivées.
- Une gousse contenant des graines (la gousse étant le fruit issu de l'ovaire de la fleur).
- Et pour la majorité des membres de cette famille, la capacité d'utiliser l'azote atmosphérique (N₂) pour produire ses propres composants protéiques.

par cette troisième caractéristique, et contrairement aux autres espèces cultivées, la culture de légumineuses n'a en général pas besoin d'apport de fertilisants azotés pour exprimer une

Croissance Optimale, et elle représente une porte d'entrée d'azote symbiotique dans les systèmes de production agricole (Schneider et Huyghe, 2015).

3. Fixation de l'azote atmosphérique

Les légumineuses présentent l'énorme avantage par rapport aux autres plantes de pouvoir s'associer à des bactéries du sol du genre rhizobium. Cette association aboutit à la formation d'un petit organe particulier au niveau des racines, le nodule, au sein duquel les bactéries, grâce à leur activité nitrogénase, fixent l'azote atmosphérique et transfèrent celui-ci à la plante sous une forme combinée assimilable. En contrepartie, la plante fournit les éléments nutritifs assurant le développement de la bactérie (Giraud, 2007).

Les nodosités ne deviennent efficaces que lorsque l'azote du sol devient limitant (moins de 50 kg/ha). Dans le cas inverse, les légumineuses absorbent préférentiellement l'azote du sol car ce processus est moins coûteux en énergie pour la plante que la fixation de l'azote de l'air. L'apport d'azote (minéral ou par les engrais organiques) provoque une diminution du nombre de nodules et donc une baisse de l'activité symbiotique de fixation d'azote atmosphérique (Arvalis, 2010).

Le nombre de nodosités produit est proportionnel aux besoins en azote de la plante pour sa croissance. Pour valoriser au mieux leur rôle, les légumineuses sont donc à implanter lorsque l'azote est peu disponible.

L'azote de l'air fixé par les légumineuses est restitué à la culture suivante via la décomposition des résidus de culture (parties aériennes et souterraines).

Les résidus les plus facilement dégradables (feuilles, tiges peu ligneuses au rapport C/N faible), vont se décomposer et libérer de l'azote en quelques semaines, alors que les parties ligneuses (tiges, racines) vont minéraliser plus lentement (Agri-Bio, 2016).

Une étude réalisée par N'Dayegamiye et al. (2012) a évalué la contribution réelle des légumineuses en considérant les rendements du blé et du maïs dans les sous-parcelles non fertilisées en azote.

Les parcelles avec légumineuses ont permis des augmentations de rendement de 0.6 à 1 T/HA pour le blé et de 1.3 à 3.2 T/HA pour le maïs, en comparaison avec celles sans légumineuses. Ces résultats démontrent que les légumineuses ont contribué fortement à la nutrition azotée de la culture suivante :

Si la présence très importante d'azote dans le milieu réduit le fonctionnement de la symbiose, il en est de même pour d'autres facteurs parmi lesquels on peut citer la salinité du milieu, l'acidité, la pauvreté en phosphore, la sécheresse, les basses températures, la limitation en nutriments ou le manque d'oxygène (**Waligora et Tetu, 2008**).

4. Utilisation des légumineuses

Les légumineuses cultivées sont destinées à divers usages :

Légumineuses et alimentation animale

Les légumineuses fourragères sont caractérisées par leur richesse en protéines au niveau de leurs feuilles (fourrage consommé en vert ou séché) et dans leurs graines (consommées comme complément alimentaire) (**Pointereau, 2001**). Aussi, elles présentent une digestibilité élevée et une bonne teneur en calcium (supérieure à celles des graminées). Par rapport aux graminées, la valeur alimentaire des légumineuses comme le trèfle diminue moins rapidement avec l'âge des plantes, ce qui permet une souplesse d'exploitation et l'obtention d'un fourrage de qualité plus stable (**Decruyenaere et Al., 2016**).

Les protéines qui sont constituées par environ 3/4 de globulines et 1/4 d'albumines sont considérées comme de valeur alimentaire intéressante. Riches en lysine, mais hélas carencées en méthionine, cystéine et tryptophane. La complémentation par les céréales et l'apport de méthionine de synthèse sont souvent les sources de rééquilibrage du régime alimentaire, pour corriger ces carences (**Duc, 1996**).

Hormis la luzerne et le sainfoin qui peuvent se cultiver en pure, les autres légumineuses sont très souvent associées à une ou des graminées ainsi qu'à d'autres légumineuses.

La grande majorité des légumineuses sont bien adaptées à une exploitation en fauche (**Knoden, 2016**).

A titre d'exemple, les fourrages à base de graminées-légumineuses (mélange graminées-légumineuses ou prairies naturelles qui contiennent généralement 20% de légumineuses), exploités au stade optimum, permettent, dans l'élevage laitier, d'assurer (tant au niveau des protéines que des calories) ce qu'il faut à une vache pour produire 20 litres de lait par jour.

On notera, au passage, que les fourrages pâturés sont beaucoup plus riches que les fourrages stockés sous forme de foin ou d'ensilage, traduisant une perte à la récolte. La durée de pâturage est donc un bon critère de gestion des ressources fourragères (**Pointereau, 2001**).

Légumineuses et alimentation humaine

Les légumineuses sont mentionnées dans la plupart des recommandations nutritionnelles pour leurs apports en fibres, protéines (complémentaires de ceux des Céréales), glucides à faible indice glycémique et micronutriments (minéraux et vitamines)(**Champ Et Al., 2015**).

Les légumineuses contiennent une teneur importante en protéines. Elles en constituent pour la plupart des populations des pays en développement la principale source.

Les légumineuses sont un excellent complément alimentaire pour les nourrissons et les jeunes enfants, et les aident à atteindre leurs besoins énergétiques quotidiens. Leur teneur élevée en nutriments en fait également un aliment idéal pour les végétariens et les végétaliens, garantissant un apport suffisant en protéines, en minéraux et en vitamines.

Citons Quelques Avantages Des Légumineuses (**FAO, 2016**) :

- Dotées d'un faible indice glycémique, à faible teneur en graisse et à haute teneur en fibres, les légumineuses sont adaptées aux personnes atteintes de diabète. Leur teneur élevée en fibres augmente la satiété et aide à stabiliser la glycémie et le taux d'insuline, ce qui réduit les pointes après les repas et améliore la résistance à l'insuline. Cela fait des légumineuses un aliment idéal pour la gestion du poids.
- Les légumineuses peuvent contribuer à réduire les risques de maladies coronariennes. Elles sont riches en fibres solubles, connues pour leurs effets positifs sur le taux de LDL-cholestérol, un facteur de risque reconnu de la maladie coronarienne.
- Les légumineuses sont de bonnes sources de vitamines, telle que la Folacine, qui aide à réduire le risque d'anomalies du tube neural (ATN), Comme Le SPINA-BIFIDA Chez Les Nouveau-nés.
- Leur haute teneur en fer fait des légumineuses un aliment excellent pour prévenir l'anémie ferriprive chez les femmes et les enfants, notamment si elles sont accompagnées d'aliments riches en vitamine C qui améliore l'absorption du Fer.
- Elles sont sans gluten, ce qui en fait un aliment bénéfique pour les personnes allergiques au gluten ou souffrant de la maladie Cœliaque.
- Les légumineuses sont riches en composés bioactifs tels que les composés Phytochimiques et les Antioxydants qui pourraient contenir des propriétés Anti-Cancer.

Légumineuses à usages industriel

Les légumineuses des genres *Indigofera* et *Acacia* sont respectivement cultivées pour la production de teinture et de gomme arabique.

Le bois de certaines espèces du genre *Acacia* et l'espèce *castanospermum australe* est utilisé comme bois d'œuvre pour la production de meubles et de charpentes.

5. Légumineuses en Algérie

En Algérie, les légumineuses font partie des aliments de base. consommées en grandes quantités ils ont cultivées sur les zones littorales jusqu'aux plateaux, on y trouve de nombreuses espèces comme le pois chiche, le haricot, la fève, le pois et la lentille (**Lazali, 2014 In Ouslim 2016**).

Actuellement, le nouveau programme de la MADR ambitionne d'éviter l'importation annuelle de 2 millions de quintaux de légumes secs.

Le secteur agricole devra alors porter les superficies consacrées aux légumineuses à 218 000 Ha, contre 85 000 ha produite actuellement. Sur cette superficie, celle réservée aux lentilles et aux pois chiches devra passer de 30 000 ha à 170 000 ha dans le cadre de ce nouveau Programme (**Belaid, 2018**).

6. Le petit pois

Origine et Historique :

Théophraste, trois siècles avant notre ère, dans son livre intitulé "recherches sur les plantes" a décrit plusieurs espèces de la famille actuelle des légumineuses et notamment " Le Pois (**Davies Et Al., 1985**).

il est consommé depuis environ 5000 ans avant JC, et était déjà très apprécié dans les civilisations anciennes (**Smart, 1990**). Les origines primaires du pois se situent vraisemblablement dans le sud-ouest d'Asie (**Zohary et Hopf, 2002**) ; Abyssinie en Afghanistan Et Les Régions Avoisinantes, la région méditerranéenne constitue un centre secondaire. à partir de ces centres, le pois se serait dispersé dans le reste de l'Europe et de l'Asie (**Kay, 1979 ; Makasheva, 1985 ; Cousin ,1997**).

basé sur la diversité génétique, quatre centres d'origines ; l'Asie Centrale, Le Proche Orient, l'Abyssinie et la Méditerranée ont été Identifiés (**Gritton, 1980**).

De nombreux botanistes ont décrit différentes formes sauvages qui ne diffèrent que par quelques caractères morphologiques. Parfois, ces types ont constitué des espèces Différentes, dont la dénomination rappelle fréquemment le lieu d'origine. Mais le plus souvent, ils sont considérés comme appartenant à des sous espèces de *Pisum Sativum* : *Pisum Sativum Arvense* (Linné), *Elatius* (BiebStev), *Abyssinium* (Braum), *Jomaradi* (Schrank),

Aethiopium, Asiatium, HumileTranscaucasiumentUnbellatum. ces groupes peuvent être croisés entre eux, en conséquence ils représentent la même espèce. par contre, les croisements avec les Genres voisins : *Lathyrus, ViciaEtLentis* N'ont Jamais Pu Etre Obtenus (Coussin, 1997).

2.2 Taxonomie du Pois :

Le Pois cultivé appartient au genre *pisum*, de la famille des légumineuses (Papilionacées), tribu des viciées, au même titre que les genres : *Lathyrus, Lens, Et Vicia*. La Particularité morphologique du genre *Pisum*, qui va nous permettre de le distinguer des autres genres de la même tribu (*Lathyrus, Vicia, Lens*) c'est la taille des stipules. Ces dernières sont au moins aussi grandes que les folioles(Fig. 1).



Fig. 1 : La Stipule Du Pois (Mori, 2018).

les trois sous-espèces de *Pisum Sativum* qui ont été décrites en Algérie sont (QuezelEt Santa, 1962) :

- ***PisumSativumElatius* (Pois Sauvage)** :C'est la forme la plus ancienne de pois, caractérisé par une longue tige (> 1.5m) (ZlatkovicEtMikic, 2010). elle a été considérée pendant longtemps comme une espèce a part entière, mais a été finalement acceptée comme une sous-espèce dePisumSativum.la forme sauvage du pois a été prospectée en Algérie par Vavilov(1949) (Maxted et Ambrose, 2001).
- ***PisumSativumArvensePoir*(Pois Des Champs, Ou Pois Fourrager)** : Chez ce type de pois, les tiges présentent de nombreuses ramifications. les fleurs sonten général colorées en violet rose, et les gousses sont petites. le pois fourrager produit une quantité élevée en matière verte a l'hectare, il est cultivé seul ou en association avec

une céréale pour une production importante de fourrage vert destiné à l'alimentation animale après en silage(Cousin, 1996).

- ***Pisum Sativum Hortense* Asch et Graebn(Pois Des Jardins, Pois Potager Ou Petit Pois)** : le pois potager présente des feuilles plus larges que le pois fourrager, ses gousses sont relativement longues et les grains assez gros. le pois mangetout est voisin du pois potager mais présente des gousses sans parchemin (caractère déterminé par deux gènes récessifs) et qu'on peut consommer en intégralité.
- les gousses sont cueillies lorsqu'elles ont atteint une dimension maximale et que le grain commence à grossir (Cousin, 1996).

parmi les milliers de variétés de pois existant, certaines ont été spécialement sélectionnées pour une utilisation en alimentation animale sur des critères de rendements, de culture et de teneur élevée des graines en protéines, on parle alors de pois protéagineux (Perrot, 1995).

la fleur chez ce type de pois est blanche et la graine est riche en amidon et en Protéines (Carouée et al., 2003).

La sélection du pois protéagineux est récente puisque les premières variétés sont apparues dans les années 1976 (avec les variétés amino et finale, issues de pois de casserie) après l'embargo américain sur le soja en 1973 à l'encontre de la communauté européenne et qui a fait prendre conscience à cette dernière combien elle était dépendante vis-à-vis de l'extérieur, pour ses protéines végétales utilisées en alimentation animale et combien il était nécessaire de développer en Europe, la culture de plantes riches en protéines destinées à l'alimentation du bétail. Le pois protéagineux s'est développé à partir de 1980 sous l'effet d'un effort de recherche au niveau européen. La France est devenue le premier producteur européen (environ 70% de la production européenne). Dans certains pays le pois est destiné à la consommation humaine (Cadot Et Le Clerc, 2010). il existe des variétés de pois protéagineux qui possèdent des vrilles à la place des folioles, elles sont connues sous le nom de pois Afila(Fig. 2). Cette absence de folioles est une caractéristique liée à un gène Récessif « AF » résultant d'une mutation (PesicEt Al., 2013). cette dernière est apparue en 1986 chez la variété solara, elle a permis l'essor du pois protéagineux, facilitant la résistance à la Verse, aux maladies et permettant des gains de rendement de l'ordre de 20% (Cadot Et Le Clerc, 2010).



Fig. 2 : Différents Types De Feuilles De Pois (Srarfi Ben Ayad, 2017)
(A) Feuille Avec Folioles (Normale), (B) : Feuille Sans Folioles (Afila).

2.3 Caractères généraux du pois :

L'appareil aérien est constitué d'une tige principale et des ramifications issues des bourgeons latéraux (**Fig. 3**). Les premiers nœuds sont exclusivement végétatifs, puis les suivants deviennent reproducteurs, chaque étage portant en position axillaire un nombre de fleurs variable, mais dont le nombre maximal est une caractéristique variétale. Les gousses issues des fleurs après fécondation des ovules portent un nombre variable de graines dont le nombre maximum est également une caractéristique variétale (**inapg, 2003**). La tige est creuse, grêle, de longueur très variable (variétés naines, a demi-rames, a rames). Les feuilles sont glauques, cireuses, composées de 2 a 8 folioles, terminées par une vrille simple ou plus ou moins ramifiée.

Dans la partie souterraine du pois, peuvent se développer des nodosités, lieu de la symbiose entre la plante et des bactéries du sol qui permet la fixation de l'azote atmosphérique (**Tognite, 2013**).

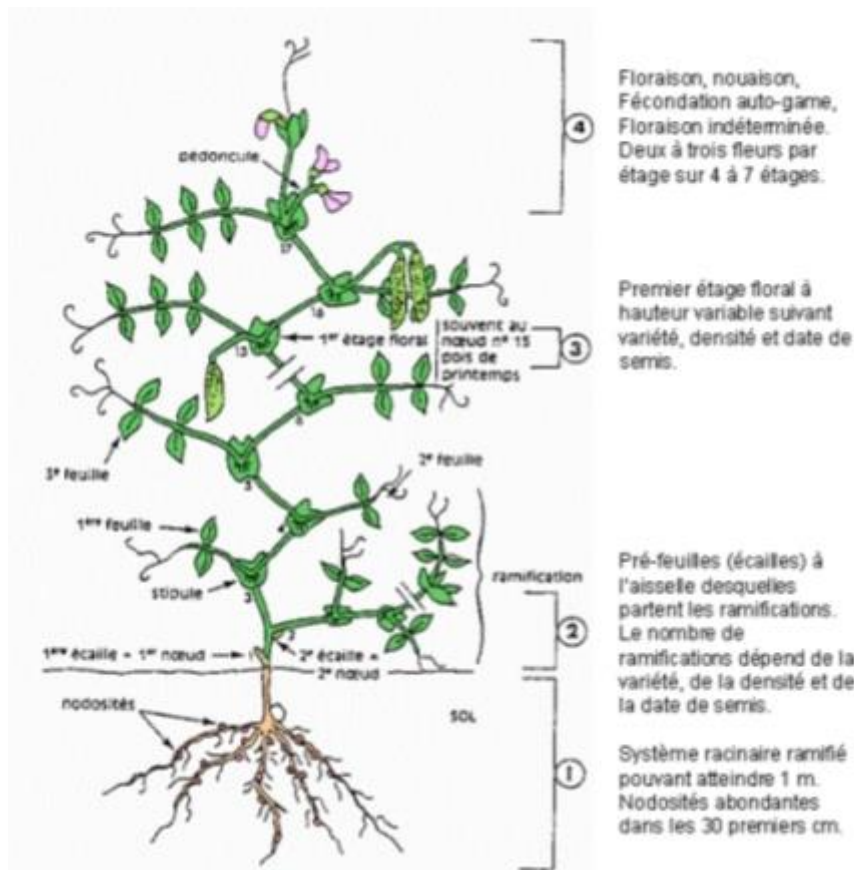


Fig. 3 : Schéma Général D'une Plante De Pois (Boyeldieu, 1991).

La fleur de pois est typique des papilionacées. la corolle comprend cinq pétales : l'étendard, deux ailes et la carène formée de deux pièces soudées qui grandes ou plus entourent les étamines et le style (**Fig. 4**). Le pois est une espèce autogame, multipliée par semence. L'autopollinisation a lieu avant l'ouverture de la fleur et seuls quelques hyménoptères peuvent visiter les fleurs et transporter le pollen. Ces visites peuvent conduire a quelques hybridations accidentelles entre variétés de pois. mais, sans intervention du sélectionneur, le brassage génétique reste faible (**Cousin, 1996**).

les fleurs sont solitaires ou groupées par 2 a 8 sur un long pédoncule (**Moule, 1972**).

Le nombre chromosomique de *Pisum Sativum* L. est De $2n=14$ (**Murtaza et Al., 2005**).

Les feuilles sont paripennées a 1-3 paires de folioles ovales oblongues plus ou moins dentées, et terminées par une vrille. Les stipules sont plus ou moins orbiculaires aussi grandes que les folioles, dentées amplexicaules a la base (**Quezel et Santa, 1962**).

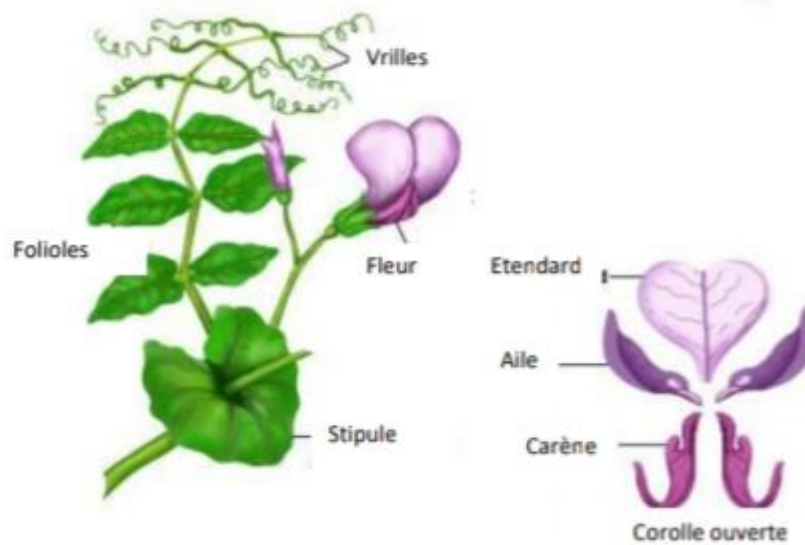


Fig. 4 : La Fleur De Pois (Koirala, 2018).

2.4 DIVERSITE GENETIQUE CHEZ LE POIS :

il existe chez le pois, une grande diversité génétique au travers des types sauvages et des nombreuses variétés anciennes (Doré Et Varoquaux, 2006).

de nombreuses collections de ressources génétiques de pois sont détenues dans le monde entier. la collection mondiale de cultivars et de mutants de *Pisum Sativum* se trouve au Nordic Gene Bank d'Alnarp En Suède (Environ 2 700 Entrées).

Dans cette collection, on a mis l'accent sur des lignées multi-résistantes aux maladies, sur des types sauvages et primitifs, des lignées porteuses de mutations structurelles, du matériel de sélection et des cultivars présentant un intérêt particulier. d'importantes collections de *Pisum sativum* L. sont détenues en Australie (Australian Temperate Field Crops Collections a Horsham Victoria, 6 300 entrées), aux Etats Unis (Western Regional Plant Introduction Station, a Pullman, 3 500 entrées et al'Horticultural Sciences Department, Au NY State Agricultural Experiment Station, Geneva, 2500 entrées), En Chine (Institute Of Crop Germplasm Resources-CAAS- A Pékin, 3 400 entrées) Et Au Royaume-Uni (John Innes Centre, Department Of Applied Genetics De Norwich, 2 700 Entrées).

La plus vaste collection de ressources génétiques de *Pisum sativum* L. en Afrique est située al'Institute Of Biodiversity Conservation, A Addis Abéba (Ethiopie), Avec Plus De 1 600 Entrées. Par Ailleurs, L'icarda (International Center For Agricultural Research In The Dry

Areas) En Syrie détenait une importante collection avec plus de 6 100 Accessions (**SmykalEt Al., 2008**). Compte tenu de la situation en Syrie, les collections ont été déplacées vers le Maroc et la Tunisie. D'autres banques de gènes existent dans divers régions du monde.

La variabilité génétique chez le pois se traduit par un important polymorphisme. en effet, les différents cultivars montrent de grandes variations de forme, de taille et de couleur, des divers organes du plant. Aussi, la longueur et la ramification de la tige, le nombre de grains par gousse, la qualité gustative de la graine, la précocité a la floraison, etc., montrent d'importantes disparités d'un cultivar a un autre. Ainsi, selon la taille du plant on peut distinguer des variétés naines (entre 60 et 90cm) et des Variétés Elevés Pouvant Atteindre 80 a 2.50 Cm (**Trébuchet Et al., 1953**).

La fleur offre une large gamme de couleurs (Rose, Mauve, Bleu, Pourpre ou Blanche) avec plusieurs degrés d'intensité (**Muehlbauer et Tullu, 1997 In Gari, 2015 ; Srarfi Ben Ayed, 2017**). Le grain présente également une grande diversité génétique pour sa couleur, sa forme, sa grosseur et sa composition en substances de réserve.

Plusieurs mutations existent chez le pois, elles modifient profondément l'allure du feuillage.

Le gène « AF » transforme les folioles en vrilles chez le pois Afile, ce qui assure une meilleure pénétration de la lumière au travers du feuillage.

le gène « ST » réduit les stipules en petites bractées. La combinaison des deux gènes « AF » et « ST » donne des pois sans feuille ou « leafless» (**Fig. 5**).

Le Gène « Il » (Tendriless) transforme les vrilles en folioles supplémentaires.

Le Gène « Rogue » réduit la largeur des folioles et des stipules, qui se dressent Comme des oreilles de lièvre (**Cousin, 1996**).

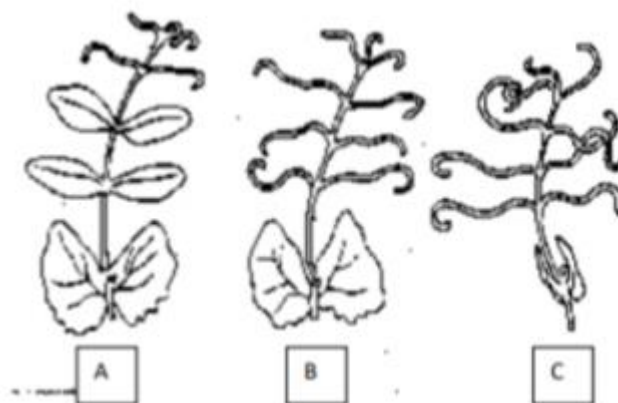


Fig. 5 : Comparaison De Trois Types De Feuilles (Cousin, 1996) :
(A) Feuille Normale, (B) Feuille Sans Foliole (Afile), (C) Pois Sans Feuilles Ou Leafless.

Importance des variétés locales (landraces) et nécessité de leur conservation :

Ressources phylogénétiques :

Base pour la sélection des variétés locales « landraces » les agriculteurs ont pratiqué la sélection de variétés adaptées à une grande diversité d'environnements depuis l'aube de l'agriculture, voici plus de 10 000 ans (**Plucknett Et Al., 1990**). cette sélection s'est faite à partir d'une variabilité génétique déjà existante, constituant un "réservoir de gènes" au sein duquel l'espèce peut s'approvisionner pour s'adapter à des conditions écologiques nouvelles.

cette diversité est générée par des mécanismes évolutifs extrêmement efficaces (**Kremer, 2000**). la sélection humaine a abouti à l'obtention de variétés souvent qualifiées de « locales », « traditionnelles » ou « de pays » (land races) (**Marchenay Et Lagarde, 1987**). Fruit des efforts de tous les paysans qui les conservaient, les variétés locales ont un intérêt particulier du fait qu'elles sont adaptées aux conditions du milieu. en effet, elles représentent une précieuse source de résistance aux ravageurs, aux maladies et aux contraintes abiotiques (**Jilal, 2011 in Rahal-Bouziane, 2016**), et elles s'adaptent bien aux conditions pauvres en intrants comme les engrais et les pesticides (**FAO, 2007**). En outre, les études ont clairement démontré l'importance de ces variétés dans la lutte contre la sécheresse et l'assurance de la sécurité alimentaire des populations (**FAO, 2004**). il est également nécessaire de rappeler que la diversité génétique des cultures apporte de la stabilité aux systèmes de productions agricoles à une échelle locale, nationale et globale. Ainsi, les pertes dues à un problème d'une espèce ou d'une variété particulière sont compensées par les rendements des autres ce qui permet d'atténuer la variabilité des rendements. Les risques liés à une trop grande uniformisation des espèces et des variétés cultivées (vulnérabilité génétique) peuvent avoir des conséquences très graves (**FAO, 2007**).

La sélection traditionnelle effectuée par des paysans a été progressivement remplacée par une sélection scientifique. à cet effet, des variétés récentes de pois ont été mises au point avec un bon niveau de résistance au froid et présentant une originalité quant à certaines caractéristiques (la couleur par exemple) selon leur débouché et la préférence du consommateur (**Tognite, 2013**). D'autres critères de sélection ont intéressé les chercheurs à savoir : la précocité, le rendement et les exigences des conserveurs. en ce qui concerne le pois protéagineux, les principaux objectifs de sélection sont :

le rendement élevé en grain sec, la teneur élevée en protéines,

La qualité et l'absence de facteurs antinutritionnels (**Cadot et Leclerc, 2010**).

La sélection scientifique est exercée par des spécialistes regroupées dans un petit nombre d'entreprises ouvertes sur le marché mondial et donc soumises aux contraintes de l'économie internationale agricole. Cette économie est basée sur un petit nombre de variétés homogènes qui se substituent aux précédentes ; les agriculteurs dont chacun possédait des semences différentes ne font plus leurs sélections, la diversité sur le terrain diminue, on assiste alors à une érosion génétique (**MarchenayEtLagarde, 1987**).

2.5.2 Erosion Génétique :

C'est un terme inventé par les scientifiques pour désigner la perte de gènes individuels et de combinaisons de gènes tels que ceux que l'on retrouve dans les variétés adaptées aux conditions locales. D'après le rapport sur l'état des ressources phylogénétiques dans le monde de la **FAO (2006)**, le remplacement des variétés locales par des variétés modernes est la principale cause d'érosion génétique. En effet, ce phénomène intervient souvent lorsque l'on remplace d'anciennes variétés par de nouvelles, les gènes des premières n'étant pas tous présents dans les deuxièmes. L'introduction de variétés commerciales dans les systèmes d'agriculture traditionnelle réduit souvent le nombre de variétés. Parmi les autres causes de l'érosion génétique figurent l'apparition de nouveaux ravageurs, de plantes adventices et de maladies ou encore la dégradation environnementale, l'urbanisation ainsi que le défrichage par la déforestation et les feux de brousse (**FAO, 2006**). L'érosion génétique ne concerne pas seulement les espèces cultivées mais aussi, les espèces sauvages apparentées, une série d'exemples peuvent être cités à cet effet :

trois variétés locales de pois (Kyambia, RwantooroEtNyakasaza) sur cinq ont été abandonnées par les agriculteurs dans la région de Kabale en Ouganda (**MbabwineEt Al., 2004**). deux variétés (Amaharare et Misere) sont en voie d'extinction selon les mêmes auteurs. le pois sauvage apparenté au pois cultivé (*Pisum sativum Elatius*) appelé « Pois De Fully » par les autochtones, est sur la liste rouge des plantes menacées de disparition par la commission suisse pour la conservation des plantes sauvages (**CPS, 2009**).

Le Ministère de L'agriculture des États-Unis estime que 94 % des variétés de pois n'existent plus (**FAO, 2007**).

Par conséquent, les scientifiques ont pris conscience qu'il était important de dresser l'inventaire d'un réservoir génétique qui s'appauvrit et d'en conserver les ressources afin d'offrir des possibilités de choix aux générations futures et de contribuer à l'objectif du développement durable. il se pourrait en effet qu'on ait besoin à l'avenir de gènes d'apparentés sauvages ou de variétés anciennes de nos plantes cultivées ou de nos animaux domestiques

pour obtenir certaines caractéristiques qui s'avéreraient nécessaires dans des circonstances nouvelles imprévues (UNESCO, 1990).

2.5.3 Conservation des Variétés du Pays :

Les variétés dites locales représentent à la fois un patrimoine végétal et un ensemble de ressources phylogénétiques. Il devient urgent de les recenser, de les sauvegarder et de collecter un maximum d'informations à leurs propos. Leur évaluation, en aval de ces travaux, devrait permettre de mieux en connaître les caractères et les potentialités (Lagarde et Marchenay, 1985).

Les étapes de la sauvegarde des variétés locales sont :

- **La prospection de terrain** pour but de déceler et de localiser le matériel végétal existant encore. les stratégies à adopter seront différentes en fonction des espèces, des lieux, des hommes, des saisons. cette étape permet de déterminer les régions qui abritent un maximum d'espèces intéressantes et le moment favorable pour la plupart d'entre elles d'être à maturité. on doit visiter non pas une seule, mais plusieurs localités, le plus souvent distantes (**Meddour et Derridj, 2007**) ;
- **Les recherches documentaires et les analyses bibliographiques**, même si elles ne donnent pas toujours les résultats escomptés, constituent souvent un appui à ne pas négliger. elles sont les compléments indispensables des enquêtes de terrain ;
- **La Collecte** constitue une phase aussi capitale que délicate. du point de vue pratique, au sein de chaque population, les graines doivent être prises sur autant d'individus différents qu'il est possible, afin de saisir un maximum de la diversité génétique intra-population. depuis les années 60 de nombreuses missions de prospection et de collecte ont été organisées par des organismes internationaux (FAO, ICRISAT, ORSTOM Actuel IRD, Etc.) en collaboration avec les instituts nationaux de recherches agricoles ;
- **La Conservation Proprement Dite** varie, dans sa mise en œuvre, avec les espèces et bien sûr, les possibilités techniques et financières offertes localement. la sauvegarde de la diversité génétique peut être réalisée par la conservation *in situ* (plus communément appelée « préservation de la biodiversité ») ou par la conservation *ex situ* (Banques de Gènes, jardins botaniques...). la conservation *in situ* est opérée par les agriculteurs au Sein De Leurs agro

écosystèmes pour les espèces cultivées, ou dans les zones protégées pour les espèces sauvages apparentées (Joly et Trommetter, 1994 ; FAO, 2006).

- La conservation *in situ* de la biodiversité est celle que réalisent chaque jour les paysans. ils sélectionnent chaque année les meilleures plantes de leurs parcelles pour produire les semences de l'année suivante. pour cela, ils travaillent à partir des variétés héritées de leurs parents, des variétés traditionnelles de la zone, ou venant de zones voisines. pour de nombreuses raisons, ces champs paysans constituent une « mine d'or » pour la diversité génétique. ainsi, la variabilité du germoplasme n'est pas fixée, comme dans le cas des variétés certifiées, ce qui permet une évolution constante et une adaptation permanente aux conditions du milieu. la sélection naturelle qui s'opère ainsi facilite l'adéquation des variétés au milieu dans lequel elles sont cultivées, du fait de ce large potentiel génétique à la base. cette diversité génétique est donc un facteur de stabilité de la production paysanne.

Il apparaît que chaque mode de conservation, pris indépendamment, a ses limites. la disparition des variétés est importante dans un modèle de conservation *in situ* car il y a, à l'échelle de l'exploitation agricole, un renouvellement permanent des variétés cultivées et certaines espèces peuvent même en supplanter d'autres (exemple du remplacement du sorgho par le maïs dans le sud du mali). Les échanges de variétés traditionnelles entre paysans, ou l'introduction de variétés améliorées, conduisent nécessairement à des changements. à l'opposé, la conservation en banques de semences (*ex situ*) permet de conserver ce qui a pu être collecté pour éviter sa perte définitive lors de sa disparition au champ. les accessions de la banque de semences, qui représentent la diversité des variétés existantes répertoriées, sont donc moins vulnérables aux catastrophes naturelles, économiques ou climatiques. par ailleurs, les variétés stockées dans la banque de semences sont figées ; on parle alors de conservation « statique » car il se peut que lors de sa mise en culture dans 25 ou 50 ans, elles ne soient plus adaptées aux conditions de l'environnement. l'entité « variété » n'est donc pas forcément l'objet à maintenir *ex situ* mais plutôt le germoplasme et les gènes d'intérêt (Ressources Génétiques) qu'elle représente (BazileEtCoulibali, 2011). Les deux stratégies de conservation (*In Situ Et Ex Situ*) sont donc complémentaires.

- **L'évaluation** est l'enregistrement des caractéristiques dont l'expression est souvent influencée par des facteurs environnementaux. elle implique la collecte méthodique des données portant sur les traits agronomiques, quantitatifs et qualitatifs, au moyen d'essais expérimentaux conçus de manière appropriée. ces ensembles de données sont très Recherchés

par les utilisateurs pour incorporer des traits dans les programmes de sélection et améliorer, l'utilisation des collections de ces plantes, porteuses de gènes a priori dignes d'attention, devrait permettre, en aval de ces travaux, de mieux en connaître les caractères et les potentialités. a partir de là, leur éventuelle valorisation peut être indirecte (Introduction De Certains Gènes Dans Un Programme De Sélection), ou directe (Relance D'une Production Locale) (FAO, 2014).

Le SDS-PAGE est la méthode la plus couramment utilisée pour étudier les différences de protéines entre les espèces. Cependant, auparavant, les variétés étaient décrites sur la base de leurs caractères morphologiques. Mais maintenant, le SDS d'un jour est un détergent anionique qui se lie fortement et dénature les protéines. Par conséquent, le nombre de molécules SDS liées à une chaîne polypeptidique est approximativement la moitié du nombre de résidus d'acides aminés dans cette chaîne. Ensuite, le complexe protéique SDS porte des charges négatives nettes. Et déplacez-vous vers l'anode et la séparation finale est basée sur la taille de la protéine. Par conséquent, la modification de PAGE appelée SDS-PAGE, une protéine oligomère peut être dissociée en ses sous-unités et le poids moléculaire des sous-unités est déterminé.

Electrophorèse SDS-Page:

Le SDS possède une longue queue hydrophobe qui se termine par un groupement sulfate de charge négative. La longue queue hydrophobe interagit avec les chaînes protéiques. Le nombre de molécules de SDS liées à la protéine est proportionnel à la longueur de la protéine. Les charges négatives apportées par le SDS favorise la migration du complexe [Protéine – SDS] vers l'électrode +. Collectivement l'ensemble chargé négativement est très largement supérieur à la charge propre de la protéine donc toutes les protéines vont être chargées – fortement. Le SDS est aussi un détergent; il détruit donc les structures quaternaires et tertiaires des protéines. Cette électrophorèse est généralement effectuée en présence d'un agent réducteur: le bêta-mercaptoéthanol (β ME). La mobilité des protéines est inversement proportionnel à sa masse moléculaire donc on peut également faire une droite d'étalonnage qui relie distance de migration au poids moléculaires.

Chapitre II

Matériel et méthodes

II-1 Matériel Végétal

Le matériel d'étude est constitué de Treize Variétés de Pois (*Pisum sativum. L*). Les semences utilisées dans cette étude ont des origines différentes et ont été collectées dans différentes régions d'Algérie (tableau 1).

Tableau 1: les différentes variétés du pois.

Variétés	Origine	Source
Onward	France	Constantine
Utrillo	France	Constantine
Kelvedon	New Zealand	Constantine
Sirma	Turkey	Jijel
Dorian	U.States	El Oued
Inconnue	U.States	Jijel
Sara	France	Mostaganem
Séfrou	Algeria	Constantine
Aroubia	Algeria	Jijel
Combadoz	Spain	Constantine
Latcha	Algeria	Chlef
Guifilo	Italy	Constantine
Guifredo	Italy	Constantine

II-2- Technique chimique des protéines :

2-1- Analyse Moléculaire des protéines

2-1-1 Extraction et électrophorèse des protéines totales

L'application de l'électrophorèse selon Laemmli, (1970) peut déterminer la diversité des génotypes par l'obtention des électrophorégrammes qui caractérisent ses protéines. L'une des variantes la plus répandue de l'électrophorèses, est l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence du sodium ; dodécyl sulfate (SDS-PAGE) décrite par Ulrich Laemmli en 1970, et qui est utilisée pour séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire (**Dicko, 2006**). La technique d'électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE a été réalisée au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.B.t-Constantine).

2-1-2 Électrophorèse des protéines par SDS-PAGE :

L'électrophorèse est une technique qui permet la séparation et éventuellement l'identification des constituants d'un mélange de protéines en utilisant la différence entre leurs vitesses de migration sous l'influence d'un champ électrique. Celle-ci est, sous certaines conditions, uniquement fonction de leur masse moléculaire. La cartographie des masses moléculaires des protéines peut donc être établie en utilisant une électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de dodécylsulphate de sodium (SDS-PAGE). Photo. 06



Photo. 01 : technique de séparation des protéines fonctionnant par un gel de polyacramide.

Préparation du tampon d'extraction de protéine :

Pour l'extraction des protéines, treize graines ont été réduites en poudre fine avec un mortier et un pilon. Pour l'extraction totale des protéines de graines à partir d'échantillons de graines individuels, 0,1 g de chaque variété a été prélevé, puis 1 ml de tampon Tris-urée (contenant 0,05 M de Tris-HCl (pH 8,0), 0,4 % de SDS, 5 M d'urée, 2,5 % de glycérol, 1,5 Du 2-mercaptoéthanol, 1 mM d'EDTA et 0,01 % (p/v) de bleu de bromophénol) ont été ajoutés. photo. 07



Photo.02 :préparation de tampon d'extraction

Extraction des protéines :

L'échantillon a été vortexé pendant 5 minutes suivi d'une incubation de 3 heures à température ambiante. L'homogénat brut a été centrifugé à température ambiante à 15 000 tr/min pendant 10 min. Les échantillons de protéines extraits ont été collectés sous forme de surnageant et les culots ont été jetés puis stockés à -20°.

L'électrophorèse :

L'électrophorèse a été réalisée dans le système d'électrophorèse discontinue sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (Lammler, 1970) en utilisant un gel de séparation à 15 % (p/v) et un gel d'empilement à 4,5 % (p/v). L'électrophorèse a été réalisée à 80 V pendant 5 h, où les molécules sont séparées uniquement en fonction de leur masse molaire (Lafont, 2005).photo.03

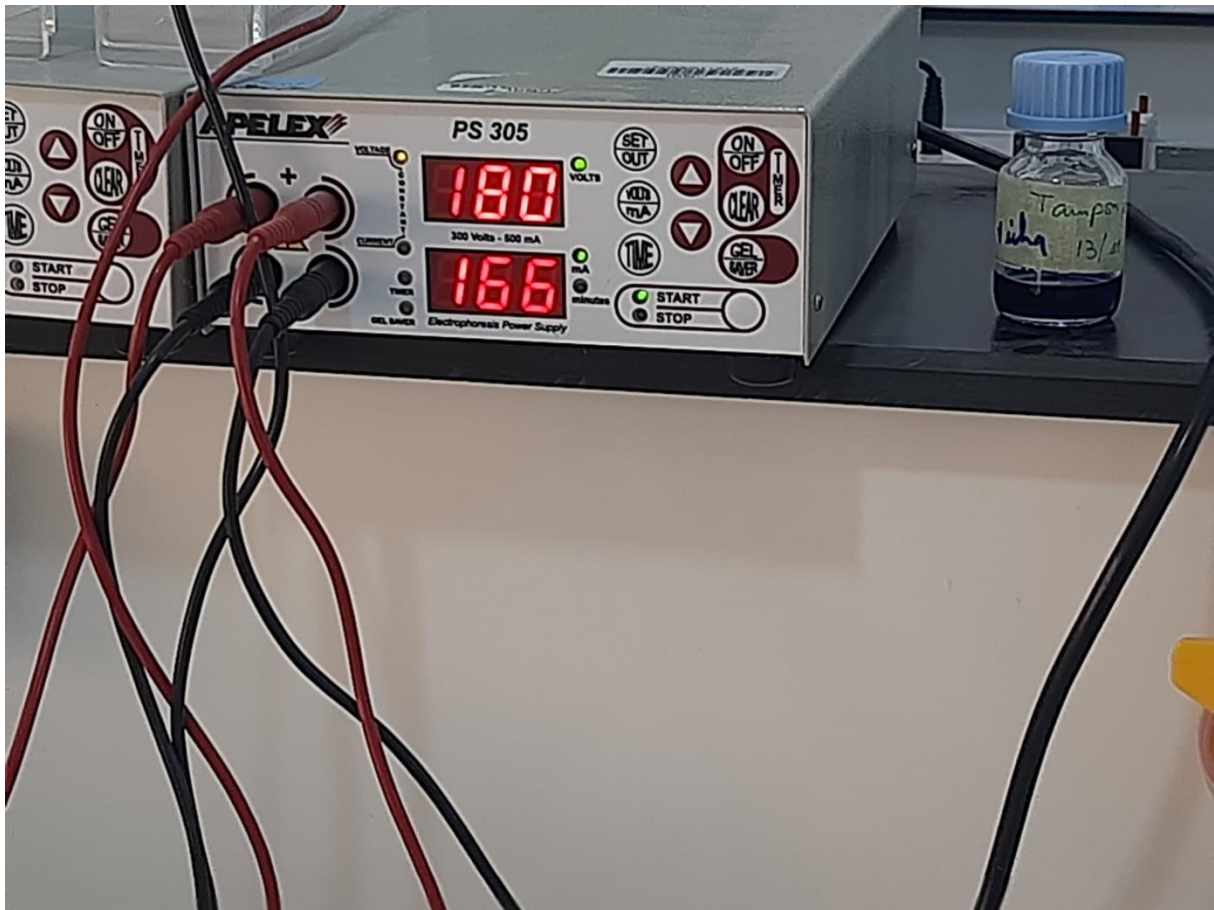


Photo.03 : électrophorèse sur gel

La coloration :

Les gels ont ensuite été fixés en solution (10 % d'acide acétique et 40 % d'éthanol) pendant 15 min sous agitation constante puis colorés avec 0,2 % (p/v) de bleu brillant Commassie R250 pendant une nuit sur un agitateur électrique. Photo. 04

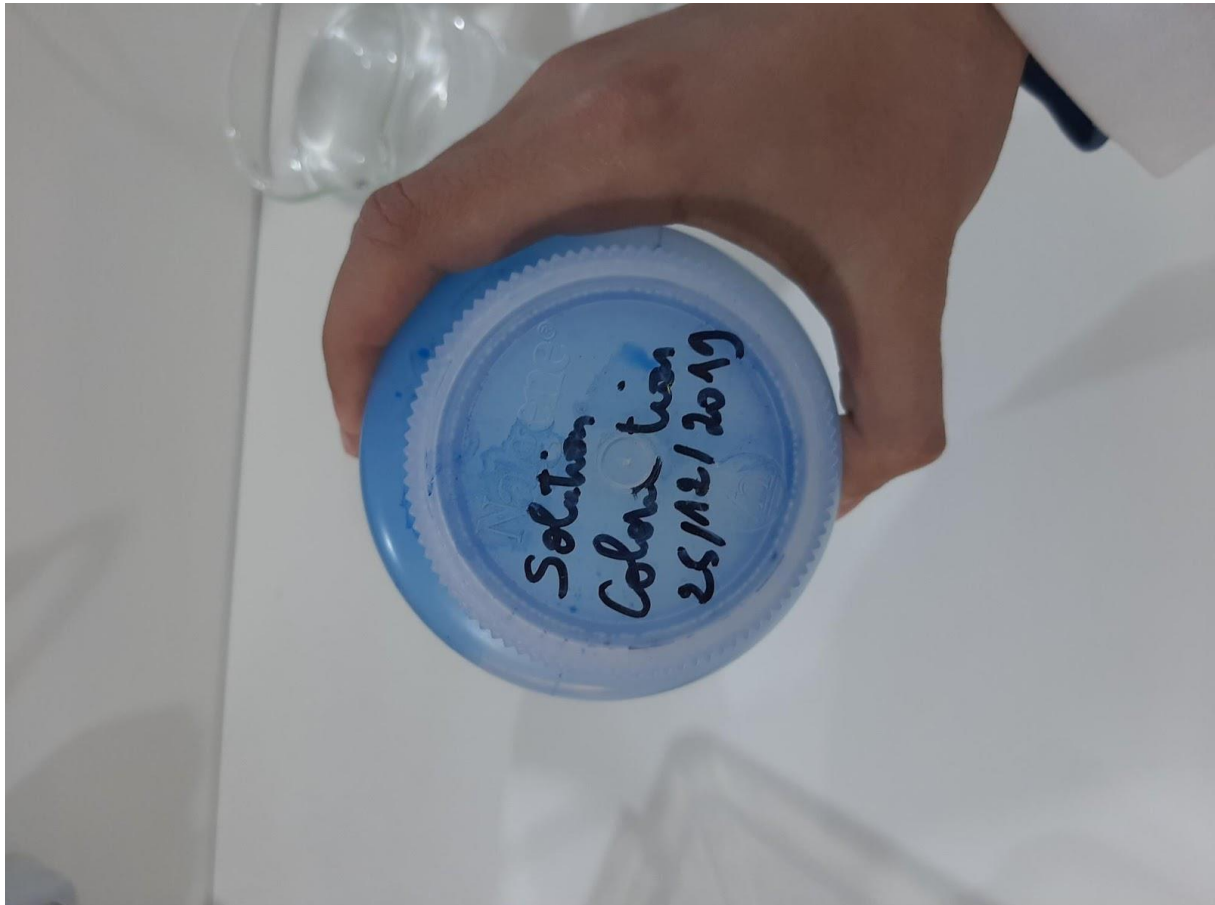


photo. 04 :La Coloration

La décoloration :

La décoloration des gels a été effectuée pendant quelques heures,

La photographie :

conservation du gel, d'un balayage et d'une photographie.

Chapitre III

Résultats et discussion

Dans la présente étude, la SDS-PAGE des protéines de graines de treize variétés de pois a été réalisée pour étudier la diversité génétique au niveau des protéines.

Le profilage de stockage des graines a montré un polymorphisme distinct dans les motifs de bandes électrophorétiques et a conduit à la détection d'un total de 9 bandes polypeptidiques (Fig. 1) (gel électrophorétique des protéines totales des grains des variétés de (*pisum sativum* L)).

Le polymorphisme était évident dans toutes les fractions de protéines de stockage des cultivars de pois sélectionnés sur la base de leur poids moléculaire.

Les cultivars de pois ont été distingués sur la base de la présence et de l'absence de bandes de protéines à une valeur RM particulier

III-1 Analyse biochimique

L'analyse du polymorphisme protéique des treize variétés appartenant aux espèces (*Pisum sativum* L) par électrophorèse mono dimensionnelle en présence de SDS-PAGE, nous a permis de déterminer le polymorphisme qui est démontré par un Dendrogramme.

1- Paramètres biochimiques : les protéines totales :

A partir des protéines extraites des grains des treize variétés de *Pisum sativum* L, nous avons procédé à une analyse des profils électrophorétiques et calculer l'indice de similarité d'une part, et d'autre part nous avons effectué une classification hiérarchique à l'aide d'un dendrogramme.

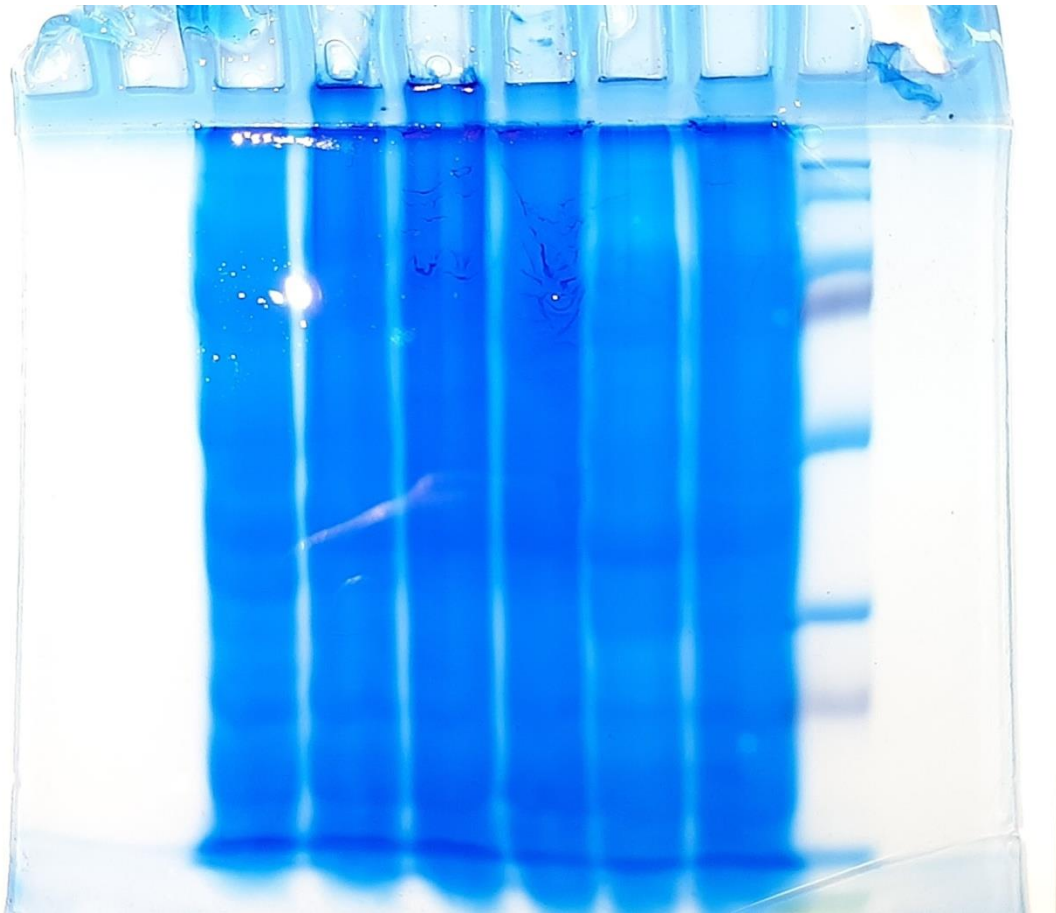


Figure 06 :Gel électrophorétique des protéines totales des grains des variétés de *Pisum sativum*

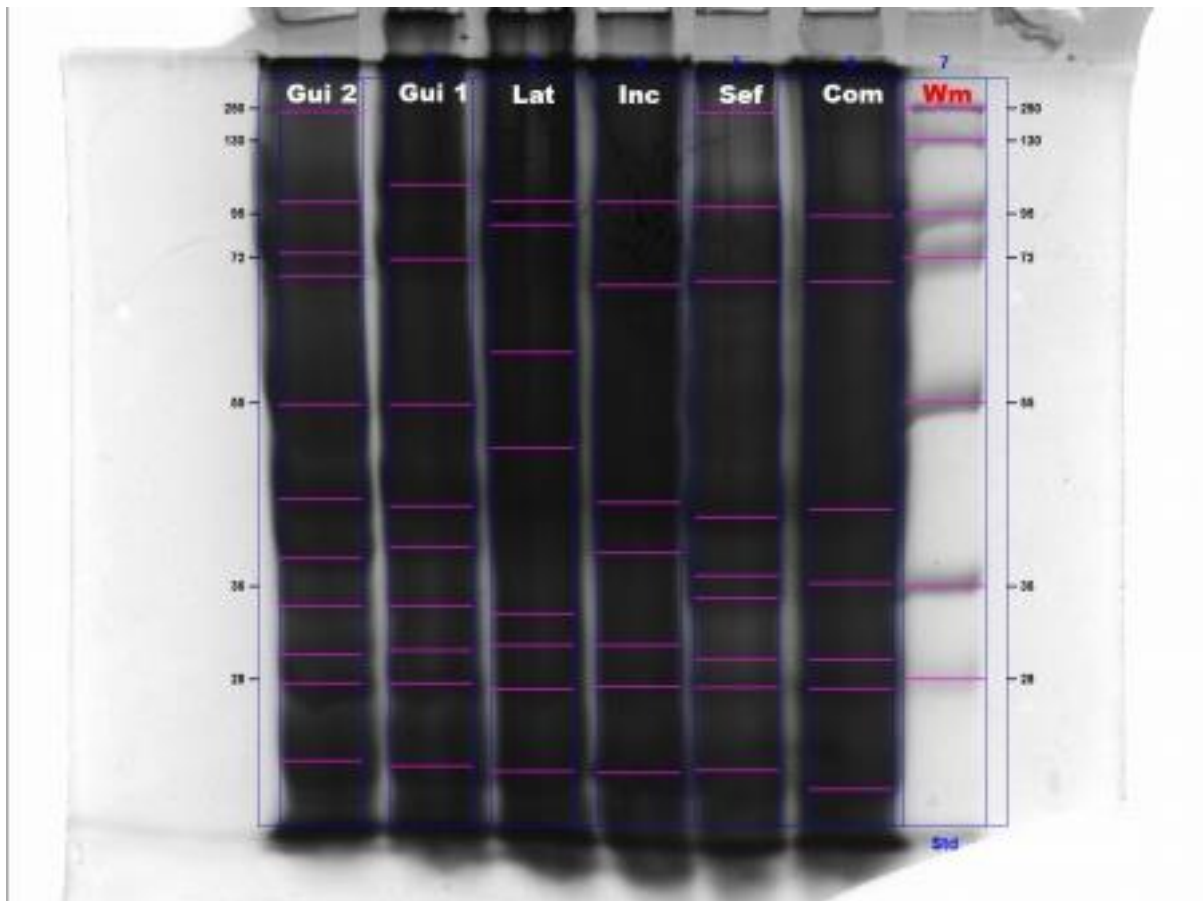


Figure07 :Gelelectro-proteique des proteines totales des varietes de pisumsativum traitent avec un system d'imagerie biorad GEL DOC XR (Gui2,Gui 1,Lat,Inc,Sef,Com)

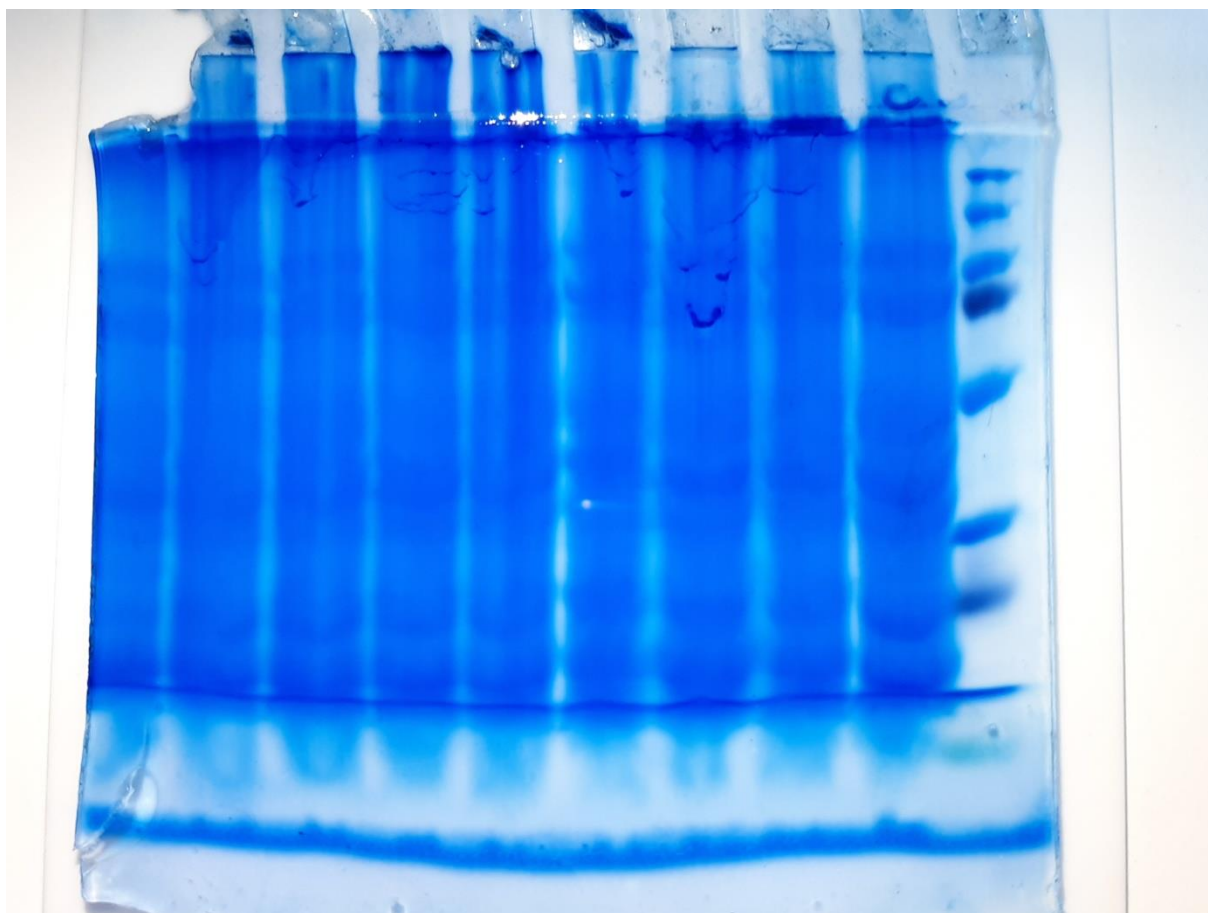


Figure 08 :Gel électro-phorétique des protéines totales des grains des variétés de *Pisum sativum*

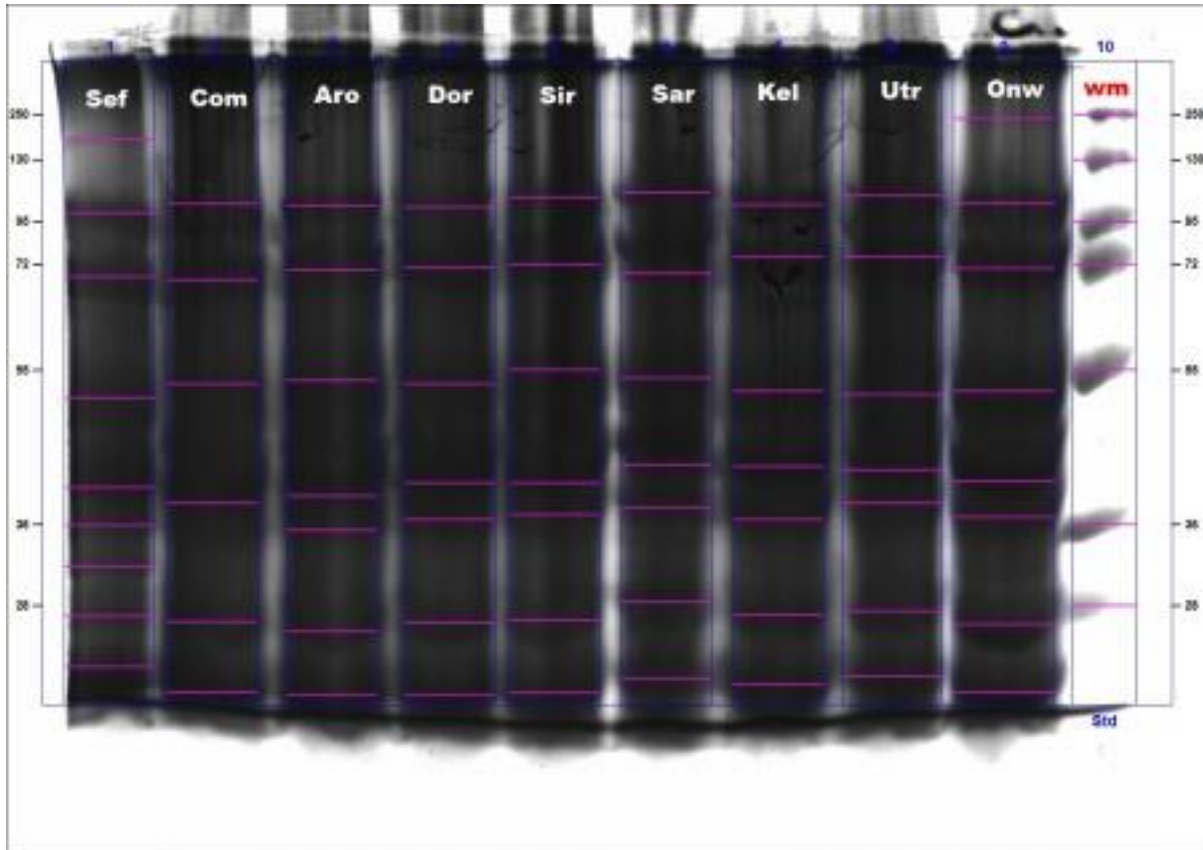


Figure09 :Gel electro-proteique des protéines totales des variétés de *pisum sativum* traitent avec un system d'imagerie biorad GEL **DOC XR**(Sef,Com,Aro,Sir,Sar,Kel,Ulr,Onw)

1.1. Etude de l'électrophore gramme

L'analyse des diagrammes consiste à révéler la mobilité relative de chacune des bandes observées sur le gel. L'électrophore-gramme obtenu présente des bandes

claires, distinctes et bien séparées, d'intensité variable, un nombre total de 84 bandes, de poids moléculaire variant de 28 à 104 KD est observé.

Tableau 02: Valeurs de poids moléculaires et présence /absence de protéines de grains solubles totales dans les variétés de pois SDS PAGE

N O B	MW (Kd a)	Séfr ou	Comb adoz	Aro ubia	Dor ian	Sir ma	Sa ra	Kelve don	Utr illo	Onw ard	Incon nue	Lat cha	Gui filo	Guifr edo
1	234 .00	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
2	175 .00	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	104 .00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	89. 00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
5	71, 00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
6	60, 00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
7	53, 00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
8	50. 00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
9	42, 00	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
10	38. 00	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
11	34. 00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
12	31, 00	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
13	28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tot al	7	5	5	6	6	6	6	6	7	6	7	8	9

On constate que cet électrophore gramme a révélé un polymorphisme important se résumant comme suit (tableau 02) :

- Chaque variété présente de 5 à 9bandes.
- Pour chaque variétés ,on observe une bande spécifique (Marqueus)

- Présence d'une bande commune de 104 kda et 28 Kda chez les treize variétés

1-2- Analyse du polymorphisme protéique:

Le nombre de bandes révélées chez les différentes variétés varie de **23 à 30 bandes**

Les modèles de SDS page des protéines de stockage des graines ont montré que parmi 84 bandes électrophorétiques, 24 bandes ont été enregistrées comme polymorphes.

Le nombre de bandes pour la SDS page tris soluble présente dans chaque variété variait de 5 à 9 avec une valeur de 28 à 234 (Kda), les bandes ayant une valeur 28 et 104 (Kda) ont été trouvées communes dans toutes les variétés de pois, les bandes ayant une valeur 50, 60 et 89 (Kda) n'ont été trouvées que dans une variété ; Latcha, la bande ayant une valeur 175 (Kda) n'a été trouvée qu'à Séfrou alors que les bandes ayant une valeur 234 (Kda) n'ont été trouvées qu'à Guifredo et Onward.

La variété Guifredo avait enregistré le plus grand nombre de bandes (9) alors que le nombre minimum de bandes (5) était observé dans deux variétés ; Combadoz et Aroubia. (6) Des bandes ont été trouvées à Dorian, Sirma, Sara, Kelvedon, Utrillo et Inconnue, (7) des bandes ont été trouvées à Séfrou, Onward et Latcha et (8) des bandes ont été trouvées à Guifilo

La différence assez sensible dans l'intensité des différentes bandes protéiques produites pourrait s'expliquer par l'influence des conditions de l'environnement ou de l'hôte.

. Gardiner & Forde (1992) rapportaient que les protéines natives des graines, mises en évidence par SDS-PAGE, est une technique efficace pour distinguer les cultivars des légumineuses. Le présent travail suggère l'utilisation de cette méthode pour l'identification des espèces.

Classification hiérarchique

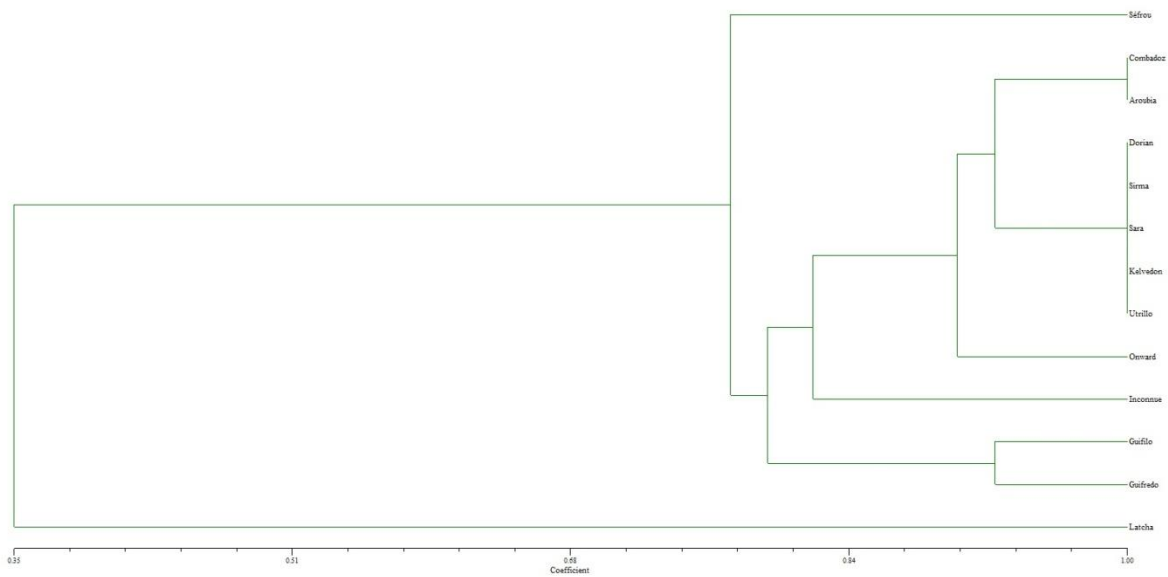


Figure10 :SDS PAGE dendrogramme de 13 variétés de graines de Pisumsativum basé sur le model de bandes de protéines a l'aide de l'analyse en grappe UPGMA (SM)

La classification hiérarchique des protéines totales a permis d'établir un dendrogramme illustrant les relations entre les treize variétés (Onward,Utrillo, Kelvedon ,Sirma, Dorian ,Inconnue, Sara,Séfrou,Aroubia,Combadoz,latcha, guifilo,Guifredo) de pisumsativum.

Le dendrogramme de distance de similarité de 13 variétés de pois du motif de bandes de protéines solubles tris à l'aide de l'analyse des grappes UPGMA a révélé qu'à la distance de 0,51. Fig 10 :SDS PAGE dendrogramme de 13 variétés de graines de pisum sativum basé sur le model de bandes de proteines a l'aide de l'analyse en grappe UPGMA (SM)

Tableau03 :subdivision des groupes

Groupes	Groupe Majeur 1			Groupe Majeur 2
Variétés	Sous-groupe 1	Sous-groupe 2	Sous-groupe 3	Sous-groupe 4
	Guifilo,Guiferdo, Aroubia,Combadoz Dorian,sara,sefrou,Aroubia Sirma,kelvedon	onward	inconnue	Latcha

Sur la Figure 10 ,on remarque que les différentes variétés se répartissent sur un groupe majeur et groupe mineurs.

Le groupe majeur 1 subdivisé en trois sous groupes :

Le sous groupe 01 :contient une variétés : Guifilo,Guiferdo, Aroubia,Combadoz, Dorian,Sara,Sefrou,Aroubia,sirmakelvedon les variétés sont liées avec une similarité de 0.95

Le sous groupe 02 et sous groupes 03 : les variétés :Onward et Inconnu ont respectivement une plus grands distances par apport au autre variétés.

Le groupe majeur 02 subdivisé en sous groupe 04 :regroupe la variété Latcha liees avec une similarité de 25%l'un de l'autre.

Conclusion général :

La présente enquête a été réalisée sur treize variétés de pois (*Pisum sativum* L.) pour le profilage de protéines par SDS-PAGE dans le centre de recherche en Biotechnologie (C.R.B.T constantine).

L'étude a conclu que l'analyse de la variabilité des protéines montrait clairement qu'il y avait une divergence entre ces variétés de pois en ce qui concerne la protéine de stockage des graines .

L'électrophorèse des protéines des 13 variétés a généré des profils protéiques électrophorétiques relativement similaires entre les différents treize variétés analysés.

De plus la classification hiérarchique illustrant les relations entre les treize variétés appartenant à *Pisum sativum* L., a montré que les variétés : Guifilo, Guiferdo, Aroubia, Combadoz, Dorian, Sara, Sefrou, Aroubia, sirmakelvedon qui sont proches et présentent un taux de similarité égal à 95%.

Annexe

Tampon de charge (SDS-PAGE).

(Tris-HCl :0.125M ; SDS :4% ;Glycerol :20% ;2-Mercaptoethanol 0.04% ; PH: 6.8

-Tris-Hcl 0.5M	1.25 ml
-SDS 10	2M
-Glycerol	5ml
-2-mercaptoethanol	0.5 ml
-Bleu de bromophenol	1ml
-Eau distillée q.s.p	10ml

Le tampon est réparti à raison de 0,5ml par tube à hémolyse avant d'être conservé au congélateur jusqu'au moment de l'emploi.

Tampon de migration

(Tris 0.25M ,Glycerine 1.92M , SDS 0.1 ,ph :8.3)

-Tris	3.03g
-Glycine	14.4g
-SDS	1g
-Eau distillé	1000ml

Le tampon est conservé au réfrigérateur

Solution d'acrylamide :30%

-Acrylamide	30g
-Eau distillé	1000ml

Solution de bis-acrylamide 1%

-Bis-acrylamide	1g
-Eau distillé	1000ml

-Tampon de séparation

Tris -Hcl :1.5M, PH :8.8

-Tris	36.9g
-Eau distillé	1000g

-Tompon de concentration

Tris H-cl : 0.5M , PH : 6.8

-Tris	3g
-Eau distillée	1000ml

-Solution de coloration

-Bleu de comassie G 250	1.5g
-Ethanol	250ml
-Acide Acitique	40ml
-Eau distilléq.s.p	1000ml

-Solution de décoloration

-Ethanol	250ml
-acide acetique	20 ml
-Eau distillée q.s.p	1000ml

References:

- Ahmad, G., Rajdeep, M., Shikha, K. and Srivastav, M. K. 2010. Evaluation of genetic diversity in pea (*Pisum sativum* L.) using RAPD analysis. *Gene. Eng. Biotechnol. J.*, GEBJ-16.
- Analysis of variability in different genotypes of pea (*Pisum sativum*) on the basis of protein markers. *Legume Res.*, 32 (4): 265-269.
- Appl. Genet.*, 49: 155-166.
- Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica*, 137: 6372.
- Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Rep.*, 26: 1985-1998. Smýkal, P., Horáček, J., Dostálová, R. and Hýbl, M. 2008.
- Casey, R. and Davies D. R. 1993. Peas: genetics, molecular biology and biotechnology, *Biotechnol. Agric. Ser. No. 10*, CAB international.
- Characterization of mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern. and Coss.] germplasm by SDS-PAGE of total seed protein. *Pak. J. Bot.*, 33(2): 173-179.
- Cheghamirza, K., Koveza, O., Konovalov, F. and Gostimsky, S. 2002.
- Choudhury, P. R., Tanveer, H., Dixit and G. P. 2007.
- Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685. Malviya, N. and Yadav, D., 2010.
- Comparative genome analysis in pea *Pisum sativum* L. varieties and lines with chromosomal and molecular markers. *Genetika*. 44 (12): 1644-1651.
- Crawford DJ, Ruiz E, Stuessy TF, Tepe E, Quevequep A, Gonzales F, Jensen RJ, Anderson GJ, Bernardello G, Baeza CM, Swenson U, Silva M. 2001. Allozyme Diversity In Endemic Flowering Plant
- Development of an efficient retrotransposon-based fingerprinting method for rapid pea variety identification. *Theor. Appl. Genet.*, 47(3): 221-230.
- Doyle, J. J. and Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 19: 11-15.
- Extent and pattern of genetic diversity for morpho-agronomic traits in Ethiopian highland pulse landraces: I. Field pea (*Pisum sativum* L.). *Genet. Resour. Crop Evol.*, 52: 539-549.
- FAO. 2008. [www.Http://Faostat.Fao.Org](http://faostat.fao.org).

FAO.2008. [www.http://faostat.fao.org](http://faostat.fao.org). Griga, M. and Novak F. J. 1990.

Genetic analysis of needle proteins and proteins variation in maritime pine. *Silvae-Genetica*, 49(4): 146-150.

Genetic diversity among Chinese Pea (*Pisum sativum* L.) landraces as revealed by SSR markers. *Acta Agron. Sinica*, 34: 1330-1338.

Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breed.*, 121: 429-435. Smykal, P. 2006.

Genetic diversity in local and exotic pea (*Pisum sativum* L.) germplasm for morphological traits and SDS-PAGE markers. M.Phil. Dissertation, Quaid-e-Azam University, Islamabad. Rabbani, M. A., Qureshi, A. A., Afzal, M., Anwar, R. and Komatsu, S. 2001.

Hameed, A. M. Qureshi, M. Nawaz and Iqbal, N. 2012b. Comparative Seed Storage Protein Profiling Of Mung Bean Genotypes. *Pak. J. Bot.*, 44(6): 1993-1999.

Hameed, A. Shah, T.M. Atta, B.M. Iqbal, N. Haq, M.A. and Ali, H. 2009. Comparative Seed Storage Protein Profiling Of Kabuli Chickpea Genotypes. *Pak. J. Bot.*, 41(2): 703-710.

Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991. Correlations Between Species Traits And Allozyme Diversity: Implication For Conservation Biology. In: Falk DA. And Holsinger KE (Eds.), *Genetics And Conservation Of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, USA. 75-86

IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp. Kianoosh, C., Okasan K., Fedor K. and Sergei G. 2002.

Identification and detection of genetic relatedness among important varieties of pea (*Pisum sativum* L.) grown in India. *Genetica*, 130(2): 183-191. Coata, P. and Plomion H. 2005.

Identification and mapping of polymorphic RAPD markers of pea (*Pisum sativum* L.) genome, *Genetika*, 41(3): 341-348. Laemmli, U.K. 1970.

Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 7: 649-655.

Identification of RAPD markers and their use of molecular mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Cell Mol. Biol., Lett.*, 7 (2B): 649-655.

Iqbal, S.H. Ghafoor, A. and Ayub, N. 2005. Relationship Between SDS-PAGE Markers And *Ascochyta* Blight In Chickpea. *Pak. J. Bot.*, 37: 87-96.

Keneni, G., Jarso, M., Wolabu, T. and Dino G. 2005.

Kovesa, O. V., Kokaeva, Z. G., Konovalov, F. A., Gostimskii, S. A. 2005.

- Kovesa, O. V., Kokaeva Z. G., Gostimsky S. A., Petrova T. V. and Osipova E. S. 2001. Creation of a SCAR marker in Pea (*Pisum sativum* L.) using RAPD analysis. *Russ. J. Genet.*, 37(4): 464-466.
- Malik MFA, Qureshi AS, Ashraf M, Khan MR, Javed A. 2009. Evaluation Of Genetic Diversity In Soybean (*Glycine Max*). Lines Using Seed Protein. *Electrophoresis. Australian Journal Of Crop Science* 3:107-112.
- Pea (*Pisum sativum* L.). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in Agriculture and Forestry* 10, Legume Oil Crop, I: 65-99. IBM Corporation released 2012.
- Production and evaluation of pea protein isolate. Presented at the 40th annual meeting of the Institute of Food Technologists, New Orleans, La, June 8-11. Suska, M. and Stejskal, J. 1992.
- RAPD analysis among pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.] cultivars for their genetic diversity. *Genet. Eng. Biotechnol. J.*, GEBJ-1 Mehrani, P. 2002.
- Samatadze, T. E., Zelenina, D. A., Shostak, N. G., Volkov, A. A., Popov, K. W., Rachinskaja, O. V., Borisov, A. U., Tikhonovich, I. A., Zelenin, A. V. and Muravenko, O. V. 2008.
- Simioniuc, D., Uptmoor, R., Friedt, W. and Ordon, F. 2002.
- Singh, B.D. 2007. *Plant Breeding Principles And Methods. Heterosis And Inbreeding Depression.* Kalyani Publishers, New Delhi. Pp. 230-53.
- Smykal, P., Valledor, L., Rodríguez, R. and Griga. M. 2007.
- Sonali, G., Saroj, D. and Nirmala, C. 2009.
- Species Of The Juan Fernandez Archipelago, Chile: Ecological And Historical Factors With Implications For Conservation. *American J. Botany* 88(12): 2195-2203.
- Sumner, A. K., Nielsen M. A. and Youngs C. G. 1980.
- Sumner, A. K., Nielsen M. A. and Youngs C. G. 1980. Production And Evaluation Of Pea Protein Isolate. Presented At The 40th Annual Meeting Of The Institute Of Food Technologists, New Orleans, La, June 8-11.
- The electrophoretic identification of pea (*Pisum sativum* L.) cultivars by seed protein analysis. *Rostlinna Vyroba.* 38: 203-207. Vaz Patto, M. C., Satovic, Z., Pego, S. and Fevereiro, P. 2004.
- Variety discrimination in pea (*Pisum sativum* L.) by molecular, biochemical and morphological markers. *J.*
- Zong X. X., Guan, J. P., Wang, S. M., Liu, Q. C. 2008b. Genetic diversity and core collection of alien *Pisum sativum* L. germplasm. *Acta Agron. Sinica*, 34: 1518-1528.
- Zong, X. X., Guan, J. P., Wang, S. M. and Liu Q. C. 2008a.

