

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم بيولوجيا و علم البيئة

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : sciences biologiques
Spécialité : biotechnologie et génomique végétale

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Identification structurale des chromosomes de l'espèce *Pisum sativum L.*

Présenté par : BENDAIRA Nihad

Le 00/06/2022

Jury d'évaluation :

Encadreur : Mme. HAMMOUDA-BOUSBIA Dounia (Professeur.-UMC Constantine1).

Examineur 1 : Mr BAZIZ- Karim (MCA. - UNIV. Hadj LAKHDAR-Batna.).

Examineur 2 : Mm KHENNAOUI- Amina (MCB. - UMC, Constantine 1).

Année universitaire
2021 - 2022

*Certes, il y'a des travaux
pénibles ; mais la joie de la
réussite n'a-t-elle pas à
compenser nos douleurs ? »*

Jean de la Bruyère

Remerciement

Tout d'abord je remercie Dieu le tout puissant qui m'a gardé en bonne santé et m'a donné la force et la patience afin de réaliser ce travail.

*Je tenais à remercier chaleureusement et infiniment mon encadreur le professeur **Mme Hammouda Dounia** pour la disponibilité et le support qu'elle a investi dans la supervision de mon mémoire. Elle a été pour moi un excellent guide au cours de ce périple académique. Je suis très reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée et pour avoir cru en mes capacités tout au long de ce travail. Je vous remercie pour votre patience, ainsi que pour la gentillesse que vous avez manifestée à notre égard.*

*Je tiens aussi à remercier également, les membres de jurys **Dr. Baziz Karim** et **Dr. Khannaoui Amina** d'avoir accepté de juger ce travail.*

*A monsieur **Benmehidi Oussama** pour ses remarques et ses conseils et leur soutien inestimable.*

A tous mes enseignants rencontrés lors de mon cycle universitaire qui m'ont initié aux valeurs authentiques, en signe d'un profond respect et d'un profond amour !!!

Merci à vous tous.

Dédicace

Avec l'expression de ma reconnaissance, Je dédie mon travail

*À l'être le plus cher de ma vie **ma mère** qui n'a jamais cessé de
formuler des prières à mon égard de me soutenir et de m'épauler pour
que je puisse atteindre mes objectifs, pour son amour et ses sacrifices
que dieu la garde pour nous*

*À mon premier amour **mon père** pour son affection son
encouragement et la confiance qui m'a accordé qui a fait de moi ce que
je suis aujourd'hui*

*À mon cher frère **Amir**, À ma chère sœur **Ibtissam**
Pour leurs soutiens moral et leurs conseil précieux tout au long de mon
chemin, les mots ne suffisent pas pour exprimer l'attachement et
L'amour que je porte pour vous. Que dieu les protège et leurs offre la
chance et le bonheur*

*À ma copine **Oumaima** qui a été toujours là pour m'aider et supporté
dans mes moments très difficiles*

*À Ma copine **Oulfet** pour ses soutiens, ses encouragements et sa
présence à mes côtés toujours*

*À ma cousine **loudjaine** que je lui souhaite réussir son Bem*

*À mes amies : **Fadwa, Thamina, Poussi, Asma, mira, Doria, Sonia**
pour les bons moments qui m'ont offert*

*À mon encadreur **Mme Hammouda Dounia** que les mots ne suffisent
pas pour la remercier*

Résumé :

Notre étude porte sur le marquage de l'hétérochromatine correspondant à des séquences d'ADN hautement répétées (riche en bases CG = séquences d'ADN non codantes) des chromosomes de l'espèce *Pisum sativum* L (variété Séfrou), grâce à la technique de coloration différentielle C-banding.

Nous avons pu identifier et caractériser le caryotype de la variété, deux satellites sont mis en évidence sur les chromosomes marqueurs. L'analyse structurale de *Pisum sativum* L ($2n=2x=4m + 3Sm = 14$) a montré un taux moyen d'hétérochromatine chez la variété Séfrou. Également, notons la présence des satellites et absence des chromosomes B.

Les résultats obtenus confirment l'existence de la relation entre le surcharge en hétérochromatine et l'adaptation du végétal aux conditions défavorables de l'environnement. Notre variété serait bien adaptée aux conditions défavorables.

Mot clés : bandes C- chromosomes marqueurs, hétérochromatine *Pisum sativum* L., satellite

Abstract :

Our study focuses on the marking of heterochromatin corresponding to highly repeated DNA sequences (rich in CG bases = non-coding DNA sequences) of the chromosomes of the species *Pisum sativum L* (Séfrou variety), thanks to the C-staining technique banding.

We were able to identify and characterize the karyotype of the variety, two satellites are highlighted on the marker chromosomes. Structural analysis of *Pisum sativum L* ($2n=2x=4m + 3Sm = 14$) showed an average heterochromatin level in the Séfrou variety. Also note the presence of satellites and absence of B chromosomes.

The results obtained confirm the existence of the relationship between heterochromatin overload and the adaptation of the plant to adverse environmental conditions. Our variety would be well adapted to unfavourable conditions.

Keywords: bandes C- chromosomes marqueurs, hétérochromatine *Pisum sativum L.*, satellite

ملخص:

تركز دراستنا على تمييز ال *hétérochromatine* المتمثل في لتسلسلات الحمض النووي المتكررة للغاية (الغنية بالقواعد =CG= تسلسلات الحمض النووي الغير مشفرة) للكروموزومات للنوع *Pisum sativum L.* (الصنف Séfrou) وذلك بفضل تقنية التلوين المختلف C-banding .

تمكنا من تحديد و وصف النمط النووي للصنف . و تم تسليط الضوء على قمرين صناعيين على الكروموسومات المميزة , اظهر التحليل الهيكلي ل *Pisum sativum L* $2n=2x=4m+3Sm=14$ مستوى متوسط *hétérochromatine* في صنف Séfrou. يلاحظ أيضا وجود أقمار صناعية وغياب الكروموسوم B.

تؤكد النتائج التي تم الحصول عليها وجود العلاقة بين الحمل الزائد من *hétérochromatine* و تكيف النبات مع الظروف البيئية المعاكسة , الصنف التي تمت دراسته سيكون متكيفا جدا مع الظروف المعاكسة

الكلمات المفتاحية : *Pisum sativum L.*, satellite
bandes C- chromosomes marqueurs, *hétérochromatine*

Liste des tableaux

	Page
Tableau 01 : Représentation les deux formes de l'hétérochromatine.....	19
Tableau 02 : Liste des variétés introduites dans une étude cytogénétique.....	23
Tableau 03 : études des caractères observés chez <i>Pisum sativum</i>	

Liste des figures

Figure 01 : les graines de légumineuses.....	01
Figure 02 : les graines de l'espèce <i>Pisum sativum</i>	03
Figure 03 : la stipule du pois (Mori, 2018).....	03
Figure 04 : Différents types de feuilles de pois (Srarfi Ben Ayad, 2017) Feuille avec folioles (normale), (B) : Feuille sans folioles (afila).....	05
Figure 05 : Schéma général d'une plante de pois (Boyeldieu, 1991).....	06
Figure 06 : La fleur de pois (Koirala, 2018).....	07
Figure 07 : comparaison de trois types de feuilles (Cousin, 1996) : Feuille normale, (B) feuille sans foliole (Afila), (C) pois sans feuilles ou leafless.....	09
Figure 08 : Zones d'aptitude de la culture du petit pois en Algérie.....	14
Figure 09 : Composition chimique du pois (PROLEA., 2009).....	16
Figure 10 : types morphologiques des chromosomes selon la position du centromère.....	18
Figure 11 : plaque métaphasique marquée par les bandes C (en noir) Représentant l'hétérochromatine.....	19
Figure 12 : les graines de variété Séfrou	23
Figure 13 : microscope de type LEICA DM 400.....	26
Figure 14 : Caryotype en (C-banding) de l'espèce <i>Pisum sativum</i> (génotype Séfrou).....	

Liste des abréviations

2×SSC : 0.3M de chlorure de sodium et 0.03M de citrate de sodium.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

B : Chromosome B.

BC: Bande centromérique.

BI: Bande intercalaire.

BT: Bande télomérique.

CCLC : Complexe céréalier el khroub, Constantine, Algeria

CS : Construction secondaire.

ICARDA : International Center for Agricultural Research Dry Areas Centre
International de la Recherche Agricole en Zones Arides.

I.T.G.C : institut technique des grandes cultures.

NOR : Région organisatrice nucléolaire

S : Satellite.

Subsp : Sous l'espèce.

µm : Micro mètre.

Table de matière

Résumé
Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations

Introduction page

Chapitre I : Revue bibliographique

1 Les légumineuses :	1
2 Le petit pois.....	2
2.1 <i>Origine et historique</i>	2
2.2 <i>Taxonomie du pois</i>	3
2.3 <i>Caractères généraux du pois</i>	5
2.4 <i>Diversité génétique chez le pois</i>	8
2.5 <i>Importance des variétés locales et nécessité de leur conservation</i>	10
2.6 <i>Les types d'intérêts</i>	14
2.6.1 <i>Intérêt agronomique</i>	14
2.6.2 <i>Intérêt nutritionnel</i>	15
2.7 <i>Importance agronomique des légumineuses</i>	15
3 Caractéristiques cytogénétiques	16
3.1 <i>La cytogénétique</i>	16
3.2 <i>Le génome</i>	16
3.3 <i>Caryotypage</i>	16
3.4 <i>Critères d'identification des chromosomes</i>	17
3.4.1 <i>Critères de la forme</i>	17
3.4.2 <i>Critères de la structure</i>	18
3.4.3 <i>Structure moléculaire des chromosomes</i>	20
3.4.4 <i>Structures chromosomiques spécialisées</i>	20
3.5 <i>Les techniques de banding</i>	21
3.5.1 <i>Les bandes G</i>	21
3.5.2 <i>Les bandes R (Reverse)</i>	21
3.5.3 <i>Les bandes Q</i>	21
3.5.4 <i>Les bandes N</i>	21

Chapitre II : Matériel et Méthode

1 Matériel végétal	23
2 Etapes préliminaires	23

3 Technique du C-banding	25
---------------------------------------	-----------

Chapitre III Résultats et discussion

1 Résultats	28
2 Discussion	31
Conclusion et perspectives	49
Références bibliographiques	50

Introduction

Introduction :

Le pois du jardin (*Pisum sativum* L.) est l'une des légumineuses importantes. Taxonomiquement, le pois fait partie de la famille des légumineuses Vicia, et est donc étroitement lié à Vicia (**Ellis and Poyser, 2002**). Le pois est l'un des sujets les plus anciens de la génétique scientifique (**Knight, 1799 ; Mendel, 1866**). Néanmoins, il existe encore des incertitudes concernant l'identification sans ambiguïté de ses sept paires de chromosomes et l'attribution des groupes de liaison génétique aux types de chromosomes individuels (**Fuchs et al. 1998, Russ. J. Genet. 2005**) De manière surprenante, ce n'est que relativement récemment qu'une image cohérente de la structure globale du génome a été émergé (**Akad.and Nauk 2002**)

À la fois en termes de caryotype et l'organisation des groupes de liaison génétique (**Ellis & Poyser, 2002**), les études caryo-typiques sont largement utilisées pour caractériser et distinguer les chromosomes des différentes espèces. Les caractères cytologiques (*Pisum sativum*) sont étudiés par un certain nombre de cytologistes **Ekolog.and Genet (2006)** **Bhattacharya et Bhattacharya (2003)** ont trouvé une variation du nombre de chromosomes dans les pointes de racine de cultivars de *Pisum sativum* et de ses types sauvages. (**Samatadze et al., 2002**).

Une étape importante dans le développement de la plante, la cytogénétique est l'introduction de méthodes de coloration des chromosomes dans les années 1970 (**Miller, D.A., Dev, V.G., Tantravahi, R., and Miller**). Pendant de nombreuses années, la technique de coloration différentielle « C-banding » basé sur l'identification des régions de chromatine constitutive occupaient la première place dans les études sur les chromosomes des plantes (**Neumann et al.**)

Les types de bandes C marquées chez de nombreuses espèces végétales se sont avérés être suffisamment informatives non seulement, pour faciliter l'identification, mais aussi pour révéler les réarrangements des chromosomes (ou mutations chromosomiques) , comparer les génomes et les sous-génomes dans les espèces polyploïdes, analyser et étudier l'origine des espèces et la relation phylogénétique entre différents taxons

Dans le cadre d'un projet de recherche portant sur les ressources phytogénétiques de légumineuses alimentaires (espèce *Pisum sativum*), mené au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales, nous sommes intéressés à l'étude de la caractérisation structurale génomique observés chez la variété Séfrou (locale) appartenant à

Pisum sativum ($2n=2x=14$), dévoilée par la technique de coloration différentielle (C-banding), afin de mettre en évidence :

- Le taux de l'hétérochromatine (séquence ADN non codante riches en bases CG)
- Identification et caractérisation du génome de l'espèce *Pisum sativum*

Le mémoire est structuré en trois chapitres:

- Le premier chapitre porte sur une analyse bibliographique de l'espèce d'étude *Pisum sativum* que des caractéristiques générales sur la cytogénétique.
- Le 2ème chapitre est consacré à la méthodologie de travail adopté au laboratoire.
- Le dernier chapitre est consacré aux résultats et discussions.

Et on termine avec une conclusion et les perspectives dégagées de cette étude.

Chapitre I :
Données
bibliographiques

1 Les légumineuses :

Les légumineuses sont des plantes dont les fruits sont contenus dans des gousses. Désignent un type de cultures récoltées dans le seul but d'obtenir des grains secs. Les haricots secs, les lentilles et les pois sont les types de légumineuses les plus connus et les plus consommés. (Figure 01)

On distingue les légumes secs ou légumineuses et les légumes verts. Les légumineuses sont des plantes dont les fruits sont contenus dans des gousses. Elles peuvent être considérées comme des féculents car elles sont riches en amidon, le glucide des végétaux. En effet, un féculent est un fruit ou un légume riche en amidon. 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.

C'est une famille très diversifiée (figure 1), qui comprend environ 765 genres et 19.500 espèces. On distingue les légumineuses alimentaires (petits pois, lentilles...) des légumineuses fourragères (luzerne, trèfle, sainfoin...) utilisées pour l'alimentation animale.



Figure 01 : les graines de légumineuses

2 Le petit pois

2.1 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) (figure 2).

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. A 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 (Bieb Stev),
abyssinium (Braun),
jomaradi (Schrank),
aethiopicum, asiatium,
humile transcaucasicum
unbellatum.

Ces groupes peuvent être croisés entre eux, en conséquence ils représentent la même espèce. Par contre, les croisements avec les genres voisins : *Lathyrus*, *Vicia* et *Lentis* n'ont jamais pu être obtenus (Coussin, 1997, Ellis and Poyser, 2002).



Figure 02 : les graines de l'espèce *Pisum sativum*

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 (**Figure 3**).



Figure 3 : la stipule du petit pois (Mori, 2018).

Les trois sous-espèces de *Pisum sativum* qui sont décrites en Algérie sont (Quezel et Santa, 1962).

- ***Pisum sativum elatius* (pois sauvage) :**

C'est la forme la plus ancienne de pois, caractérisé par une longue tige (> 1.5m) (Zlatkovic et Mikic, 2010). Elle a été considérée pendant longtemps comme une espèce à part entière, mais a été finalement acceptée comme une sous-espèce de *Pisum sativum*. La forme sauvage du pois a été prospectée en Algérie par Vavilov(1949) (Maxted et Ambrose, 2001).

- ***Pisum sativum arvense* Poir (pois des champs, ou pois fourrager) :**

Chez ce type de pois, les tiges présentent de nombreuses ramifications. Les fleurs sont en général colorées en violet rose, et les gousses sont petites. Le pois fourrager produit une quantité élevée en matière verte à 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 ensilage (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 afile (**Figure 4**). Cette absence de folioles est une caractéristique liée à un gène récessif « af » résultant d'une mutation (**Pesic et 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**).



Figure 4 : Différents types de feuilles de pois (Srarfi Ben Ayad, 2017)
Feuille avec folioles (normale), (B) : Feuille sans folioles (afile).

2.3 Caractères généraux du pois :

L'appareil aérien est constitué d'une tige principale et des ramifications issues des bourgeons latéraux (**Figure 5**). 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 (INA PG, 2003). La tige est creuse, grêle, de longueur très variable (variétés naines, à demi-rames, à rames). Les feuilles sont glauques, cireuses, composées de 2 à 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).

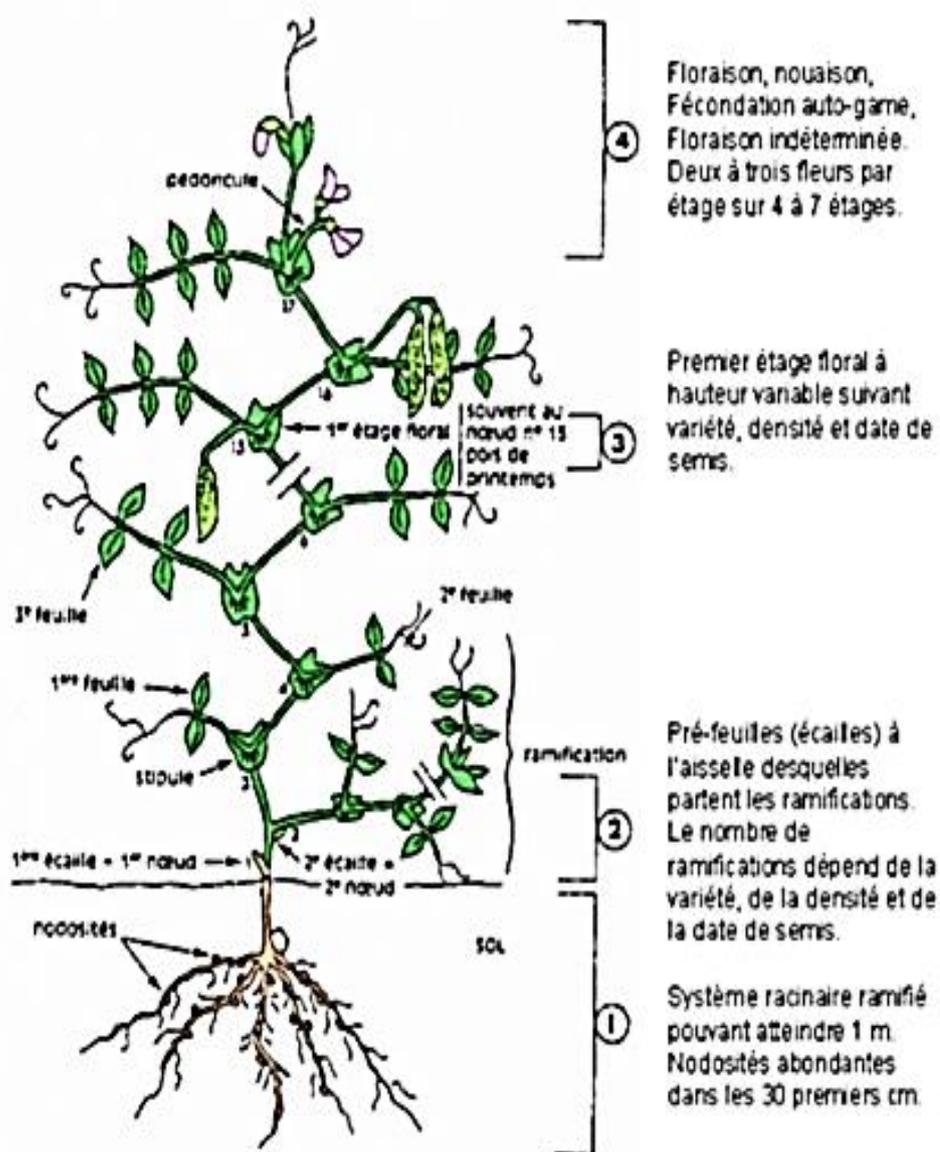


Figure 5 : Schéma général d'une plante de pois (Boyeldieu, 1991).

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 entourent les étamines et le style (**Figure 6**). 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 à 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 à 8 sur un long pédoncule (**Moule, 1972 , Neumann, P., Nouzova, M., and Macas,**).

Les feuilles sont paripennées à 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 ou plus grandes que les folioles, dentées amplexicaules à la base (**Quezel et Santa, 1962**).

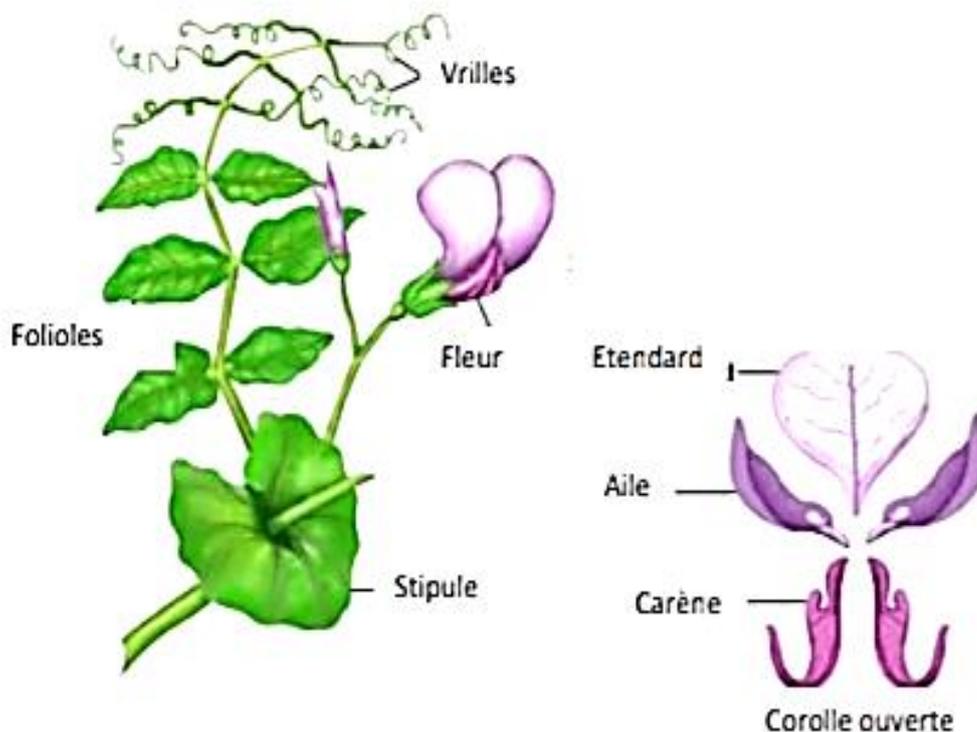


Figure 6 : La fleur de pois (Koirala, 2018).

2.4 Diversité génétique chez le pois :

Il existe chez le pois, une grande diversité génétique à 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* sont détenues en Australie (Australian temperate field crops Collections à Horsham Victoria, 6 300 entrées), aux Etats Unis (Western Regional Plant Introduction Station, à Pullman, 3 500 entrées et à l'Horticultural Sciences Department, au NY State Agricultural Experiment Station, Geneva, 2 500 entrées), en Chine (Institute of Crop Germplasm Resources -CAAS- à 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* en Afrique est située à l'Institute of Biodiversity Conservation, à 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 (**Smykal et 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 à la floraison, etc., montrent d'importantes disparités d'un cultivar à un autre. Ainsi, selon la taille du plant on peut distinguer des variétés naines (entre 60 et 90cm) et des variétés élevés pouvant atteindre 80 à 2.50 cm (**Trébuchet et al., Janilla, P. and Sharma 2004**). 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 afila, ce qui assure une meilleure pénétration de la lumière à 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 » (**Figure 7**). Le gène « **il** » (tendriless) transforme les vrilles en folioles supplémentaires. Le gène « **roque** » réduit la largeur des folioles et des stipules, qui se dressent comme des oreilles de lièvre (**Cousin, 1996**).

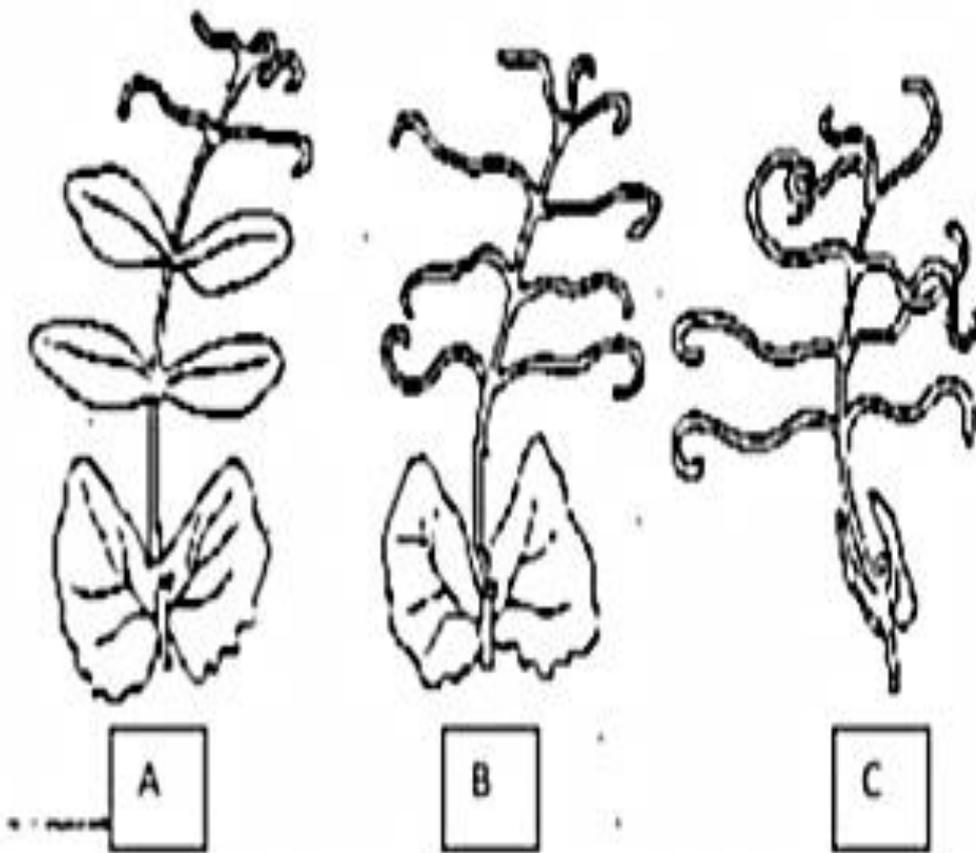


Figure 7 : Comparaison de trois types de feuilles (Cousin, 1996) :
feuille normale, (B) feuille sans foliole (Afila), (C) pois sans feuilles ou leafless.

2.5 Importance des variétés locales et nécessité de leur conservation :

- **Ressources phytogénétiques :**

Les ressources phyto-génétiques sont basées sur 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 » (landraces) (**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. A 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 (**Marchenay et Lagarde, 1987**).

- **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 phytogénétiques 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, Rwantooro et Nyakasaza) sur cinq sont abandonnées par les agriculteurs dans la région de Kabale en Ouganda (**Mbabwine et 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 Etats 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'avèreraient nécessaires dans des circonstances nouvelles imprévues (**UNESCO, 1990**).

- **Conservation des variétés du pays**

les variétés dites locales représentent à la fois un patrimoine végétal et un ensemble de ressources phytogénétiques. 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** a 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 agroécosystèmes 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 (**Bazile et Coulibali, 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).

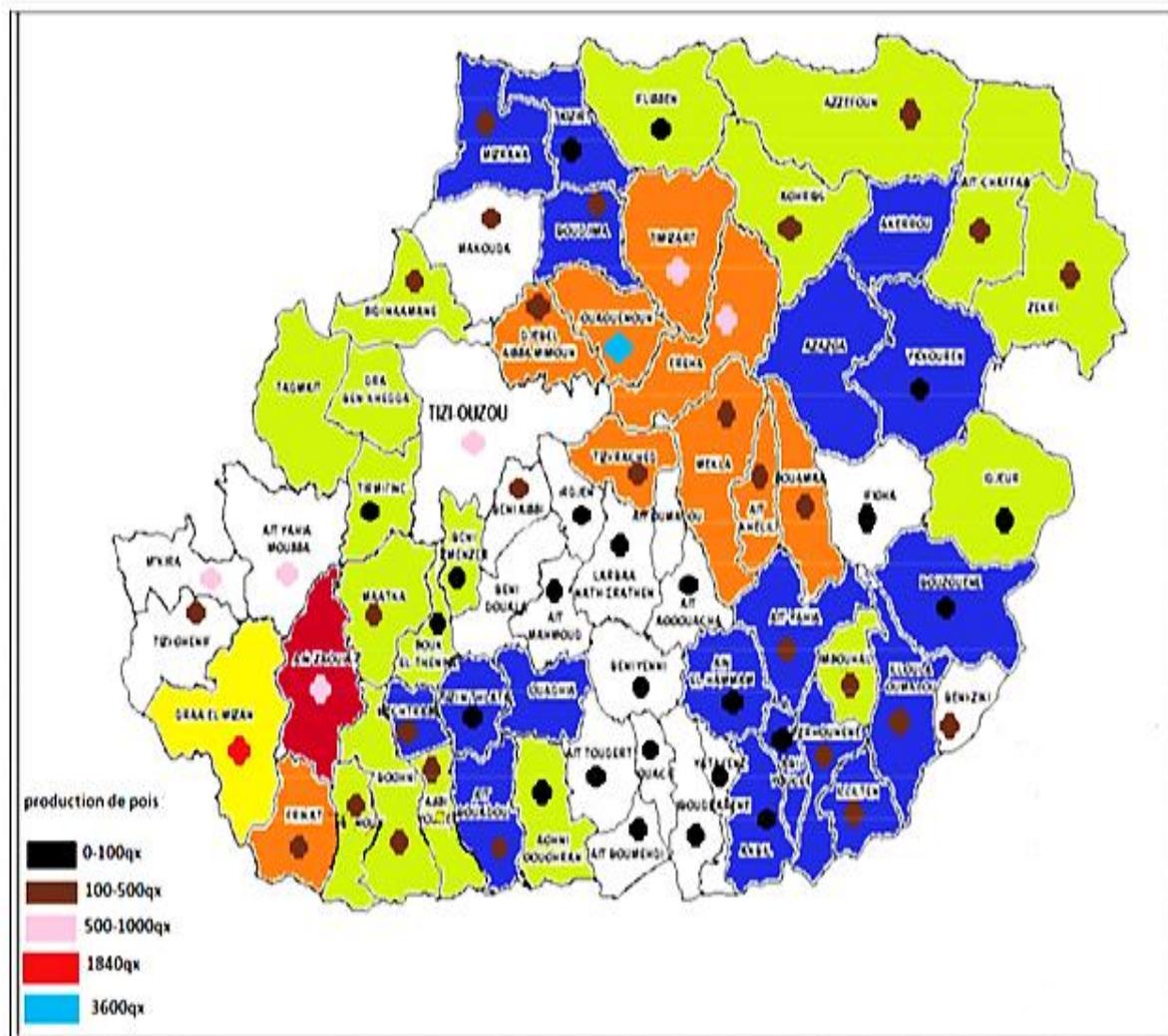


Figure 08 : Zones d'aptitude de la culture du petit pois en Algérie

2.6 Les types d'intérêts :

2.6.1 Intérêt agronomique

Les légumineuses sont des dicotylédones formant une association symbiotique avec les bactéries rhizobium, ce qui leur permet de fixer l'azote atmosphérique dans des nodosités, situées au niveau des racines ou dans la patrie aérienne. Cette capacité leur permet de s'adapter à tous les milieux, ce qui explique leur vaste répartition dans le monde. Ce sont

souvent des espèces pionnières, qui permettent d'enrichir le sol en azote pour favoriser la productivité des terres agricoles. Les légumineuses contribuent également à réduire l'utilisation d'engrais chimiques azotés.

2.6.2 intérêt nutritionnel

Les Fabacées représentent la deuxième famille plus importante d'intérêt alimentaire après les Poacées (céréales), 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). La lentille est par exemple une excellente source de fer (environ 3 mg pour 100g). Elles peuvent ainsi se substituer à la viande dans le cadre d'un régime végétarien. Elles conviennent aussi aux personnes cœliaques et sensibles au gluten. Les légumineuses se prêtent en outre à de multiples préparations : en accompagnement, conserve, purée, potage, farine, flocons, huile, tofu...

2.7 Importance agronomique des légumineuses

Les légumineuses sont des cultures essentielles pour de nombreuses raisons. Elles sont riches en nutriments et ont une teneur élevée en protéines. Cela en fait une source de protéines idéale, en particulier dans les régions où la viande et les produits laitiers ne sont pas accessibles pour des raisons géographiques ou économiques. Les légumineuses ont une faible teneur en matières grasses et une forte teneur en fibres solubles. Elles peuvent ainsi contribuer à faire baisser le cholestérol et à contrôler la glycémie. En raison de ces qualités, elles sont recommandées par les organismes de santé dans le traitement des maladies non transmissibles comme le diabète et les maladies cardiaques. Les légumineuses ont également montré qu'elles aidaient à lutter contre l'obésité. (Figure : 09)



Figure 09 : Composition chimique du pois (PROLEA., 2009).

3 Caractéristiques cytogénétiques

3.1 La cytogénétique :

La cytogénétique est l'étude du matériel génétique au niveau cellulaire ; la génétique moléculaire étudie la structure et la fonction des gènes au niveau moléculaire (ADN).

3.2 Le génome :

Le génome est défini comme un lot haploïde de chromosomes issu d'une espèce diploïde élémentaire et désigné par une lettre majuscule (Cauderon, 1989).

3.3 Caryotypage :

Cette technique implique la mise en culture de lymphocytes du sang périphérique et l'utilisation de mitogènes pour stimuler la transformation de ces lymphocytes en cellules mitotiques actives. Le moment du prélèvement des cellules est déterminé de manière à trouver le plus possible de cellules au stade de la métaphase. Les cellules sont alors fixées, puis étalées sur une lame. Les chromosomes sont colorés à l'aide de divers colorants, généralement le Giemsa (bandes G et bandes R), qui produisent des motifs de bandes sur les chromosomes avec une résolution de 400 à 650 bandes par lot haploïde de chromosomes. Les chromosomes et leurs bandes sont ensuite examinés au microscope à la recherche

d'anomalies, par exemple la perte ou le gain de chromosomes entiers, des translocations de tout un bras (ou d'une partie de celui-ci) d'un chromosome à un autre ou des changements plus subtils dans les motifs des bandes associés à divers syndromes génétiques. Les chromosomes sont photographiés et appariés en vue de leur examen (caryogramme).

• **Les avantages du caryotypage** : sont les suivants :

1. Possibilité de visualiser la totalité du génome.
2. Possibilité de visualiser des cellules ou des chromosomes individuels.

• **Les limites du caryotypage** : sont les suivantes :

1. La résolution est limitée à environ 5 Mb (millions de bases).
2. Il est nécessaire de disposer d'une source de cellules en croissance active.

3.4 Critères d'identification des chromosomes

3.4.1 Critères de la forme

Lorsque la cellule se divise, les fibres du fuseau sont attachées au centromère de leurs chromosomes et tirent les chromatides soeurs aux pôles opposés. Un chromosome à deux centromères est appelé dicentrique, le chromosome acentrique est celui auquel il manque le centromère. Ces deux types de chromosomes sont instables. lors les divisions cellulaires, seuls les chromosomes qui ont un centromère unique sont régulièrement transmis des parents aux générations .

La morphologie des chromosomes est marquée par la position de la constriction primaire ou centromère, on peut distinguer six types morphologiques de chromosomes :

- **Chromosome métacentrique (m)** : le centromère est position médiane, et la valeur du rapport BL/BC est comprise entre 1 et 1.7. On parle de métacentriques sensu stricto (M) lorsque le rapport est exactement égal à 1 et dont le centromère se trouve alors au point médiane.
- **Chromosome submétacentrique (sm)** : le centromère est situé dans la région submédiane et la valeur du rapport BL/BC va de 1.7 à 3.0.
- **Chromosome subtélocentrique (st)** : le centromère est situé dans la région subterminal et le rapport BL/BC varie de 3,0 à 7,0.
- **Chromosome acrocentrique (t)** : le centromère est dans la région terminale et les valeurs du rapport BL/BC vont de 7,0 à l'infini. Si le centromère se trouve au Point terminal strict, on parle de chromosome télocentrique (T) (Khalfallah, 1990).

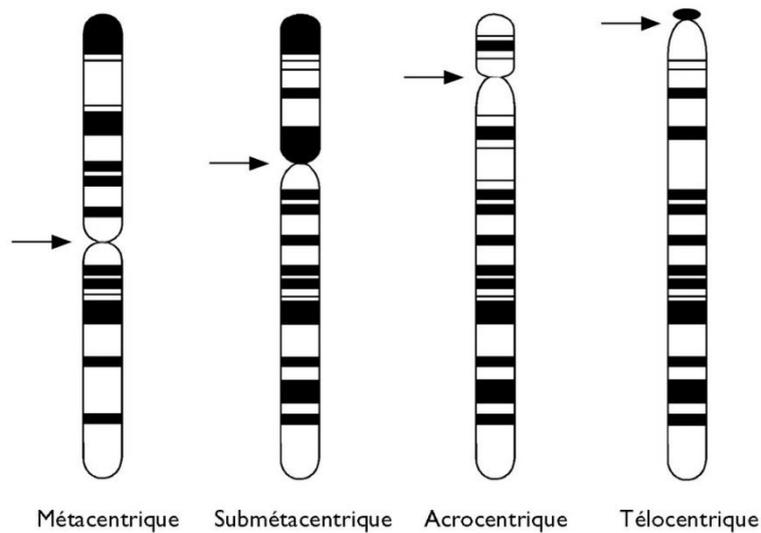


Figure 10 : types morphologiques des chromosomes selon la position du centromère

3.4.2 Critères de la structure

- **Chromatine**

L'ADN de tous chromosomes eucaryotes est associé aux molécules protéiques (les histones et les non histones) dans un agrégat stable ordonnée appelée **chromatine** (Harti, 1994). Il existe deux grands types de chromatines :

L'euchromatine et l'hétérochromatine, l'une différant de l'autre par son rythme réplication et son degré de condensation.

- **Hétérochromatine** : Séquence d'ADN non codantes
- **Euchromatine** : Séquences d'ADN codantes

- **Hétérochromatine**

L'hétérochromatine (riche en bases CG) correspondant à des séquences d'ADN hautement répétées (Mattei et Luciani J, 2003) (figure 11).

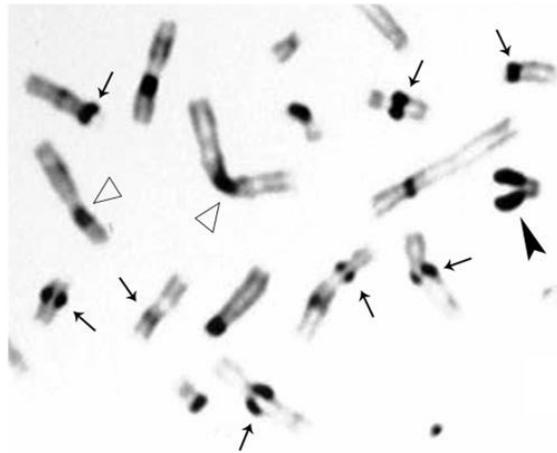


Figure 11 : plaque métaphasique marquée par les bandes C (en noir)
Représentant l'hétérochromatine

L'hétérochromatine est divisées en deux partie: l'hétérochromatine constitutive et l'hétérochromatine facultative, qui présentent quelques différences, essentiellement liées à l'ADN qu'elles contiennent présentés dans le tableau suivant (Hammouda, 2013).

Tableau 01 : Représentation les deux formes de l'hétérochromatine.

HC Constitutive	HC F facultative
Stable	Réversible
Contient de l'ADN satellite	Enrichie en séquences LINES
Polymorphisme +	Polymorphisme -
Bandes C+	Bandes C-

Notons que l'hétérochromatine constitutive est située à proximité du centromère, télomère et à proximité des NOR, En effet l'hétérochromatine joue un rôle tout à fait essentiel dans l'adaptation et l'évolution des espèces végétales ainsi que dans l'organisation et la fonction du génome et déroulement de la méiose (attraction des homologues, régulation du Crossing-over, formation des chiasmata) (Sijak-yacovlev et Cartierd, 1986 ; Mattei et Luciani, 2003).

- **Chromosome B :**

Les chromosomes surnuméraires ou les chromosomes B sont des extras éléments, qui donnent lieu à un polymorphisme numérique des chromosomes dans des centaines des espèces végétales et animales (**Jones et Rees, 1982**).

3.4.3 Structure moléculaire des chromosomes :

- **L'ADN satellite :** L'ADN satellite représente les plus grandes séquences répétées chez les eucaryotes.
- **L'ADN satellite I** riche en séquences A-T (Adénosine-Thymine) localisée dans les régions centromériques des chromosomes, contenant peu de gènes et formée principalement de séquences répétées dans de larges régions.
- **L'ADN satellite II et III** sont aussi riches en A-T et en séquences G-C (Guanine-Cytosine) proche des télomères des chromosomes (**Appels et al, 1978; Bedbrook et al, 1981**).
-

3.4.4 Structures chromosomiques spécialisées :

Tous les chromosomes d'eucaryotes contiennent 2 zones distinctes, il s'agit de :

- **Les centromères :** sont les sites où se fixe le fuseau durant la division cellulaire et l'existence de centromères fonctionnels est indispensable à ce processus.
- **Les télomères :** Les télomères ne sont pas uniquement les extrémités des chromosomes et des molécules d'ADN, mais des structures spécialisées. Qui contiennent de multiples répétitions de séquences simples et courtes d'ADN. Chez l'homme la séquence répétée est 5'TTAGGG3' (250-500 copies). Des protéines spécifiques fixent la région télomérique et on pense que les structures nucléoprotéiques résultantes évitent la recombinaison entre les extrémités chromosomiques.

La longueur des télomères est maintenue constante par une enzyme télomérase, une protéine contenant un ARN complémentaire de l'ADN répété des télomères qui agit comme matrice pour l'élongation du télomère. Les rôles des télomères sont:

- Protection des chromosomes de l'action exonucléases,
- Empêchent la fusion des chromosomes,
- Facilitent la réplication des télomères .

- **Origine de réplication :**

Chez les procaryotes, les chromosomes consistent en une unique molécule d'ADN, qui est généralement circulaire. Chaque chromosome possède une unique origine de réplication.

3.5 Les techniques de banding

Différentes méthodes de banding chromosomique ont été proposées depuis 1968 (Caspersson et al.). Elles constituent un nouvel outil d'analyse structurale des chromosomes de par le simple fait qu'elles établissent l'existence de différents types de chromatine (cf. Stack et al. 1974). Elles peuvent également aider à l'identification des chromosomes, soit en complément des caractères de morphologie classiques (longueur, position du centromère) soit par la seule diversification apportée entre les chromosomes d'un stock par le nombre, la dimension et la position des bandes.

i. Les bandes G : Les chromosomes sont traités à la trypsine (enzyme) puis colorés au Giemsa.

Ils sont ensuite observés au microscope optique ordinaire. Les résultats sont Des bandes sombres correspondant aux bandes fluorescentes et bandes claires aux bandes non Fluorescentes.

ii. Les bandes R (Reverse) : Les chromosomes sont traités par la chaleur puis colorés au Giemsa. Les bandes obtenues sont inverses par rapport aux deux techniques précédentes, elle colore ainsi les régions riches en Cytosine et Guanine.

iii. Les bandes Q : Ce sont les bandes fluorescentes à la quinacrine, l'observation se fait avec un microscope à rayons UV. Il apparaît une alternance de bandes fluorescentes et de bandes non fluorescentes. Le banding Q colore les régions riches en Adénine et Thymine.

Les bandes C : (Centromère) : C'est une technique qui colore surtout les centromères et la partie distale du chromosome Y.

iv. Les bandes N : Cette méthode a révélé des bandes situées au niveau de constriction secondaire des chromosomes nucléolaire.

Chapitre II : *Matériel et méthode*

Matériel et méthode

Matériel végétal

La variété Séfrou appartenant à l'espèce *Pisum sativum* ($2n=2x=14$), nous à été fournis par le CCLS d'el khroub wilaya de Constantine, et c'est une variété très cultivée en Algérie et est destinée à l'alimentation de bétail (figure 12).

Tableau. 02 : Liste des variétés introduites dans une étude cytogénétique.

Variété	Garniture chromosomique	Source	Origine	Caractéristiques
Séfrou	$2n=2x=14$	CCLS	Algérie	Pois potager à grain ronds



Figure 12 : les graines de la variété Séfrou de l'espèce *Pisum sativum*

4 Etapes préliminaires

- Germination :

Les graines du *Pisum sativum* L. sont scarifiées et ensemencées, après leur désinfection dans l'eau de javel diluée à 50% pendant 5-7 minutes. Par la suite, les graines sont imbibées pendant 24h pour activer la germination. Par la suite, les graines sont mises à germer dans des boîtes de pétri, tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillé à la lumière et à température ambiante.

- **Prélèvement :**

Nous avons déterminés la période durant laquelle le coefficient mitotique été le plus élevé, il est situé entre 24h et 48h pour notre matériel où les racines atteignent une longueur de 0,5 à 1cm

- **Prétraitement :**

Il se fait par trempage des tissus en division dans un agent mitoclassique, cette opération vise un triple objectif :

- a- Bloquer les divisions mitotiques au stade métaphase.
- b- Contacter les chromosomes.

Il existe plusieurs agents mitoclassique tel que :

- La colchicine.
- α a-bromonaphtalène.
- 8-hydroxyquinoléine.

Nous avons effectués un prétraitement à la 8- hydroxy quinoléine, La durée de ce prétraitement est 17h à 18h.

- **Fixation :**

Le fixateur détruit toute vie cellulaire, ils doivent avoir une action rapide pour bloquer toute évolution et des divisions cellulaires et permettent de conserver l'intégrité structurale des chromosomes. La fixation s'effectue dans une solution éthanol acide acétique (3v-1v) pendant 48h au réfrigérateur.

- **Stockage :** les pointes racinaires sont conservées au réfrigérateur à -96°C.

5 Technique du C-banding

Nous avons appliqué la méthode décrite par Gaffarzadeh-Namazi et al. (2007) avec des modifications introduites dans les étapes dénaturation et renaturation de l'ADN (Hammouda , 2013) La technique de C-banding comporte les étapes suivantes :

➤ La délamélation

Le décollement des lamelles se fait par l'azote liquide à (-196°).

➤ Préparation des solutions

La baryte 5%: faire dissoudre 18,04 g dans 200 ml d'eau distillée.

2×SSC : faire dissoudre 3,508 g et 1,76 g de Na Cl et de Tris respectivement dans 200 ml d'eau distillée, le PH est ajusté à 7 avec l'HCl 0,2 m.

Sorensen phosphaté : composé de deux solution A et B avec PH à 7 :

- **Solution A :** dissoudre 0,63 g de KH_2PO_4 dans 30 ml d'eau distillée.
- **Solution B :** dissoudre 1,17 g de Na_2HPO_4 dans 150 ml d'eau distillée.

13 ml de la solution A sont ajoutés à 87,2 ml de solution B puis ajustés jusqu'à 200 ml avec l'eau distillée.

➤ Hydrolyse :

Les lames sont plongées dans l'acide acétique 45% pendant 20 minutes à 60°C.

➤ Rinçage :

Les préparations sont rincées à l'eau distillée 5+5+5 minutes.

➤ Dénaturation de l'ADN :

Cette étape est nécessaire pour briser les deux brins d'ADN. , et ce fait à la baryte 8 fois hydratée 5% pendant 10 minutes.

➤ Rinçage :

Les préparations sont rincées à l'eau de robinet pendant une heure.

➤ Renaturation de l'ADN :

Cette étape est nécessaire pour rétablir les deux brins d'ADN. Elle s'effectue dans la solution tampon 2×SSC en ajustant le PH à 7 pendant 50 minutes à 60°C.

➤ Coloration :

Les préparations sont colorées au Giemsa, solution Sorensen tampon phosphate PH à 7.

- **Montage :** les lames sont laissées sécher toute une nuit, puis sont fixées définitivement avec un liquide de montage le « Depex ».
- **Observation et photographie :** l'observation et la prise des photos de meilleures plaques métaphasiques s'effectuent sous l'objectif 63 d'une photo microscope de type LEICA DM 400



Figure 13 : microscope de type LEICA DM 400

Chapitre III : *Résultats et discussion*

Résultats et discussion

1 Résultats

Nous avons pu identifier le génome de l'espèce *Pisum sativum*, les bandes hétérochromatiques existent sous trois formes : télomériques, centromériques et intercalaires (péricentriques). Le nombre de bandes, leur intensité et leur emplacement sur les chromosomes, diffèrent au sein de la variété.

En effet, la majorité des chromosomes du génome présentent d'importantes bandes hétérochromatiques.

D'une manière générale, l'hétérochromatine est centromérique, ce qui est une caractéristique de nombreuses espèces à petits et moyens chromosomes.

Les résultats montrent des variations importantes dans la taille des chromosomes, la localisation et le nombre de satellites. En effet, le caryotype est constitué de quatre paires chromosomiques métacentriques (m) et trois paires submétacentriques (Sm).

La formule caryologique du *Pisum sativum* est définie comme:

$$n=x=7=4m+3Sm.$$

Distribution de l'hétérochromatine

La distribution et la caractérisation de l'hétérochromatine sont analysées et comparées par les bandes C (Figure 14).

- **Chromosome 01 :**

Ce chromosome présente de très fines bandes intercalaires (bras court) et télomériques (bras long).

- **Chromosome 02 :**

Ce chromosome présente d'épaisses et sombres bandes centromériques, intercalaires et télomériques (bras court et bras long).

- **Chromosomes 03 :**

Ce chromosome présente de très fines bandes intercalaires e (bras court) et intercalaires, télomériques (bras long).

- **Chromosome 04 :**

Ce chromosome présente d'épaisses et sombres bandes centromériques, intercalaires et télomériques (bras court) et centromériques, intercalaires (bras long).

- **Chromosome 05 :**

Ce chromosome présente d'épaisses et sombres bandes centromériques , intercalaires et télomériques (bras court et bras long) .

- **Chromosome 06 :**

Ce chromosome présente d'épaisses et sombres bandes centromériques , intercalaires et télomériques (bras court) . et de très fines bandes intercalaires (bras court)

- **Chromosome 07 :**

Ce chromosome présente d'épaisses et sombres bandes centromériques , intercalaires et télomériques (bras court) et centromériques , intercalaires (bras long) .

Notons, aussi, les présences de deux paires de satellites situés sur le bras court du chromosome 3 et sur le bras long du chromosome 6

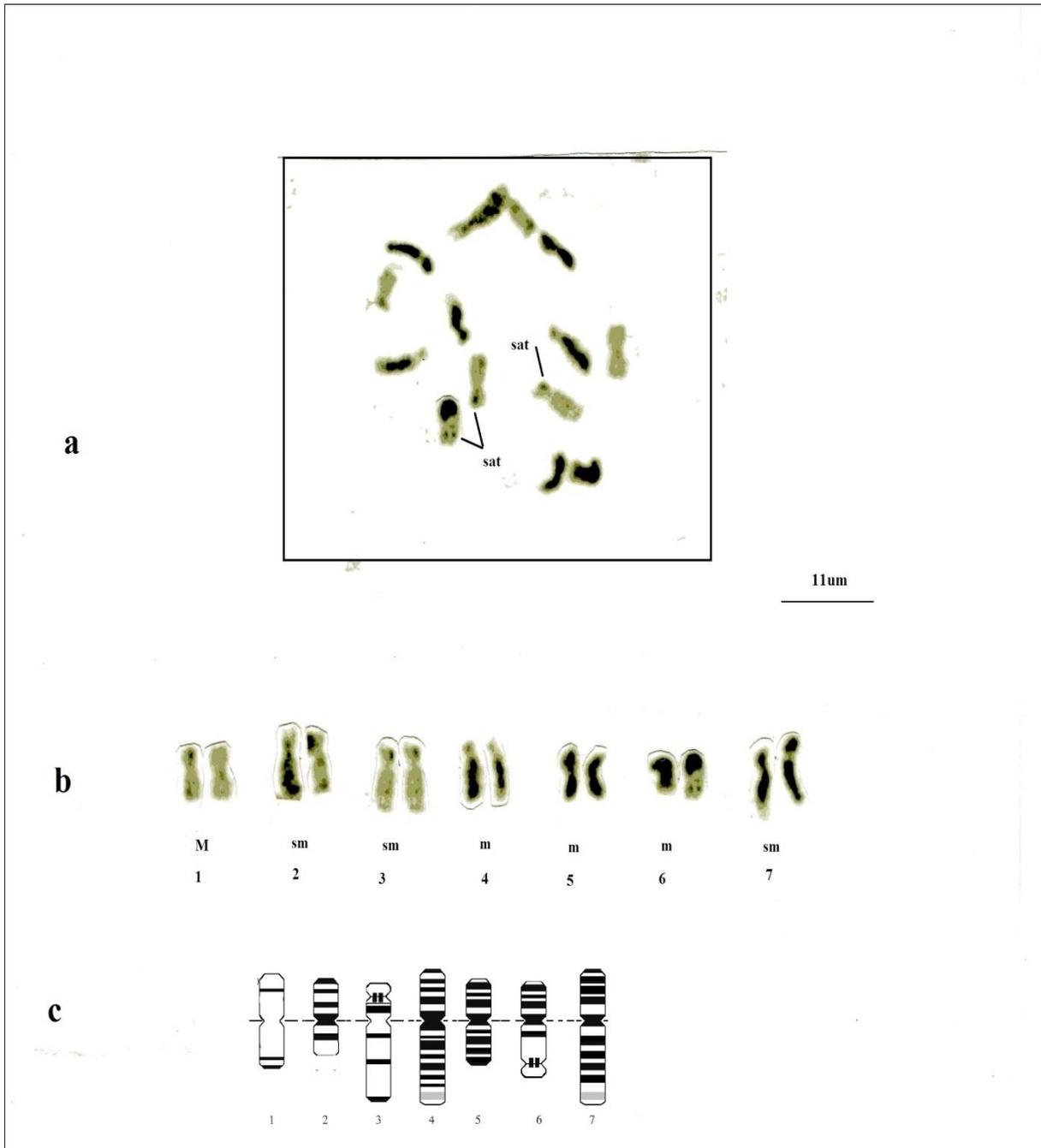


Figure 14 : Caryotype en (C-banding) de l'espèce *Pisum sativum* (variété Séfrou).

a-Plaqué métaphasique.

b-Caryogramme.

c- Idiogramme. Les bandes C colorées en noirs montrent l'hétérochromatine et les deux points présentent les satellites (le bras court) du chromosome 3 et le bras long du chromosome5., régions de localisations des gènes ribosomiques..

2 Discussion

Suite aux travaux réalisés par Boussrief A. et Zekri M. (2021) sur le dénombrement chromosomique de la variété (Séfrou), l'étude a conduit au marquage et différenciation structurale des chromosomes.

L'analyse de la distribution de l'hétérochromatine constitutive (séquences d'ADN hautement répétées non codantes riche en bases CG) a révélé qu'elle se trouve sous forme d'épaisses, sombres et de fines bandes C sur les deux bras de tous les chromosomes du génome de l'espèce *Pisum sativum*. Chaque chromosome est identifié individuellement. Les chromosomes 4, 5, 6 et 7 montrent d'épaisses bandes hétérochromatiques

L'analyse de la distribution des bandes C le long des chromosomes dans le caryotype de la variété Sefrou nous a permis de déterminer les sept paires homologues.

Les génomes de nombreuses espèces végétales sont étudiés en utilisant le C- banding. En se basant sur la répartition des régions hétérochromatiques tout au long des chromosomes, il est possible d'identifier les chromosomes, de détecter leurs réarrangements et de rendre la cartographie chromosomique plus précise, ainsi que d'évaluer la proximité taxonomique de différentes espèces et de déterminer leurs relations phylogénétiques (Badaeva, E.D et al 2002), (Samatadze et al)

Si nous confrontons nos résultats à ceux des auteurs (**Samatadze et al, 2002 M.m Parça-fontes et al ,2014**) nous remarquons des variations dans la forme et la structure des chromosomes. D'après ces auteurs, les chromosomes, 6 et 7 sont métacentriques, et Les chromosomes 2, 3 et 4 : sont des types sub-métacentriques, par contre le chromosome 5 est définie comme un chromosome acrocentrique. Alors que, dans notre cas, seulement deux types chromosomiques observés, qui sont métacentriques (les chromosomes 1, 4 , 5 et 6) et submétacentriques (les chromosomes 2, 3 et 7).

Du point de vue structure chromosomique, nos résultats sont presque similaires à ceux des auteurs (**Samatadze et al, 2002 M.m Parça-fontes et al ,2014**), qui montrent une richesse moyenne en hétérochromatine. Les chromosomes 1 et 2 et 3 marquent des constriction secondaires et le chromosome 6 présente un satellite. Alors dans notre cas deux satellites sur les chromosomes 3 (bras court) et le chromosome 6 (bras long), ces chromosomes sont considérés comme des **chromosomes marqueurs**.

Les constructions secondaires associées aux régions organisatrices nucléolaires (N.O.R), apparaissent clairement et sont spécifiques aux chromosomes marqueurs du génome. Rappelons que les satellites sont des marqueurs génétiques portés par des chromosomes marqueurs.

Les NOR actifs peuvent être détectés soit par la présence de constriction secondaires et/ou de satellites, soit par N-banding, qui détecte les protéines associées aux régions NOR actives (**Hammouda, 2021**).

Les constriction secondaires sont les sites d'origine des nucléoles (NORs, régions organisatrices nucléolaires) abritant jusqu'à des milliers de réseaux disposés en tandem de gènes d'ARN ribosomique (ARNr) 35S (18S-5.8S-25/28S) (**Volkov et al. 2004**).

Les résultats obtenus, nous a permis d'étudier deux caractères chez *Pisum sativum* (tableau 3).

Tableau 03 : études des caractères observés chez *Pisum sativum*.

Variété	Caractère	
	Taux d'hétérochromatine	Satellites
Séfrou	60 %	2Chromosome 3 (B.C) Chromosome 6 (B.L)

Conclusion et perspectives

L'étude cytogénétique que nous avons réalisée, est ceci dans le but d'élargir nos connaissances en caryo morphologie sur cette espèce par l'utilisation de la technique de C-banding pour la détermination du taux d'hétérochromatine de la variété Séfrou de l'espèce *Pisum sativum*.

Dans le protocole nous avons confirmé a partir cette technique. que :

Le nombre de base chez le *Pisum sativum* .L est toujours le même $2n=2x=14$ ($n=7$).

Le caryotype de cette variété est symétrique :

- Quatre paires métacentriques
- Trois paire submétacentrique sont détectés
- L'absence des chromosomes B.

L'analyse chromosomique de la variété Séfrou de petit pois a montré la présence des bandes hétérochromatiques épaisses, intenses et fines , présence des satellites (la 3ème et la 6ème paire), ce qui se traduit par une adaptation et une résistance face aux facteurs environnementale défavorable ce qui présente un intérêt économique et agronomique.

En perspectives, nous souhaiterons d'envisager d'autres techniques modernes et moléculaires tel que :

- Marquage au Fluorochrome-banding, qui permet de mesurer l'effet de l'hétérochromatine sur la quantité d'ADN.
- Marquage au N-banding pour localiser les régions organisatrices nucléolaires (N.O.R) qui codent pour les gènes ribosomiques.
- L'hybridation in situ (F.I.S.H) pour localiser les gènes ribosomiaux et mettre en évidence des mutations de type translocation ou inversion.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. ACMG Practice Guidelines: Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. Manning, M et Hudgins, L. Genetics in Medicine Volume 12, Numéro 11, 742 – 745, Novembre 2010.
2. Akan H., Tatlidil S., Biçakci A., (2005). Pollen Morphology of Astragalus L. section Alopecuroidei DC. (Fabaceae) in Turkey. Int J Bot, 1: 28-50.
3. Al Ghamadi F., Osman A.K., Guetat A., (2013). Contributions to the morphology of genus Astragalus L. (Fabaceae) and its Taxonomic Implications. Asian J Pl Sci, 12: 176-189.
4. Anthony Griffiths J.F., David Suzuki T., Chrystelle S., (2002) . Introduction à l'analyse génétique .
5. Badaeva, E.D., Amosova, A.V., and Muravenko, O.V., Plant. Syst. Evol., (2002), vol. 231, pp. 163–190.
6. Badaeva, E.D., Amosova, A.V., and Muravenko, O.V., Plant. Syst. Evol., (2002), vol. 231, pp. 163–190.
7. Bazile D. et Coulibaly E.M., (2011). Droit des agriculteurs sur leurs semences : le long chemin entre la conservation (*in et ex situ*. *Grain de sel*) n°52-53 : 15-17.
8. Bhattacharya, C. and N. Bhattacharya, (2003). Wide variation in mitotic
9. Boyeldieu, J., (1991). Produire des grains oléagineux et protéagineux. Ed Tec & Doc Lavoisier-Paris. 256 p.
10. Cadot V. et Le Clerc V., (2010). Etude de la diversité des variétés inscrites au catalogue français des espèces agricole cultivées de 1950 à nos jours : exemple du pois et du maïs.(*Le sélectionneur Français*) vol 61 : 15-31.
11. chromosome number in one local type of *Pisum sativum* L.
12. Coming D.E., (1978). Mechanisms of chromosome banding and its implications for chromosome structure. Ann Rev Genet, 12: 25-46.
13. Cours biotechnologie BA université setif .
14. Cousin R., (1996). Le pois variabilité, objectif de sélection. Inra station de génétique et d'amélioration des plantes-versailles. 6p. Disponible sur : http://www7.inra.fr/lecourrier/wp-content/.../Sauve-qui-peut-n°8_Cousin.pdf
15. CPS., (2009). étude de cas pour une espèce sauvage menacée apparentée à une espèce cultivée. Commission Suisse pour la Conservation des Plantes Cultivées. *Pisum sativum* subsp. *biflorum* 14p.

•

16. Dane F., Aksoy O.D, Yılmaz G., (2007). Karyological and palynological studies on *Astragalus hamosus* and *A. glycyphyllos* in Turkey. *Phytologia Balcanica*, 13:387-391.
17. Dart S., Kron P., Mable B.K., (2004). Characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flow cytometry. *Can J Bot*, 82: 185-197.
18. Derenzini M., (2000). The AgNORs .*Micron*, 31: 117-120.
19. Deutsch M., Long M., (1999). Intron-exon structure of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acid Res*, 27: 3219-3228.
20. Dinç M., Aytaç Z., Dogu S., (2013). A new species of *Astragalus* (Fabaceae) from Turkey. *Turk J Bot*, 37: 841-846.
21. Doré C. et Varoquaux F., (2006). Histoire et amélioration de cinquante plantes cultivées. Ed INRA-Quae. 840p.
22. Dorkeld F., (1994). Un modèle objet dédié à la cartographie comparée des génomes de mammifères. Université Claude Bernard. Thèse de Doctorat. Lyon
23. Doyle, J.J., J.L. Doyle, J.A. Ballenger, E.E. Dickson, T. Kajita and H. Ohashi, (1997). A phylogeny of the chloroplast gene *RbcL* in the Leguminosae: Taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American J. Bot.*, 84: 541–54
24. E. Samatadze, D.A. Zelenina, N.G. Shostak, A.A. Volkov, K.V. Popov, O.V. Rachinskaya, A.Yu. Borisov, I.A. Tihonovich, A.V. Zelenin, O.V. Muravenko, (2008), *Genetika*, 2008, Vol. 44, No. 12, pp. 1644–1651.
25. Ekici M., Aytaç Z., Akan H., Pinar M., (2008). A new species of *Astragalus* L. (section *Onobrychoidei* DC.: Fabaceae) from Turkey. *Bot J Linn Soc*, 157: 741-747.
26. Ellis, T.H.N., Turner, L., and Hellens, R.P., *Genetics*, 1992, vol. 130, pp. 649-663.
27. Errico, A., C. Conicella, R. Ercolano and T.D. Martino, (1996). Chromosome reconstructions in *Pisum sativum* through interspecific hybridization with *P. fulvum*. *J. Genet. Breed.*, 50: 309–13
28. FAO, (2006) Ressources phytogénétiques. Ne pas les utiliser, c'est les perdre. 2p. http://www.fao.org/fileadmin/templates/nr/documents/CGRFA/factsheets_plant_fr.pdf
29. FAO, (2007). Résumé du chapitre 1 de la FAO : l'état des ressources génétiques mondiales des plantes pour l'alimentation et l'agriculture. 14p. http://www.semencespaysannes.org/bdf/docs/resume_du_chapitre_1.pdf
30. FAO (2014). Normes applicables aux banques de gènes : pour les ressources génétiques, pour l'alimentation et l'agriculture. 182p. <http://www.fao.org/3/a-i3704f.pdf>
31. FAO., (2004). Variétés de semences appropriées pour les agriculteurs à petite échelle. 44p. <http://www.fao.org/3/a-i3768f.pdf>

⋮

32. Fuchs, J., M. Kuhne and I. Schubert, (1998). Assignment of linkage groups to pea chromosomes after karyotyping and gene mapping by fluorescent in situ hybridization. *Chromosoma*, 107: 272–6
33. Gari A.T., (2015). Pea weevil (*Bruchus pisorum* L.) resistance and Genetic Diversity in Field Pea (*Pisum sativum* L.). Doctoral Thesis. Swedish University of Agricultural Sciences. 38 p.
34. Gaubatz J.W., Cutler R.G., (1990). Mouse satellite DNA is transcribed in senescent cardiac muscle. *J Biol Chem*, 265: 17753-17758.
35. Godelle B., Cartier D., Marie D., Brown S.C., Siljak-Yakovlev S., (1993). Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry*, 14: 618-626.
36. Grewal S.L., Elgin S.C., (2002). Heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure. *Curr Opin Genet Dev*, 12:178-87.
37. Grewal S.L., Moazed D., (2003). Heterochromatin and epigenetic control of gene expression. *Science*, 301:798-802.
38. Hadjiolov A.A., (1985). *The Nucleolus and Ribosome Biogenesis*. New York Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp 1-268.
39. Hall, K.J., Parken, J.S., and Ellis, T.H.N., *Genome*, (1997), vol. 40, pp. 744–754..
40. Harry M. (2001). *Génétique moléculaire et évolutive*. Editions Maloine, Paris.
41. Heitz E., (1928). Das heterochromatin der moose. *I Jahrb Wiss Botanik*, 69: 762-818.
42. Hernandez-Verdun D.,(2004). Behavior of the nucleolus during mitosis. *Kluwer Academic*, Dordrecht, pp 41-57. Wallrath L.,(1998). Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev*, 8: 147-153.
43. Hernandez-Verdun D., (2004). Behavior of the nucleolus during mitosis. *Kluwer Academic*, Dordrecht, pp 41-57.
44. Heslop-Harrison J.S.(1991). The molecular cytogenetics of plants. *Commentary. J Cell Sci*, 100: 15-21.
45. Hofer, J.M.I. and T.H.N. Ellis, (1998). The genetic control of patterning in pea leaves. *Trends in Plant Sci.*, 3: 439–44
46. Hubel H.R., (1985). Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol*, 60: 285-294.
47. INA-PG,(2003). Pois protéagineux–cours en ligne. Institut National Agronomique Paris-Grignon. 18 p. Disponible sur : <https://tice.agroparistech.fr/coursenligne/courses/.../document/.../pois.pdf>

•

48. Jilal A.,(2011). Assessment of genetically diverse international barley germplasm for development of food product applications. PhD. Thesis. Southern Cross University, Lismore, NSW.
49. Jiménez R., Burgos M., Diaz Guardia R.,(1988) A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 60: 125-127.
50. John B., (1990). Meiosis. Cambridge University Press, Cambridge.
51. Joly P.B. et Trommetter M.,(1994). Coservation du patrimoine génétique : aspect économiques et institutionnels. *Genet Sel Evol*, Vol 26 : 331-342.
52. Kamaté K., Brown S.C., Durand P., Bureau M.J., Nay de D., Trinh H.T.,(2001). Nuclear DNA content and base composition in 28 taxa of Musa. *Genome*, 44:622-627.
53. King M., (1991). The evolution of the heterochromatin in the amphibian genome. In: D.M. Green and S.K. Amph Cytog Evol: 359-391.
54. Kiss T., Darzacq X., (2001). Plus d'un siècle après sa découverte, un nouveau regard sur le Nucléole. *Médecine et Sciences*, 17: 730-6.
55. Koirala S., (2018). Characteristics and economic importance of family papilionaceae (leguminosae). *The science info*. <http://thescienceinfo.com/characteristics-and-economic-importance-of-family-papilionaceae-leguminosae/>
56. Kremer A., (2000). Changements climatiques et diversité génétique. *Rev. For.Fr.LII*-numéro spécial. 91-98.
57. Lagarde M.F., et Marchenay P., (1985). Les variétés locales de plantes cultivées dans le parc national des Ecrins : prospection, collecte et conservation. Laboratoire d'ethnobotanique-CNRS. 236p.
58. Lamm, R., *Hereditas*, (1981), vol. 94, pp. 45–52. l'analyse génétique. Ed De Boeck Université. Paris. P 87
59. Leitch I.J., Bennet M.D., (2005). Plant Genome Size Research: A Field In Focus *Annals Bot*, 95: 1-6.
60. Leitch I.J., Chase M.W., Bennett M.D., (1998). Phylogenetic analysis of DNA C values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Ann Bot*, 82: 85-94.
61. Lyu Fuchzhun, Marchenko, A.N., and Gostimskii, S.A., *Dokl. Akad. Nauk*, (1997), vol. 357, pp. 713–716.
62. M.m Parça-fontes et al ,(2014). Karyotype revised of *Pisum sativum* using chromosomal DNA amount

⋮

63. Maxted N. and Ambrose M., (2001). Conservation, diversity and use of Mediterranean legumes. In Maxted N. and Bennet S.J., 2001. Plant genetic resources of legumes in the Mediterranean. Ed klumer Academic Publishers. 389p.
64. Meddour R. et Derridj A., (2007). Les banques de semences : une stratégie de conservation *ex situ* des plantes. *Revue campus* n° 5 : 71-79.
65. Moule C., (1972). Phytotechnie spéciale III : Plantes sarclées et diverses. Ed., la Maison rustique-Paris. 129 p.
66. Muehlbauer F.J. et Tullu A., (1997). *Pisum sativum*. New crop factsheet. <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheets/pea.html>
67. Mukherjee, S. and A.K. Sharma, (1987). Cryptic structural differences at insertion level of *Pisum sativum*. *Cytologia*, 52: 793–800
68. Muravenko, O.V., Bolsheva, N.L., Yurkevich, O.Yu., et al., Genome Study in Species of Six *Linum* L. Sections Using Chromosome and Molecular Markers, *Khromosomy i evolyutsiya (Chromosomes and Evolution)*, Collection of Articles of Symposium in Memoriam of G.A. Levitskiy., St. Petersburg, (2008), pp. 75-77.
69. Narkhede, M.N., P.A. Shastrakar and L.D. Meshram, (1987). Karyotypic analysis in some varieties of *Pisum sativum*. *PKV Res. J.*, 11: 72–5
70. Neumann, P., M. Lysak, J. Dolezeland and J. Macas, (1998). Isolation of chromosomes from *Pisum sativum* L. hairy root cultures and their analysis by flow cytometry. *Plant Sci. Lim.*, 137: 205–15
71. Obermayer R., Greilhuber J., (2006). Cryptopolyploidy revisited: the case of *Vinca* (Apocynaceae). *Plant Syst Evol*, 256: 201-208.
72. Ouafi L., Alane F., Rahal-Bouziane H., Abdelguerfi A., (2016). Agro-morphological diversity within field pea (*Pisum sativum* L.) genotypes. *African Journal of Agricultural Research* 11(40): 4039-4047.
73. Perveen A., Qaiser M., (1998). Pollen Flora of Pakistan - VIII Leguminosae (Subfamily: Papilionoideae). *Tur J Bot*, 22: 73 - 91.
74. Pesic V., Djordjevic R., Kadhum E., Jankovic P., Misic D., (2013). Influence of the *afila* gene on grain yield in pea (*Pisum sativum* L.). *Bulgarian Journal of agricultural science* 19 (2) : 186-193.
75. Plucknett D.L., Smith N.J.H., Williams J.T., Anishetty N.M., (1990). Banques de gènes et alimentation mondiale. Ed INRA-Economica. 228p.
76. Quezel P. et Santa S., (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. CNRS. 1090p.

•

77. Ramirez - Morillo I.M., Brown G.K., (2001). The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Syst Bot*, 26: 722-726
78. Raska I., Koberna K., Malinsky J., Fidlerova H., Masata M., (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biol Cell*, 96: 579-594.
79. *Res. Hisar.*, 25: 116–8
80. Rudert F., Bronner S., Garnier J.M., Dolle P., (1995). Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development. *Mamm. Genome*, 6: 76-83
81. Samatadze et al, (2002) identification of the Pea (*Pisum sativum* L.) Genome Chromosomes Using C-Banding Analysis.
82. Samatadze, D.A. Zelenina, N.G. Shostak, A.A. Volkov, K.V. Popov, O.V. Rachinskaya, A.Yu. Borisov, I.A. Tihonovich, A.V. Zelenin, O.V. Muravenko, (2008), *Genetika*, 2008, Vol. 44, No. 12, pp. 1644–1651. 2002. Identification of pea (*Pisum sativum* L.) genome chromosome
83. Samatadze, T.E., Muravenko, O.V., and Popov, K.V., *Caryologia*, vol. 54, no. 4, pp. 299–306.
84. Samatadze, T.E., O.V. Muravenko, A.V. Zelenin and S.A. Gostimskii, Schwarzacher H.G., Wachtler F., (1983). Nucleolus organizer regions and nucleoli. *Hum Genet*, 63: 89-99.
85. Schweizer D., 1976. Reverse fluorescent chromosome banding with Chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
86. Siljak-Yakovlev S., (1986). Etude cytogénétique et palynologique de Compositae endémiques ou reliques de la flore yougoslave. Thèse d'Etat, Université de Paris-Sud.
87. Siljak-Yakovlev S., Peceni S., Muratovic E., Zoldos V., Robin O., Valles J. (2003). Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. *Plant Syst Evol*, 236: 165-173.
88. Sirri V., Roussel P., Hernandez-Verdun D., (2000). In vivo release of mitotic silencing of ribosomal gene transcription does not give rise to precursor ribosomal RNA processing. *J Cell Biol* 148: 259-270.
89. Smykal P., Coyne C.J., Ford R., Redden R., Flavell A.J., Hybl M., Warkentin T. Burstin J., Due G., Ambrose M., Ellis T.H.N., (2008). Effort towards a world pea (*Pisum sativum* L.) germplasm core collection: The case for common markers and data compatibility. *Pisum genetics* 40: 11-14.
90. Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett M.D., Leitch I.J., (2003). Evolution of genome size in the angiosperms. *Am J Bot*, 90: 1596-1603.

:

91. Srarfi Ben Ayed F., Sdiri A., Kharrat M., (2016). Rahma : une nouvelle variété de pois protéagineux inscrite en 2007 dans le catalogue officiel tunisien des obtentions végétales. *Annales de l'INRAT* 89. Numéro spécial innovations. 20-22
92. Suda J., (2004). An employment of flow cytométrie into plant biosystematics. PhD thesis, Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Botany. pp 55.
93. Sumner A.T., (1994). Chromosome Banding and Identification . Methods in Molecular Biology, Vol: 29. Edited by JR Gosden .Humana Press Inc, Totowa, NJ.
94. Tognite F.M., (2013). Implémentation et évaluation du modèle de culture de pois (*Pisum sativum* L.) AFISOL sous la plate-forme logicielle RECORD. Mémoire master UMR. 25p.
95. Torres R.A., Ganal M., Hemleben V., (1990). GC balance in the internal transcribed spacer ITS1 and ITS2 of nuclear ribosomal RNA genes. *J Mol Evol*, 30:170-181.
96. Trebuchet G., Chopinet R., Drouzy J., (1953). Contribution à l'étude des variétés de pois potager cultivés en France. *Annales de l'INRA* n°2 : 47-251. Disponible <http://www.surbiblio.rsp.free.fr/Pdf/InraPois.si.pdf>
97. Trojer P., Reinberg D., (2007). Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell*, 28: 1-13.
98. UNESCO, (1990). La conservation et la gestion de nos ressources génétiques. *Impact* 158 : 107-109.
99. Vavilov N.I., (1949). The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronika botanica* 13: 1-54.
100. Volkov et al. (2004) .The stability of forest biodiversity
101. Williamson D.H., Fennell D.J., (1975). The use of fluorescent DNA-binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. *Methods Cell Biol*, 12: 335-351.
102. Zhimulev I.F., Belyaeva E.S., (2003). Intercalary heterochromatin and genetic silencing. *Bioessays*, 25: 1040-1051.
103. Zlatkovic b et Mikic A., (2010). Distribution and new records of *Pisum sativum* subsp. *Elatius* in Serbia. *Pisum Genetics* vol 42: 15-17.
104. Zohary D., Hopf M., Weis E., (2012). Domestication of plants in the old world. Ed oxford university press. 264p.

Année universitaire : 2021-2022	Présenté par : BENDAIRA Nihad
Identification structurale des chromosomes de l'espèce <i>Pisum sativum</i> L.	
Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie et génomique végétale	
<p>Notre étude porte sur le marquage de l'hétérochromatine correspondant a des séquences d'ADN hautement répétées (riche en bases CG = séquences d'ADN non codantes) des chromosomes de l'espèce <i>Pisum sativum</i> L (variété Séfrou), grace à la technique de coloration différentielle C-banding.</p> <p>Nous avons pu identifier et caractérisé le caryotype de la variété, deux satellites sont mis en évidence sur les chromosomes marqueurs L'analyse structurale de <i>Pisum sativum</i> L ($2n=2x=4m + 3Sm = 14$) a montré un taux moyen d'hétérochromatine chez la variété Séfrou. Egalement, notons la présence des satellites et absence des chromosomes B.</p> <p>Les résultats obtenus confirment l'existence de la relation entre le surcharge en hétérochromatine et l'adaptation du végétal aux conditions défavorables de l'environnement. Notre variété serait bien adaptée aux conditions défavorables.</p>	
Mots-clés : bandes C- chromosomes marqueurs, hétérochromatine <i>Pisum sativum</i> L., satellite	
Laboratoires de recherche : Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales. (Université Frères Mentouri, Constantine 1).	
<p>Encadreur : Mme. HAMMOUDA-BOUSBIA Dounia (Professeur.-UMC Constantine1).</p> <p>Examineur 1 : Mr BAZIZ- Karim (MCA. - UNIV. Hadj LAKHDAR-Batna).</p> <p>Examineur 2 : Mm KHENNAOUI- Amina (MCB. - UMC, Constantine 1).</p>	