

**UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA**

**Faculté des sciences Agro- Vétérinaires**

Département des sciences Agronomique

# **MEMOIRE DE MAGISTER**

Spécialité : Amélioration des productions végétales

## **CARACTERISATION MOLECULAIRE DE QUELQUES ESPECES LEGUMIERES**

Par

**BENAISSA Keltoum**

Devant le jury composé de :

M. BENMOUSSA	Professeur	U.S.D de Blida	Président
M. BENCHABANE	M.C	U.S.D de Blida	Examineur
A. AISSAT	M.C	U.S.D de Blida	Examineur
F.Z. CHAOUCH	M.A.C.C	U.S.D de Blida	Examinatrice
A. BOUTEKRABT	Professeur	U.S.D de Blida	Rapporteur

Blida, 07 Mai 2008



## RESUME

Le présent travail représente un modèle des étapes suivies pour la caractérisation moléculaire d'une plante et de l'amélioration de son pouvoir génétique par la transgénèse. La plante utilisée dans notre étude est l'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*), la plante modèle des espèces végétales en génétique, caractérisée par la facilité de manipulation au laboratoire afin d'estimer les rendements horaires et en produits (ADN et ARN isolés et les plantes transgéniques) pour une future application aux espèces légumières à intérêt économique. Durant cette étude, nous sommes passée par les étapes suivantes à l'isolement de son ADN et ARN génomique, l'estimation par deux méthodes l'électrophorèse et spectrophotomètre ; d'optimiser les conditions d'amplification de l'ADN génomique *in vitro*. Nous avons procédé à induire une transformation génétique par insertion ; dans l'ADN-T de plasmide bactérien d'un chimère portant le promoteur de gène HsP<sub>90</sub> codant les ATP afin d'étudier son expression sous le contrôle de gène reporteur GUS dans les tissus des plantes *in situ*.

### Mots clés :

Espèces légumières, *Arabidopsis thaliana*, ADN, ARN, amplification, gène, transformation génétique

## ABSTRACT

This work presents the steps followed during a plant molecular characterization and genetic transformation. We used during this study as plant the mouse ears (*Arabidopsis thaliana*) chosen as a model plant for the genetics research of higher plants, easier manipulation in the laboratory, to get a time and yield's estimation of nucleic acid and transformed plants those manipulations which can be applied in the future to the principal market species. During this first step we did a genomic DNA and RNA isolation, we quantified and qualified the extracts using two methods: the electrophoresis and the spectrophotometer then, we have done a condition's optimisation of DNA *in vitro* amplification. After this, we apply an insertional genetic transformation using T-DNA of a bacteria plasmid, the chimera gene contains the ATP promoter gene Hsp90 in order to localise its expression under GUS gene promoter in plant tissue.

### Key words:

Market species, *Arabidopsis thaliana*, DNA, RNA, gene, amplification, genetic transformation.

## الملخص

يتلخص عملنا هذا في نموذج للمراحل المتبعة لدراسة جزيئية لنبات و تحسين قدراته الوراثية بالتحويل. النبتة المستعملة في دراستنا هي نبتة *Arabidopsis thaliana* التي اختيرت مرجعا لدراسات علم الوراثة للنباتات العالية و هذا لسهولة استعمالها في تجارب المخبر، بغرض التقييم الزمني و الكمي لمراحل الدراسة (أحماض نووية و نباتات محولة) لأجل تطبيق النتائج مستقبليا على النباتات ذات القيمة الاقتصادية. خلال دراستنا مررنا بالمراحل التالية : استخلاص الأحماض النووية الجينية ADN وARN ، بتقييم كمهما و نوعهما بطريقتين : انتقال على المرهم و قراءة الامتصاص بجهاز الطيف الضوئي. قمنا كذلك بتحسين ظروف نسخ الحمض النووي ADN في الأنابيب. ثم تطرقنا إلى إحداث تحويل وراثي بالضم، حيث زرنا مورثة مركبة في قطعة الحمض النووي المرسل ADN-T المزروع في بلاسميد البكتيريا ، هذا لدراسة مرشد Hsp90 مورثة إنتاج الطاقة ATP و تتبع ترجمتها في نسيج شتلات *Arabidopsis* تحت مراقبة المورثة المراسلة GUS.

### الكلمات المفتاحية

النباتات البقولية، *Arabidopsis thaliana* ، أحماض نووية، مورثة، نسخ، تحويل وراثي.

## REMERCIEMENTS

Au terme de ce modeste travail, je remercie Dieu pour m'avoir donné le courage de terminer ce mémoire.

Je remercie ma famille pour l'encouragement et pour l'espoir qu'ils ont semé en moi, qu'ils trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie mon promoteur A. BOUTEKRABT, Professeur à l'U.S.D.B pour m'avoir encadré et guidé le long de ce projet, pour ses précieux conseils qui m'ont été d'une grande utilité, pour son dévouement et la confiance qu'il a placé en moi. Je respecte énormément sa disponibilité et ses remarques pertinentes.

J'adresse mes vifs remerciements à, Monsieur M. BENMOUSSA, Professeur à l'U.S.D.B, pour avoir accepté de présider mon jury de soutenance. Pour les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : M. BENCHABANE Maître de conférences à l'U.S.D.B, A. AISSAT, Maître de conférences à l'U.S.D.B et Mme F.Z. CHAOUCH Maître assistante chargée de cours à l'U.S.D.B.

Je tiens à remercier vivement A.G. BELMIHOUB et E.YOUNESI, étudiants master à l'I.A.M.Ch pour leurs conseils et orientations dans le domaine de biologie moléculaire spécialement en biotechnologie horticole.

Je remercie spécialement messieurs P. KALENTIDIS, HATZOPOULOUS et madame O. KOUTITA, professeurs à l'I.A.M. de Chania pour leur encouragement durant ma formation.

Je remercie aussi les enseignants de département d'Agronomie de l'U.S.D.B. qui ont participé à ma formation tout au long de mon parcours universitaire.

J'exprime mes vifs remerciements à tous mes amis de l'ITCMI de Staouéli, mes amis de département d'agronomie de U.S.D.B et spécialement les amis de l'I.A.M. de Chania et à toute ma famille, particulièrement mes chers frères et sœurs et à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

Enfin, je tiens à remercier le Ministère de l'Agriculture et de Développement rural de l'Algérie pour m'avoir permis de poursuivre mes études en Grèce.

## TABLE DES MATIERES

RESUME	02
REMERCIEMENTS	05
TABLE DES MATIERES	07
LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX	09
INTRODUCTION	12
1. DESCRIPTION DE LA PLANTE	15
1.1 Historique	15
1.2 Utilisation d' <i>Arabidopsis</i> dans l'étude des plantes cultivées	21
2. L'AMELIORATION DES VARIETES ET DES ESPECES LEGUMIERES PAR LA TRANSFORMATION GENETIQUE	30
2.1. La biotechnologie moderne	30
2.2. Le génie génétique appliqué aux cultures légumières	31
2.3. Transformation génétique des plantes	34
2.4. La technologie de l'ADN recombinant (le génie génétique)	
2.5 Criblages des mutants	45
3. L'IMPORTANCE ECONOMIQUE DES SEMENCES POTAGERES	
3.1. Dans les pays développés	48
3.2 Dans les pays en voie de développement	51
3.3 L'importance économique des semences potagères en Algérie	65
4. MATERIELS ET METHODES	
4.1. Présentation de laboratoire de biologie moléculaire	66
4.2. Objectif des essais de caractérisation moléculaire de la plante	66
<i>Arabidopsis thaliana</i>	

4.3. Extraction De l'ADN génomique	67
4.4. L'optimisation de PCR	74
4.5 Isolement de l'ARN génomique	77
4.6 Transformation génétique des plantes d' <i>Arabidopsis thaliana</i> par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	81
	87
5. RESULTATS ET DISCUSSIONS	
5.1 L'isolement de l'ADN génomique	87
5.2 L'isolement de l'ARN génomique	92
5.3 L'optimisation de PCR	95
5.4. La transformation génétique des plants d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
DISCUSSION GENERALE	107
CONCLUSION GENRALE	110
APPENDICES	112
A. Liste des symboles et abréviations	112
B. Liste des espèces et variétés importées par CASAP d'Alger	113
C. Le protocole expérimental : extraction d'ADN	115
D. Le protocole expérimental : extraction d'ARN	117
E. Le protocole de fixation des tissus végétaux pour l'analyse de l'activité de gène rapporteur GUS	118
F. Milieux préparés	120
G. Liste du matériel et instruments utilisés	121
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122

## LISTES DES FIGURES

Figure 1.4: Cycle de développement d' <i>Arabidopsis thaliana</i> [9]	19
Figure 1.5.2.1.1 : Différentes mutations obtenus par traitement à l'EMS affectant les organes de l'embryon chez <i>Arabidopsis</i> [17].	24
Figure 1.5.2.1.2 : Les différents stades de développement de l'embryon et les gènes codants les deux méristèmes (apical et racinaire) [20]	25
Figure 2.3.2 : Méthode de transfert indirect des plantes par <i>Agrobacterium tumefaciens</i> [32].	37
Figure 2.4.1 : Schéma de code génétique	38
Figure 2.4.2 : La synthèse de l'ARN messager à partir de l'ADN [42].	40
Figure 2.4.3.1: L'action de l'enzyme de restriction <i>EcoRI</i> dans le site palindromique.	42
Figure 2.4.3.2 : Schéma de plasmide pBluescript avec les trois gènes et les différents sites de restriction [46].	47
Figure 3.2.1 : Evolution des prix de gros de pomme de terre et de tomate (à 13 marchés de gros) durant les deux dernières années 2005 et 2006 [70]	58
Figure 4.3.3 : Procédure générale pour l'extraction d'ADN avec ADNase [75].	69
Figure 4.3.4.2 : Schéma représentatif des différentes formes de bandes de migration de séquences d'ADN sur un gel.	73
Figure 4.5.3 : Procédure générale pour l'extraction d'ARN avec ARNase [75].	79
Figure 4.5.3.2: Schéma représentatif d'un gel de migration des différents types d'ARNs.	81
Figure 4.6.6 : Schéma de la cassette de transgène cloné au plasmide	83

pBluscript et transféré aux plantes d'*Arabidopsis*

Figure 5.1 : Le graphe de l'absorption à UV de l'échantillon d'ADN isolé à partir de tissus d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	88
Figure 5.1.2 : L'image de migration des dépôts d'ADN sur agarose gel	90
Figure 5.1.3 : Marqueur moléculaire de taille de real biotech corporation (100 bp – 2000 bp)	91
Figure 5.2 : le graphe de l'absorption à UV de l'échantillon d'ARN isolé à partir de tissus d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	92
Figure 5.2.1 : L'image de migration des dépôts d'ARN sur agarose gel.	94
Figure 5.3.1 : Image de migration des échantillons de l'essai du graduant PCR à 47°C.	95
Figure 5.3.2 : Image de migration des échantillons de l'essai du graduant PCR à 56°C.	96
Figure 5.4 : La plante d' <i>Arabidopsis thaliana</i> au stade grossissement des gousses.	99
Figure 5.4.1 : La chambre de culture destinée pour l'élevage des plants.	100
Figure 5.4.2 : A) la boîte de Pétri de test de pré germination. B) un plant coloré entouré des plants non colorés éventuellement non transformés.	100
Figure 5.4.3 : La plante colorée en bleu indique que cette plante est transformée (x10).	102
Figure 5.4.4 : Les plantules transformées portent la couleur bleu (x10).	103
Figure 5.4.5: La plantule de couleur marron jaunâtre non transformée (x 10).	104
Figure 5.4.6 : Les deux plantules d' <i>Arabidopsis</i> montrent la différence entre la plantes transformée (à droite) contre celle non transformée (à gauche)	105

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.4.3.1 : Exemples d'enzymes de restriction e type II [44]	43
Tableau 2.4.3.2: Nom, fonction, mode d'action et utilité des quelques enzymes utilisées en biologie moléculaire [44]	45
Tableau 3.2.1.1 : Répartition des terres Algériennes [65,66]	56
Tableau 3.2.1.2 : Evolution de la consommation des légumes (en kg/hab./an) [65, 67].	57
Tableau 3.2.2 : L'estimation des besoins en semence des cultures maraîchères (objectif l'année 2004) [72].	61
Tableau 3.2.3.1 : La production de semence effectuée par l'ITCMI (2005-2006) [70]	63
Tableau 3.2.3.2 : Liste des activités et actions réalisées par l'ITDAS [69].	64
Tableau 4.4.4 : Les conditions de la PCR et les réactifs préparés	77
Tableau 5.1: Les densités optiques de l'échantillon 01	88
Tableau 5.2: Les densités optiques de l'échantillon d'ARN	93
Tableau 5.4: Le suivi cultural de la plante d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	98

## INTRODUCTION

En Algérie, les cultures légumières occupent une place économique très importante, elles sont classées en deuxième place après les céréales soit en superficie ou bien en consommation, elles sont consommées sous différentes formes : en frais, sous conserve, séchée ou transformée. Au niveau du marché national, les prix connaissent durant les mois et les saisons de l'année des fluctuations permanentes, durant la majorité des temps l'équilibre de balance "offre / demande" n'est obtenu que pendant des courtes durées pour se déséquilibrer de nouveau. Malgré les stratégies adoptées et les programmes de développement suivis, visant un objectif bien défini qui est l'autosuffisance et la sécurité alimentaire en légumes, cependant la réalité montre qu'à chaque fois une production en une légume donnée est stabilisée, en parallèle une pénurie d'un ou d'autres légumes serait annoncée.

La dépendance de notre pays en facteur de semence maraîchère est sûrement classée parmi les premières causes de fragilité et sensibilité de ces programmes. L'Algérie consacre chaque année une immense enveloppe financière pour l'importation de semences maraîchères de qualité supérieure afin de combler le déficit d'une production nationale estimée entre 0.5 et 6 % [1], ne touchant qu'un ensemble d'espèces et des variétés. La production n'a atteint ce niveau qu'avec la libéralisation du marché où le contrôle des introductions variétales est transféré des opérateurs spécialisés aux importateurs privés, ainsi la culture des dizaines des variétés introduites des différentes espèces sont généralisées dans les régions à vocation maraîchère les portes de nos terres (plein champ et sous serre).

Cette dépendance aux pays étrangers et aux firmes semencières, met l'Algérie en face d'un ensemble de problèmes :

- La mobilisation d'une enveloppe financière de plus de 24 millions DA (2003)
- Les variétés hybrides accentuent notre dépendance à l'étranger
- Risque d'introduire des nouvelles maladies ( le cas de TYLCV en 2002/2003)  
L'importation des variétés dite anti TYLCV coûte plus chère
- Introduction des variétés non conforme aux caractéristiques des fiches techniques accompagnantes
- La menace de disparition de variétés locales adaptées aux conditions dont lesquelles elles se sont évoluées: fève de Doucen, carotte muscade de Meskiana...

En parallèle, nous vivons aujourd'hui une grande révolution de génie génétique, les espèces et les variétés sont maintenant marquées génétiquement, la caractérisation variétale est obtenue par l'isolement du matériel génétique de la plante à analyser, par la présence des gènes marqueurs ; également l'ADN recombinant a fait beaucoup de progrès pour la création variétale comparée aux techniques classiques d'amélioration par sa rapidité, la précision dans le gène d'intérêt transféré et traversant la barrière interspécifique. Pour le règne végétal en général et les espèces herbacées spécialement, le séquençage complet de génome de l'Arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) choisie par les scientifiques comme une plante modèle pour les plantes supérieures à fleur et son utilisation en génétique a permis de comprendre beaucoup de phénomènes biochimiques, physiologiques et pathologiques et elle a conduit à l'amélioration génétique des plantes supérieures à intérêt agronomique, le cas des créations des variétés améliorées des espèces légumières par transformation génétique.

Durant notre étude expérimentale, nous avons suivi la démarche de caractérisation moléculaire d'une espèce végétale en utilisant des techniques de biologie moléculaire. Nous le matériel végétal que nous avons utilisé est l'Arabette des dames utilisée au laboratoire de génétique et biotechnologie horticole de l'institut méditerranéen de Chania en Grèce pour des études expérimentales concernant la tolérance aux stressés et l'hormone éthylène. Faisons membre de groupe de recherche de ce laboratoire nous avons utilisé des protocoles d'extraction de l'ADN génomique d'*Arabidopsis thaliana* et de l'ADN de plasmide bactérien, à l'amplification des séquences d'ADN par PCR et par la bactérie

*Agrobacterium*, également un protocole d'extraction de l'ARN génomique de la plante, ensuite, la transgénèse d'*Arabidopsis thaliana* par insertion d'un gène chimère dans le plasmide d'*Agrobacterium*, un criblage des mutants et enfin une vérification de la transformation par l'utilisation de gène reporteur GUS. Toute cette démarche permettra d'avoir une idée sur la quantité de matériel végétal de départ à utiliser, de la durée des manipulations et les rendements à obtenir par les protocoles suivis, les résultats obtenus peuvent être appliqués dans différents domaines comme la conservation des ressources phylogénétiques locales, le contrôle et vérification des introductions variétales et la création de variétés maraîchères performantes.

## CHAPITRE I DESCRIPTION DE LA PLANTE

### 1.1. Historique

*Arabidopsis thaliana* est connue par les botanistes depuis au moins quatre siècles ; elle est découverte par Johannes Thal dans les montagnes de Harz durant le 16<sup>ème</sup> siècle, qu'il nomma *Pilosella siliquosa* (elle prenait différentes appellations depuis cette période).

L'utilisation d'*Arabidopsis* dans la recherche expérimentale est faite durant un demi-siècle environ. Le premier rapport sur la découverte d'un mutant naturel de cette plante était en 1873 par Brun. La première personne résumant le potentiel d'*Arabidopsis* comme organisme modèle est F. Laibach, réalisant un ensemble de travaux et publia en 1907 le nombre exact des chromosomes de la plante.

Les premières collections des mutants par induction sont obtenues par Reinholz (1947), étudiante de Laibach. Durant les années 50, Laugridge joua un rôle important pour stabiliser les propriétés d'*Arabidopsis* et son utilisation comme organisme dans les recherches menées aux laboratoires [2].

Le projet de séquençage de cette plante maintenue comme organe modèle pour les plantes supérieures a été décidé durant l'été 1996, par des équipes multinationales (USA, Europe et Japon), le travail est achevé avec le début de ce millénaire en 2000. De ce séquençage, une prédiction de la présence de plus de 26000 gènes codant des protéines [3].

## 1.2. Distribution géographique d'*Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* est une plante à fleur, elle est membre de la famille de Crucifères avec une large distribution naturelle à travers le monde, l'Europe, l'Asie et l'Amérique du Nord [4, 3]. Plus de 750 écotypes naturels sont collectés à travers le monde et sont disponibles dans les deux centres de stockage de semence ABRC (*Arabidopsis* Biological Resource Center of USA) et NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Center). Ces écotypes présentent une légère différence de point de vue forme et développement (exemple : la forme des feuilles et la pilosité) et physiologie (le temps de floraison et la résistance aux maladies). Cette variabilité de ressources naturelles est utilisée pour découvrir les complexes d'interactions génétiques afin de comprendre les phénomènes les différences morphologiques et d'adaptation des plantes aux différents environnements [2]

## 1.3 Classification

Le genre *Arabidopsis* appartient à la famille de Brassicaceae (Crucifères). Plusieurs espèces appartiennent au genre *Arabidopsis*, la plus connue et la plus largement utilisée dans la recherche est *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynla.  $2n = 10$  [5].

- Règne : *Plantae*
- Division : *Magnoliophyta*
- Classe : *Magnoliopsida*
- Ordre : *Capparales*
- Famille : *Brassicaceae*.

Nom commun anglais : thale cress, mouse ears.

Nom commun français : l'arabette des dames, arabette de Thalius, *Arabidopsis* de Thalius ; arabette rameuse, fausse arabette.

Plusieurs écotypes ont été collectés des populations naturelles et sont valables pour l'analyse expérimentale. Les deux (02) écotypes Columbia et Leusbeurg sont deux écotypes standards pour les études de la génétique moléculaire.

#### 1.4 Biologie de la plante

*Arabidopsis thaliana* est une plante autogame auto fertile, le cycle de vie complet comprenant la germination de la graine, la formation de la rosette, la montaison de la tige principale, la floraison et la maturation des graines, est achevé en six (06) semaines. En ce qui concerne la taille, tout ce qui concerne la plante est petit [5]. La plantule se développe en rosette d'un diamètre allant de 2 à 10 cm selon les conditions de culture. Les feuilles sont couvertes par de petits poils unicellulaires connus par le nom de trichome. La forme et la taille des feuilles varient selon le stade végétatif.

Une fleur est composée de 4 verticilles de pièces florales, une couronne externe de quatre sépales verts et une couronne interne de quatre pétales blancs (en alternance avec les sépales [6]), de six étamines portant le pollen et un gynécée central qui formera la silique. Les fleurs sont de 2 mm de long, la pollinisation a lieu une fois les boutons floraux épanouis, mais elle peut être croisée en appliquant de pollen à la surface de stigmat.

Après le stade rosette, la tige feuillée s'allonge en axe feuillé puis en inflorescentiel [4], le début de formation des boutons floraux coïncide avec la troisième semaine après plantation, les inflorescences se rangent sous une forme linéaire par progression des fleurs et siliques, cela pendant plusieurs semaines jusqu'à la sénescence.

Une plante adulte atteinte 15 à 20 cm de hauteur, produit, souvent, plusieurs centaines de siliques pour avoir plus de 5000 graines. Les graines ont 0.5 mm de long à maturité, produites à l'intérieur des siliques [5]. A titre indicatif, 1 gramme de semence renferme approximativement 50000 graines [7].

La plante peut être cultivée dans des boîtes de Pétri, dans des pots sous serre ou sous lumière diffuse, dans des chambres de culture ou bien au laboratoire. Les racines sont de structure simple et n'ont pas une relation symbiotique avec les bactéries fixatrice d'azote (figure 1.4) [2]

Pour sa croissance et son développement, la plante exige une température de 16 à 25°C. Les basses températures retardent la floraison et les hautes températures réduisent le nombre de feuilles et de fleurs. Les besoins en lumière sont de 120 à 150 mol/ m<sup>2</sup>/sec, les jours longs accélèrent la floraison alors que les jours courts induisent le développement végétatif [59]. La durée de germination est d'une semaine, une levée de la dormance peut être obtenue par un traitement au froid de 04 °C de 02 à 04 jours. L'humidité exigée est de 25 – 75 %, une humidité excessive (90 %) provoque la stérilité. La plante exige une somme d'heures de froid en hiver pour assurer la vernalisation [5]

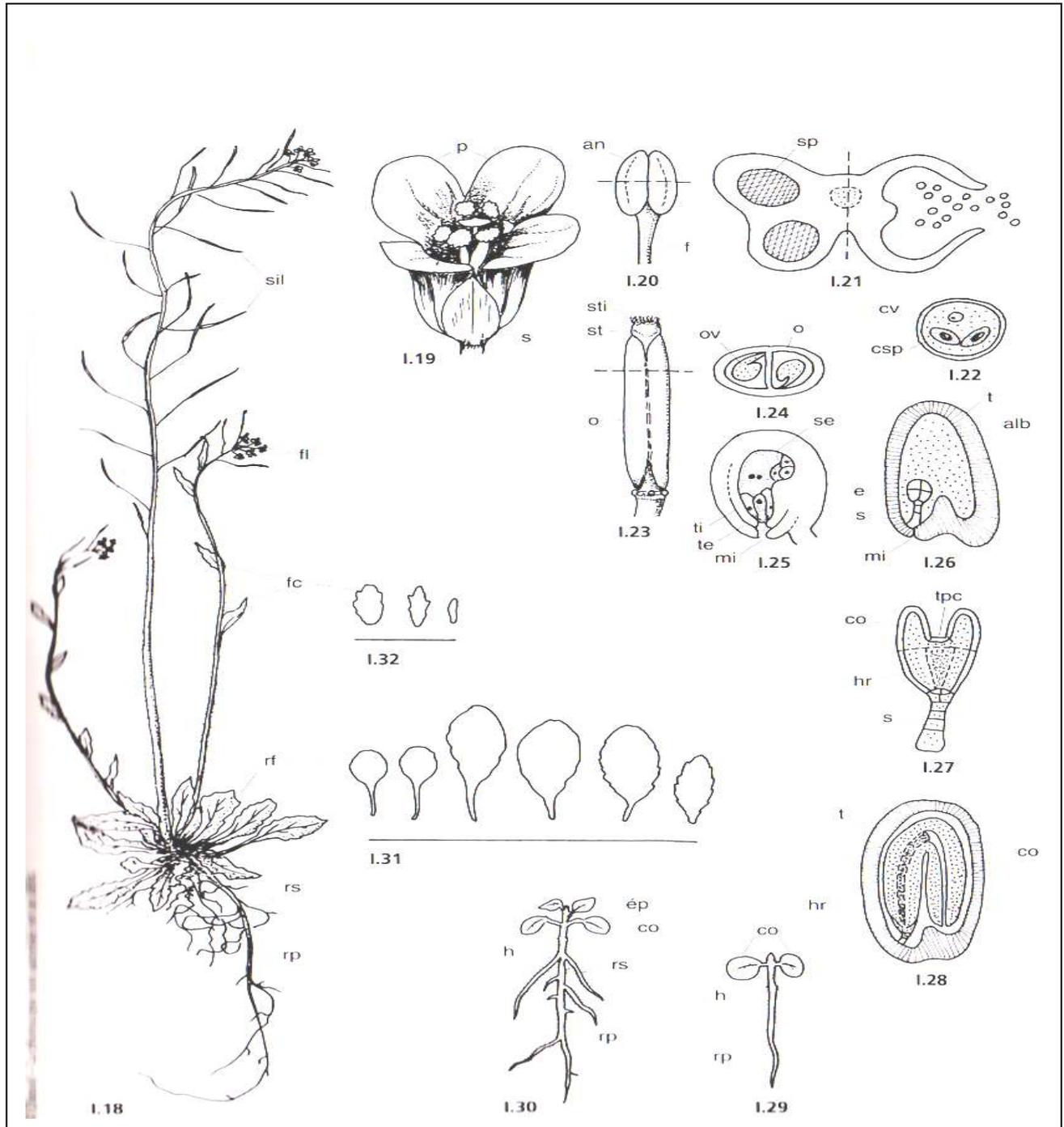


Figure 1.4 : Cycle de développement d'*Arabidopsis thaliana* [9]

1.18 pied adulte d'arabette, 1.19 fleur, 1.20 étamine, 1.22 pollen bicellule, 1.23 et 1.24 gynécée en vue externe et en coupe transverselle, 1.25 coupe sagittale d'un ovule, 1.26 jeune graine avec embryon globulaire. 1.27 embryon au cours d'organogenèse, 1.28 graine à maturité, 1.29 plantule avant le développement epicotylaire, 1.30 début de développement de l'épicotyle et ramification de la racine principale, 1.31 feuilles de la rosette, 1.32 feuilles caulinaires.

Abréviation :

alb albumen, an anthère, csp cellule spermique, cv cellules végétatives, ep épicotyle, o ovaire, ov ovule, rp racine principale, rs racine secondaire, se embryonnaire, sil silique, sp sac pollinique, s suspenseur, st style, sti stigmate, t tégument, te tégument externe, ti tégument interne, tpc territoire précaulinaire.

Le génome d'*Arabidopsis* est organisé en 5 chromosomes. La région séquencée couvre 115.4 méga bases de 125 méga bases de génome, elle s'étend dans la région centromérique [10].

Les chromosomes sont de longueur plus au moins égale :

- ◆ Chromosome 1 : 2.8  $\mu\text{m}$
- ◆ Chromosome 2 : 1.5  $\mu\text{m}$
- ◆ Chromosome 3 : 2.2  $\mu\text{m}$
- ◆ Chromosome 4 : 2.1  $\mu\text{m}$
- ◆ Chromosome 5 : 2.4  $\mu\text{m}$

La taille cumulée des 5 chromosomes dépasse les 150 Mb. La différence vient des séquences manquantes, principalement situées dans les télomères, les régions organisatrices du nucléole et les régions centrales des centromères [11].

Les chromosomes d'*Arabidopsis* sont constitués à majorité d'euchromatine (zone riche en gènes) et sont occupés à environ 40 % par régions codantes des gènes [12], les séquences non codantes sont relativement peu nombreuses (6 à 7 introns par gènes) [4].

L'annotation de son génome est un processus dynamique constamment remis en cause par de nouvelles données expérimentale et prédicteurs de gènes plus performants. Ainsi l'annotation de génomes d'*Arabidopsis* est mise à jour chaque année. Depuis la première version officielle du génome d'*Arabidopsis* en 2000, plus de 7000 gènes ont vu leur structure modifiée et plus de 4000 nouveaux gènes ont été modélisés. La sixième version fait aujourd'hui état de 31 407 gènes prédits se répartissant en 26751 gènes codant pour des protéines [12].

Un projet international 2010 "cybergénétique" va transformer cette plante de laboratoire en une plante virtuelle sur Internet. Ce programme sera doté des sous programmes dont chacun traduit un gène d'*Arabidopsis*, en modifiant l'un des gènes par une seule frappe de clavier on pourra obtenir l'effet d'une mutation virtuelle en phénotype [6].

## 1.5 Utilisation d'*Arabidopsis* dans l'étude des plantes cultivées

La publication de la séquence complète du génome de la plante, arabe des dames (*Arabidopsis thaliana*), a coïncidé avec le nouveau millénaire. L'utilisation de l'*Arabidopsis* en génétique est devenue populaire pour les études de biochimie, physiologie, pathologie et le développement de la biologie des plantes. Plusieurs informations ont été collectées à partir des analyses de la variation génétique sans avoir une idée sur les effets de la molécule en cause [13].

### 1.5.1 En génétique

L'utilisation d'*Arabidopsis* est utile pour adapter ou mettre au point de nouvelles techniques d'analyses qui peuvent par la suite être transférées et adaptées vers des espèces moins faciles à travailler. Également, les travaux fondamentaux menés sur cette plante modèle ont permis d'avancer beaucoup plus vite dans la compréhension et l'utilisation de caractères d'importance agronomique, les gènes de nanisme, de résistances, le métabolisme de l'éthylène, la maturation des fruits, et d'autres exemples [3].

Au-delà des connaissances de base apportées par ces études, on peut utiliser la ressemblance entre le génome de cette espèce modèle et celui d'espèces cultivées apparentées. Les gènes sont souvent organisés de la même manière sur les chromosomes, et placés dans le même ordre : c'est le phénomène de conservation de la synténie. Il est donc possible, moyennement des vérifications acquises sur un génome modèle pour analyser les chromosomes d'une plante apparentée. Cette ressemblance sert de base pour explorer des génomes plus complexes et plus grands, comme ceux de la plupart des espèces cultivées [14].

Le séquençage d'*Arabidopsis* a fourni un très grand nombre de gènes marqueurs qui ont été ensuite cartographiés sur chacune des espèces cultivées ciblées. En procédant de la sorte, il a été établi que chacun des chromosomes de *Brassica oleracea* (chou) ou de *Brassica napus* (navet) pouvait être représenté

par des segments homologues de chacun des chromosomes de l'espèce *Arabidopsis* [13].

Lorsque l'on sort de la famille des Crucifères, on retrouve encore des segments de même ordre de codons "synthénique" entre *Arabidopsis* et la betterave, la pomme de terre, le tournesol ou l'amandier. L'analyse globale de ces résultats suggère que ces segments conservés sont la trace du génome ancestral des dicotylédones. Cependant, il est clair que plus on s'éloigne, au plan évolutif, d'*Arabidopsis*, plus on observe de remaniements et de marqueurs qui ne sont pas à la place attendue. Il y a aussi, chez ces espèces des régions entières du génome qui ne semblent pas avoir d'équivalent clair dans celui d'*Arabidopsis* [12].

Le séquençage de cette plante a permis, également de lancer de programme de séquençage d'autres plantes à intérêt agronomique et d'une importance économique, par l'utilisation de différentes méthodes le cas de la tomate, maïs, blé, sorgho, betterave, canna à sucre, vigne...[13].

L'utilisation de cette plante en génétique n'est pas limitée qu'au plante herbacée, mais elle l'a dépassé aux arbres fruitières à noyau, pour confirmer l'existence des gènes de résistance que renferme la diversité phylogénétique de l'espèce contre les maladies grave, le cas de la Sharka, une maladie virale qui cause des dégâts sur le genre *Prunus* (pêchers, abricotiers, pruniers) dans plusieurs régions dans le monde. L'absence des moyens de traitements chimique ou biologique contre cette maladie (comme le cas des toutes les maladies virales), les recherches des gènes de résistance sont devenus possible grâce à cette plante à cycle de vie courte de quelques mois contre plus de 4 ans pour tester la sensibilité chez un arbre fruitier, en plus le séquençage de l'Arabette des dames a permis d'identifier et d'isoler 30 gènes de 60 écotypes testés qui confèrent la tolérance à la maladie, et de 22 gènes de 60 qui confèrent un vraie résistance contre le virus [15].

### 1.5.2 En physiologie des plantes

Avant que la génétique ne fusionne à la physiologie via l'*Arabidopsis* les physiologistes étaient concernés que par le flux et le mouvement des substances dans la plante. Alors que cela reste fondamental en physiologie (limité qu'à la circulation de l'eau), la génétique a ajouté à ce point de vue le flux des informations et des substances [16].

Les recherches réalisées sur *Arabidopsis thaliana* et qui ont permis d'éclairer plusieurs phénomènes en physiologie des plantes.

#### 1.5.2.1 L'origine des méristèmes et le mode de formation des organes

Les progressions, les plus récentes dans la compréhension de la fonction des méristèmes et les cellules d'apex viennent des études d'*Arabidopsis thaliana*. Une des plus récentes avancées dans la compréhension du développement des méristèmes est l'identification des marqueurs moléculaires qui sont des gènes particuliers (ainsi que les protéines qu'ils codent) qui caractérisent la cellule, la structure ou un stage donné de la plante. La formation de l'embryon dans la graine passe par différents stades, d'un stade unicellulaire à 2n chromosomes le zygote, et après plusieurs divisions, au stade appelé stade cœur (250 cellules) les cellules responsables de formation des méristèmes sont différenciées [17].

La méthode la plus pratique et couramment utilisée pour obtenir des mutations chez *Arabidopsis* est le traitement des graines de cette plantes par des agents mutagènes. La cible dans ce cas de mutagenèse est des cellules diploïdes de l'embryon après son développement complet et protégé par le tégument de la graine. L'agent chimique le plus souvent utilisé est l'Ethyl Méthane Sulfonate (EMS) qui provoque typiquement des douzaines de mutations dans chaque plante [18]. L'EMS provoque généralement, des mutations récessives et le phénotype recherché est obtenu dans la génération M<sub>2</sub> (figure 1.5.2.1) [19].

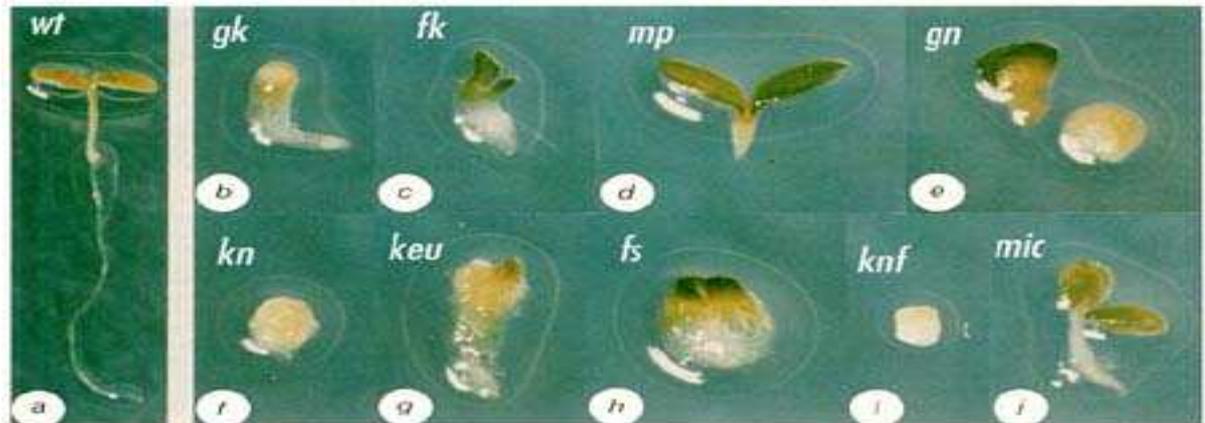


Figure 1.5.2.1.1: Différentes mutations obtenus par traitement à l'EMS affectant les organes de l'embryon chez *Arabidopsis* [17].

Ces résultats montrent que parmi les gènes codant la formation des organes des plantes, la mutation des 09 gènes : *gk*, *fk*, *mp*,... dans la figure 1.5.2.1 indique l'organe en cause, présent dans le type sauvage (*wt*).

La perte de fonction utilisée dans l'étude des phénomènes de formation des organes a mené à détecter les gènes intervenant dans la formation des organes. Les deux gènes nommés *wuschel* et *clavata* (*WUS* et *CL*) régularisent par effet antagoniste la formation de l'apex. Le premier gène code pour la formation d'un apex réduit alors que le deuxième pour un apex géant, et c'est l'équilibre entre l'action de ces deux gènes qui donne une taille normal de la partie apicale de la plante. Egalement, la formation des organes floraux (sépale, pétale, stigmatte et ovaire) est contrôlée par l'action de quatre gènes et l'action cumulée de deux gènes code pour la formation d'un seul type d'organe (figure 1.5.2.1.2) [20].

Ces connaissances peuvent être appliqué pour d'autres plantes, pour améliorer la production des légumes à feuilles (chou, laitue, endive...).

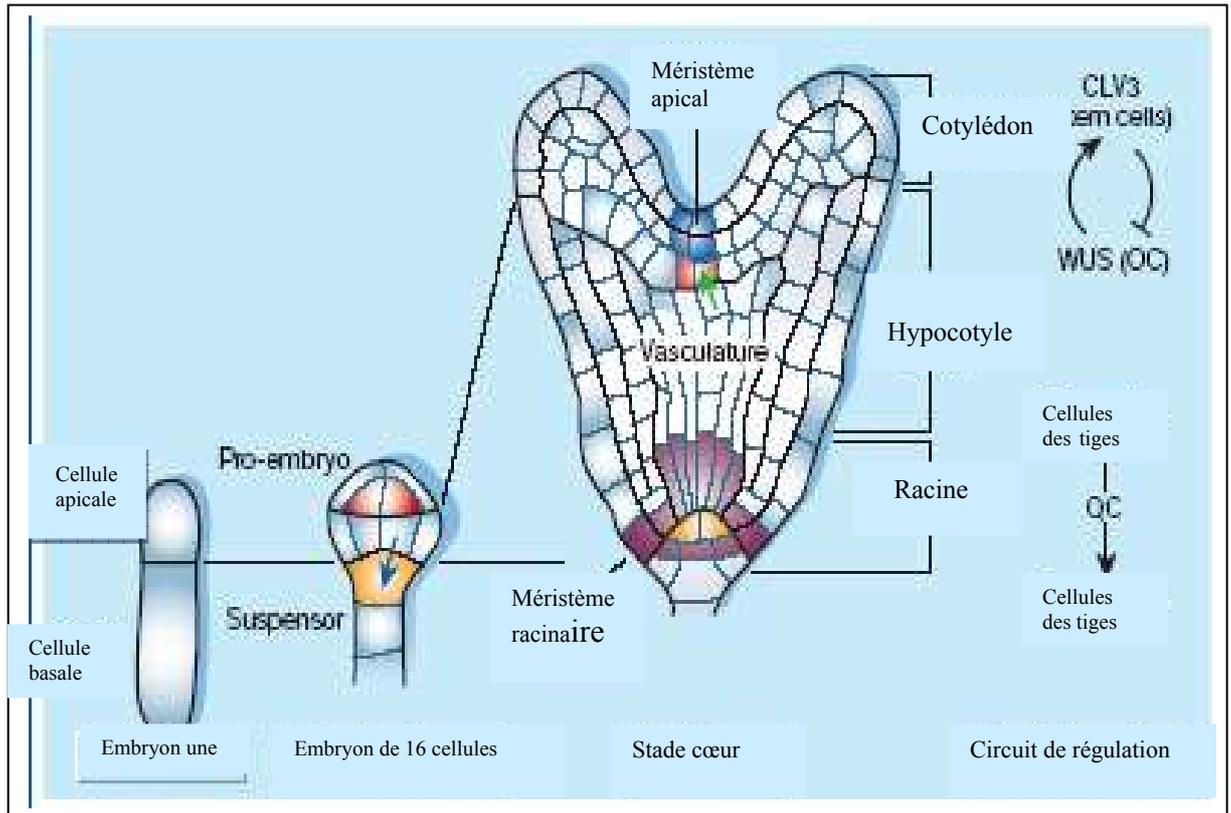


Figure 1.5.2.1.2 : Les différents stades de développement de l'embryon et les cellules responsables de formation des deux méristèmes (apical et racinaire) [20].

### 1.5.2.2 La maturation des fruits secs

Les plantes cultivées adoptent la déhiscence des fruits pour disperser ses graines et assurer sa pérennité. La synchronisation entre la maturation des graines dans les fruits secs (siliques dans le cas d'*Arabidopsis*) et leur libération par le fruit est expliquée par des études sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

La déhiscence est un caractère très important qui joue un rôle dans l'augmentation des rendements de quelques espèces cultivées, sur lesquels les améliorateurs, depuis les années 70, ont longtemps travaillé spécialement sur le coton et durant la dernière décennie sur le colza (*Brassica napus*). Les études anatomique et physiologique ont montré que la plante modèle révèle le même processus que chez *Brassica*. Durant les dernières années, plusieurs gènes sont

identifiés et jouent le rôle de différenciation de la zone de déhiscence et dans le changement biochimique et physiologique lié à cette zone.

Une double mutation des gènes SHATERROOF 1 et 2 (SHP1 et SHP2) localisée dans une boîte de gène dite boîte MADS ; cette mutation a provoqué l'inaptitude des siliques de s'ouvrir bien que les graines aient atteint leur stade de maturation complète [21]. Les études réalisées sur *Arabidopsis* ont permis de détecter tout le parcours des gènes responsables de déhiscence et de maturation des fruits.

#### 1.5.2.3 L'adaptation au froid

Les études menées sur l'expression des gènes régulateurs du froid chez *Arabidopsis* ont conduit à la découverte d'une famille des activateurs de transcription CBF / DREB1 et qui ont un rôle important dans l'acclimatation au froid. Les résultats de cette étude, suggèrent la possibilité d'utilisation des gènes CBF / DREB1 d'*Arabidopsis* ou bien ses homologues chez d'autres plantes pour optimiser l'expression de CBF chez les plantes cultivées, cela pour augmenter la tolérance au froid, à la sécheresse et à la salinité [22].

Des études faites sur l'expression du gène régulateur du froid ont établi que le promoteur de quelques gènes responsables des conditions du froid est activé durant les basses températures et les stress liés au froid.

Des analyses plus avancées sur *Arabidopsis* ont mené à identifier l'élément régulateur de l'ADN, l'élément de réponse à la déshydratation (DRE) et qui a une séquence de CCGAC conservée. Les mêmes chercheurs ont découvert également, les activateurs de transcription qui se lient au DRE /CRT les CBFs.

La majorité des gènes intervenant dans l'acclimatation aux conditions du froid (des températures inférieures à -10 °C) et les facteurs biochimique intervenant sont clarifiées par l'utilisation d'*Arabidopsis*. Les basses températures mènent à une induction rapide des CBFs, les gènes de DREB résultent de

l'expression de CBF sur le gène régulateur CRT/ DRE. L'expression des gènes de COR, ERD et XYZ en dernier lieu permet la tolérance aux conditions du froid [22]

### 1.5.2.3 En biochimie

*Arabidopsis* est un organisme autotrophe n'a besoin que de minéraux, de lumière, de l'eau et de l'air. Par conséquent, le génome code une large production d'enzymes qui support le processus métabolique dont la photosynthèse, respiration, métabolisme intermédiaire, acquisition des minéraux, la synthèse des lipides, des acides gras, des acides aminés, nucléotides et des co-facteurs.

Dans leur milieu naturel, les plantes sont exposées continuellement à des répliques environnementales différentes y compris insectes, nématodes et différents micro-organismes. Leurs conditions de vie dépendent de l'habilité des plantes de percevoir le signal externe et de répondre à temps voulu. Pendant la dernière décennie, un nombre croissant des gènes de résistance des maladies des différentes plantes étaient découvertes par la carte à base de clonage, des insertions des mutations ou à travers la technologie [16].

Les plantes supérieures synthétisent plus de 100 000 métabolites secondaires. Avoir l'idée que les plantes à fleurs ont un nombre similaire de gènes, il apparaît que la création de beaucoup d'enzymes prend place durant l'évolution des plantes supérieures.

#### 1.5.3.1 La maturation des fruits

De fait de l'importance que joue les fruits dans l'alimentation humaine, des études considérables sont concentrés sur le développement et la maturation des fruits. Les anciennes études réalisées sur les fruits de tomate choisis comme fruit modèle, les études réalisées sur *Arabidopsis* sont une suite des premières découvertes.

Malgré la différence de nature entres les fruits d'*Arabidopsis* fruits sec siliques de ceux da la tomate baie fraîche, mais ces études ont montré qu'il

n'existe pas une grande différence entre les gènes intervenant lors de la maturation chez les deux espèces.

L'hormone éthylène qui joue un rôle important dans la maturation des fruits en affectant à la fois l'arome, la pigmentation et le goût des fruits ainsi que d'autres facteurs. L'analyse des mutants d'éthylène chez *Arabidopsis* a mené d'avoir des explications du signal de cette hormone chez les plantes [23].

L'expérience de transfère d'un gène de tomate selon Giovannouni (2003) [23], l'exemple de récepteur de l'éthylène NR (never ripen) qui est transféré de la tomate à la plante d'*Arabidopsis* après mutation pour confirmé son activité, a induit effectivement, à la non sensibilité d'*Arabidopsis* à l'éthylène.

#### 1.5.3.2 Synthèse des métabolites secondaires

Les chercheurs en biologie ainsi que les docteurs ont montré toujours que les repas riche en fruits et légumes ont un rôle important dans la réduction des maladies chroniques, ils ont classé les aliments en différentes couleurs en se basant sur la synthèse des métabolites secondaires.

L'utilisation d'*Arabidopsis* dans le domaine de génomique nutritionnelle a permis de découvrir les parcours de synthèse des molécules ainsi que le lieu de son déroulement.

La transgénèse d'un gène (Pts) pantothénate synthèse (vitamine B5) d'*Escherichia coli*, dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*, en utilisant GFP (pour green fluorescent protein) gène codant des protéines vertes fluorescence, a permis de localiser l'organite et les gènes de pantothénate et synthétisé. Utilisant le génome d'*Arabidopsis*, l'étude a permis de confirmé que le pantothénate est codé par trois gènes, similaires à ceux trouvés chez les bactéries et chez le colza [24].

#### 1.5.4 En écologie

En 2000, des chercheurs ont réussi à produire une plante transgénique capable de transformer les formes toxiques de mercure en d'autres moins inoffensives. Ils ont utilisé un gène bactérien qu'ils ont introduit dans *A. thaliana*, et ont démontré que cette transformation lui permettait de survivre sur des terrains contaminés par le méthylmercure. Le processus d'alimentation et de respiration de la plante nettoie petit à petit le sol et peut réduire la pollution jusqu'à 2 % de son niveau d'origine [25].

## **CHAPITRE 2**

### **L'AMELIORATION DES VARIETES ET DES ESPECES LEGUMIERES PAR LA TRANSFORMATION GENETIQUE**

#### 2.1. La biotechnologie moderne

La biotechnologie moderne apporte d'autres possibilités d'accroître l'efficacité des schémas de sélections classiques. La formation de lignées pures par le biais des haploïdes doublés, la fusion de protoplastes et de génie génétique sont des outils qui apportent une variabilité génétique utile au progrès de la création variétale [26] et permettant de diminuer considérablement la durée d'obtention des variétés améliorées.

Les plantes transgéniques sont naturellement produites par l'action d'une bactérie du sol (*Agrobacterium*) qui contient un plasmide porteur de gènes capables d'induire des tumeurs dites "galle de collet" ou la formation d'un chevelu racinaire "hair root" et de s'intégrer dans le génome des plantes. En remplaçant les gènes capables de provoquer les symptômes cités, par le gène que l'on désire introduire dans une plante on transforme le plasmide bactérien en un vecteur permettant le transfert de gènes dans les espèces végétales sensibles aux *Agrobacterium*.

La transgénése comme technique de création variétale selon Casse et Bertlier (2001) [27] et, à l'opposé des croisements classiques qui donnent des individus ayant hérités de plus d'un caractère du parent dont on ne voudrait récupérer qu'un seul caractère, nous permet d'introduire que le caractère intéressant et en une seule étape, par contre plusieurs rétrocroisements (au moins 07 générations) entre la ligne receveuse et la ligne donneuse sont nécessaire

pour parvenir à une lignée convertie avec 1% de gène de résistance par exemple provenant de l'espèce sauvage.

D'autres avantages des techniques de transgénèse par rapport aux méthodes plus habituelles, Casse et Breither (2001) [27] et Benamour [1999] [28] ajoutent que l'améliorateur n'est plus gêné par la barrière interspécifique, il est actuellement capable de prélever chez d'autres espèces ou dans d'autres genres les qualités à introduire sur la plante cible, cependant la limitation de cette technique est qu'elle ne touche qu'un nombre restreint de caractère mono, di ou tri génique alors que les caractères intéressants telle que la productivité, la rusticité sont contrôlés par plusieurs gènes encore mal identifiés et dispersés au niveau de génome.

## 2.2 Le génie génétique appliqué aux cultures légumières

Les techniques de la biologie moléculaire qui sont la base des biotechnologies modernes permettent aux scientifiques de travailler sur les molécules individuelles d'hérédité: les gènes, de comprendre leurs natures, de modifier ou de lire leurs séquences. De nos jours les sélectionneurs peuvent produire des variétés améliorées simplement en déchiffrant et en marquant la séquence génétique, en la comparant aux attributs observés en plein champ, et en utilisant cette information, ils peuvent sélectionner des milliers de spécimens possédant les caractéristiques désirées en un seul essai.

La technique de transfert est utilisée actuellement dans différents domaines d'amélioration : l'acquisition d'un gène de résistance, production d'un métabolite secondaire, production de molécule d'une importance thérapeutique, amélioration d'aspect externe de légume ainsi que d'autres exemples, parmi lesquelles ces quelques légumes améliorés par transgénèse.

### 2.2.1 Cantaloup Charentais melon, résistant aux lésions de froid

La majorité des légumes tropicaux développent des lésions de froid à des températures basses (2°C) au stockage, le cas de fruit de cantaloup, une fois le produit est transféré à une température ambiante après déstockage il présente des taches brunes d'un goût amer, et une perte de parfum spécifique de ce légume, causant ainsi des pertes considérables dans la production. Pour y remédier à ce problème, une transformation génétique a été effectuée pour la variété Charentais, par clonage d'un gène antisens de l'enzyme ACC oxydase intervenant dans le parcours de synthèse de l'éthylène (hormone jouant un rôle principal dans la maturation des fruits), ce gène introduit a donc amélioré la tolérance des cantaloups transférés aux lésions de froid et la destruction de la corse de légume durant et après le stockage [29].

### 2.2.2 Pomme de terre et tomate riche en flavinoïdes

L'amélioration de la composition des légumes par l'augmentation de quantité d'un métabolite secondaire est un des objectifs des transgénèses. Les flavinoïdes sont des métabolites secondaires qui jouent un rôle important dans la vie des plantes, la coloration des fruits, fleurs et graines, protection contre les UV, la défense des plantes contre les microorganismes et pathogènes, la fertilité et la germination de pollen. En plus de leur rôle dans la plante, ces flavinoïdes sont des composants essentiels dans l'alimentation humaine pour le protéger contre un ensemble de maladies, les stress oxydatifs, maladies cardio-vasculaires, certains cancers et d'autres maladies des gens âgés [30].

D'après le même auteur, la connaissance de parcours enzymatique de ce métabolite a permis d'améliorer le contenu des tomates en anthocyanine (développement de la couleur verte), également en d'autres types de flavinoïdes (flavonol kaempferol) dans le fruit de tomate, cela par le clonage de gène régulateur isolé du maïs LC qui code à une sur-expression de flavonol. La composition des tubercules de pomme de terre a été également améliorée par la transformation génétique avec clonage de même gène cité, le légume présente une coloration foncée (la chair et le tégument) indiquant la présence de flavonol kaempferol.

### 2.2.3 Tomate à mûrissement retardé

Le phénomène de maturation des fruits est une étape très importante pour les légumes fruits, c'est un indice d'habileté de récolter et de consommer la production. Cette maturation est accompagnée par d'autres processus biochimiques comme la synthèse des volatiles, des sucres solubles, la pigmentation et la fermeté de fruit, elle est en relation étroite avec le changement qui a eu lieu dans la structure de paroi cellulosique. La maturation est la première étape de sénescence de fruit, une fois entamée elle ne peut être stoppée. Cette transgénèse des légumes- fruits (tomate, melon, concombre) par le clonage de gène antisens qui inhibe l'activité de l'enzyme polygalacturonidase, permet d'obtenir des fruits avec une longue vie sur l'étagère car le processus de mûrissement se fait lentement [31].

En plus des ces exemples cités, il existe des produits végétaux transgéniques qui sont en développement soit pour l'amélioration des caractères agronomiques (des plantes légumières tolérantes aux herbicide, aux insectes, aux virus, à la sécheresse, à la salinité...), la modification des caractéristiques alimentaires (huile de colza et de soya pauvre en acides gras saturés, tomate riche en lycopène, betterave sucrière produisant du sucre faible en calories...), ou bien pour l'obtention d'une agriculture moléculaire moderne (protéine sanguine dans la pomme de terre, hormone de croissance humaines dans les chloroplastes de tabac...) [32].

### 2.3 Transformation génétique des plantes

La transgénèse des plantes fait appel à des techniques complexes, l'utilisation des enzymes de restriction comme outils de fragmentations de la molécule d'ADN, la multiplication des brins d'ADN par PCR (réaction de polymérisation en chaîne), la combinaison de segments d'ADN de provenance différente (ADN recombinant ou ADNr), la préparation de vecteurs tels que plasmides ou phages (virus parasites) pour effectuer le transfert de gènes, des tests de sélection pour repérer les cellules où le transfert a réussi (typiquement : un test de résistance à un antibiotique ou à un herbicide), le clonage de cellules génétiquement modifiées, ...etc [32].

Il existe deux méthodes pour réaliser la transformation génétique des cellules végétales, celle qui utilise les bactéries *Agrobacterium tumefaciens* et *Agrobacterium rhizogenes* comme agents naturels de transformation, et celle qui consiste à utiliser des agents physiques ou chimiques pour forcer la pénétration de l'information génétique exogène dans la cellule.

### 2.3.1 Les méthodes de transfert direct

Bien que l'on y ait moins fréquemment recours, ces techniques de transformation génétiques directes sont néanmoins assez largement répandues, en particulier pour la transformation des monocotylédones (graminées) ou des dicotylédones peu sensibles à l'*Agrobacterium* [33].

La biolistique, par exemple, consiste à bombarder le tissu végétal avec des particules recouvertes d'ADN. Cette technique permet par ailleurs de cibler le génome non plus du noyau, mais des organites cellulaires comme les chloroplastes. De nombreuses copies du génome chloroplastique cohabitent dans une même cellule, le transgène s'exprime massivement – d'où l'intérêt de cette technique pour faire produire par la plante une molécule que l'on veut ensuite recueillir [4].

La micro-injection est réalisée grâce à un micromanipulateur monté sur un microscope photonique inversé. On aperçoit au premier plan la commande pneumatique du micromanipulateur qui permet une approche très fine des deux micros aiguilles. L'une sert à maintenir la cellule à transfert par une légère aspersion imprimée par la seringue située à gauche, l'autre servant à injecter l'ADN grâce à une légère pression exercée par la seringue de droite. Après injection le protoplaste est libéré et mis en culture sur un milieu approprié [33].

Selon Marchand et Reyraud (2000) [4] et Widmer (2004) [34], l'électrofusion (électroporation) de protoplastes, est une méthode utilisée pour la transformation des monocotylédones (maïs et riz), les cellules vont être soumises à un courant électrique de 200 à 600 V, ce choc électrique « perméabilise » la membrane plasmique et permet l'entrée momentanée de molécules d'ADN en suspension

dans le milieu de culture, les protoplastes seront cultivées à fin de régénérer une plante transgénique. Le taux de réussite de cette technique est très faible.

### 2.3.2 Les méthodes de transfert indirect

Parmi les techniques de biologie moléculaire, la transformation des cellules végétales par transfert de gènes fait aujourd'hui partie des techniques de base pour des études de génétique et de physiologie [35].

*A.tumefaciens* et *A.rhizogenes* sont des bactéries pathogènes du sol qui, respectivement, induisent au niveau d'une blessure sur le végétal une tumeur et une prolifération racinaire (bouquet de sorcière). Les recherches ont montré que le pouvoir pathogène était lié à la présence d'un plasmide de grande taille, de l'ordre de 200 Kb [36].

La transformation génétique des cellules végétales par *Agrobacterium* résulte de l'intégration dans leur génome d'un fragment d'ADN, appelé l'ADN-T pour ADN transféré, issu des plasmides Ti (Tumour inducing ou inducteur de tumeurs) ou Ri (Root inducing ou inducteur de racines) portés par ces bactéries. Des études approfondies ont permis, non seulement de bien comprendre les bases moléculaires de la transformation génétique naturelle, mais aussi d'apprendre à utiliser *Agrobacterium* pour réaliser la transgénèse végétale (Figure 2.2.2) [25]. En remplaçant les gènes capables de provoquer la tumeur par le gène que l'on désire introduire dans une plante, on transforme le plasmide bactérien en un vecteur permettant le transfert de gène dans les espèces végétales qui peuvent être infectées par *Agrobacterium* [36].

Pour l'*Arabidopsis* d'après Clouth et Bent [38], qui présente un autre avantage (en plus de ceux qui seront énumérés dans le chapitre suivant) d'aptitude d'insérer dans son génome un transgène par l'intermédiaire d'*Agrobacterium*. La technique de transformation adoptée est celle d'infiltration par vase des bactéries en solution portant le plasmide cloné. Avec cette méthode, il est possible d'obtenir un pourcentage de transformation supérieur à 1%, une graine transformée de chaque 100 graines récoltée à partir d'une plante traitée par

*Agrobacterium*. La condition la plus importante, est le bon état sanitaire des plantes d'*Arabidopsis* à transformer.

Pour les espèces cultivées, il est possible de découper de petits disques dans les feuilles et de les infecter par *Agrobacterium* contenant le plasmide recombiné porteur de gène à introduire. Les disques seront placés dans des milieux adaptés, ils régénèrent en poussant des racines et une plante transgénique est obtenue. Cette technique est bien adaptée à la production de tomate transgénique facilement infectée par *Agrobacterium* et d'autre part produit facilement des plantes à partir d'explants de feuilles [37].

#### 2.4 La technologie de l'ADN recombinant

La recherche en génétique a beaucoup progressé depuis le développement des techniques qui permettent de localiser un segment d'ADN, de l'isoler, de l'insérer dans un vecteur, de l'introduire dans une cellule hôte et éventuellement de provoquer l'expression des gènes qu'il porte. Toutes ces techniques sont connues sous le nom de technologie de l'ADN recombinant ou de génie génétique. Souvent le but recherché est la surexpression d'une protéine sous une forme qui soit la plus proche possible de la molécule naturelle. Ces techniques ont révolutionné la compréhension de la genèse de multiples applications dans les domaines de la santé, de l'alimentation et de l'environnement [39].

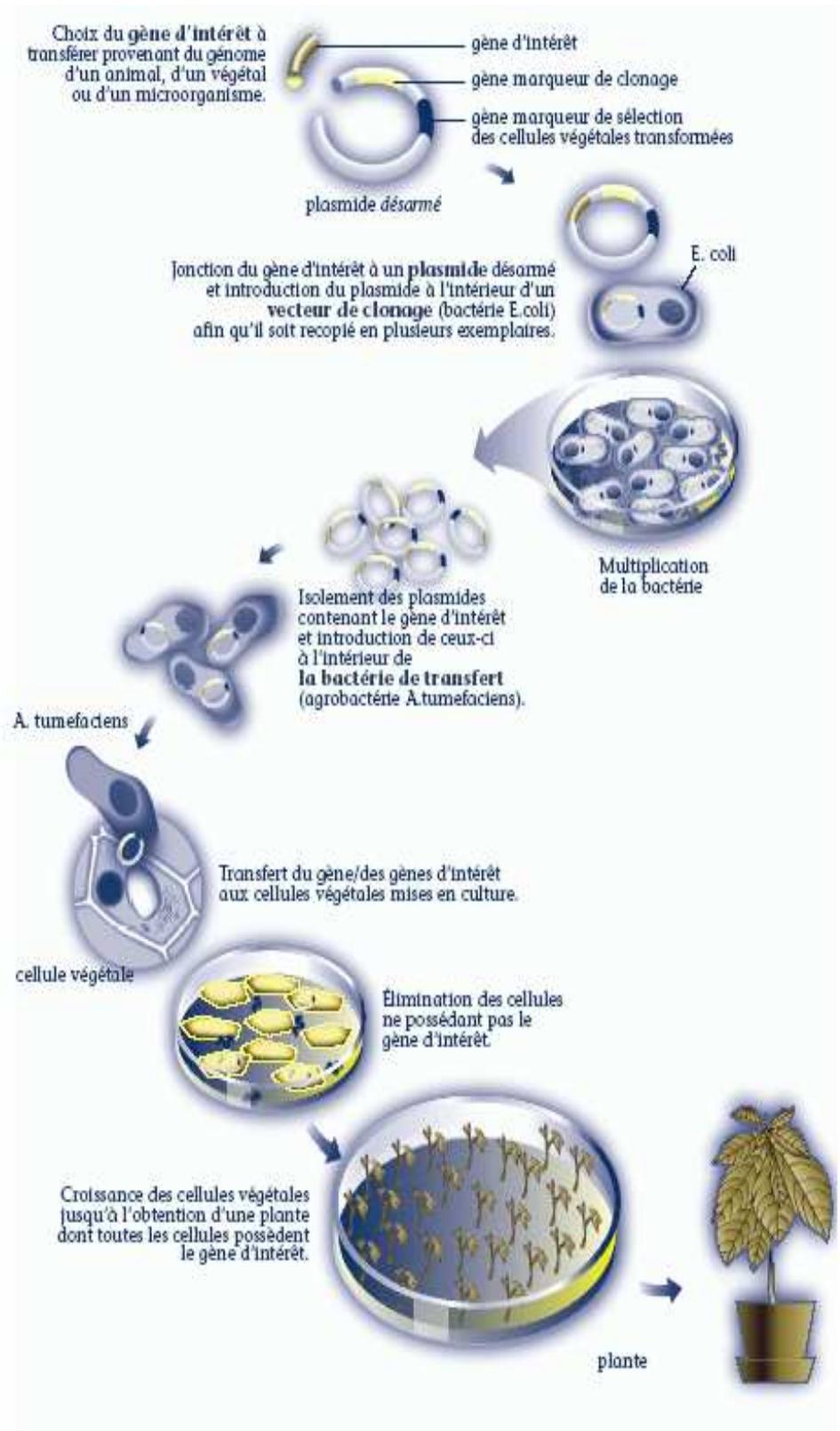


Figure 2.3.2: Méthode de transfert indirect des plantes par *Agrobacterium tumefaciens* [32].

### 2.4.1 L'universalité de transfert de code génétique :

Le déchiffrement du code génétique, c'est-à-dire, la détermination de l'acide aminé spécifié par chaque triplet fut l'une des découvertes les plus remarquables de la génétique des cinquante dernières années [6].

L'expression de l'information génétique peut se résumer de la façon suivante (figure 2.4.1) :



Figure 2.4.1 : Schéma de code génétique

Le code génétique est quasi universel, lorsque l'on compare les séquences des codons chez les Procaryotes et les Eucaryotes, on constate qu'elles codent pour les mêmes acides aminés [14]. En effet un gène cloné à partir de n'importe quelle espèce peut être transféré et fonctionner dans une autre espèce de telles méthodes, s'appuyant sur l'universalité de fonctionnement du vivant. L'étude de la régulation des gènes soit au cours du développement, soit sous l'influence de facteurs hormonaux ou naturels, s'effectue en partie au niveau transcriptionnel, c'est à dire lors de l'étape de synthèse des ARNs messagers, molécules intermédiaires entre le gène et la protéine dont il a codé la synthèse [37].

### 2.4.2 Constituants d'un gène :

Chaque gène qui code pour une protéine est en fait formé d'une succession de régions codantes "exons" et régions non codantes "introns". Le nombre d'introns et la longueur de ceux-ci varient d'un gène à l'autre mais du fait de leur existence le gène est beaucoup plus long que ne laissait prévoir la longueur de la protéine pour laquelle il code. Les introns existent dans la plupart des gènes des Eucaryotes et chez les levures [40].

Les gènes sont à peu près tous construits sur le même principe chacun d'eux correspond à une séquence linéaire d'ADN de quelques centaines à quelques milliers de paires de bases et comprend en général, trois parties

fondamentales : le promoteur, la séquence codante et le terminateur. On trouve également, mais d'une façon contiguë, des séquences régulatrices [33].

#### 2.4.2.1 Le promoteur

Séquence d'ADN placée en amont de la séquence codante et qui est composée de régions conçues indispensables à l'initiation de la transcription et de régions particulières responsables du niveau ou de la spécificité de l'expression d'un gène [4].

On le reconnaît à la présence de quelques séquences caractéristiques ayant des positions à peu près identiques chez tous les promoteurs des gènes chez les Eucaryotes : une CAAT box (ou boîte de CAAT) et une TATA box (ou boîte de TATA). La CAAT box est une portion de la séquence promotrice située à environ 75 paires de bases de sa partie terminale qui joue un rôle dans la fixation de l'ARN polymérase. La TATA box est une courte séquence, riche en A-T, située à environ 25 paires de bases de la fin du promoteur, sur laquelle se fixent des facteurs de transcription [41].

#### 2.4.2.2 La séquence codante

Appelée encore cadre de lecteur est la partie du gène qui est transcrit en ARN messager par l'ARN polymérase. Cette séquence a une taille variable selon les gènes mais une séquence de 1100 à 1500 paires de base peut être considérée comme taille courante [30].

Un ARN produit de transcription d'une séquence d'ADN, est chez les cellules Eucaryotes, transformé en ARN dit messager ; certaines portions (les introns non codants) et les portions restantes (les exons codants) sont liées les unes aux autres (mécanismes d'épissage) [34].

#### 2.4.2.3 Le terminateur

Il s'agit d'une séquence palindromique riche en bases G-C suivie d'une région riche en adénine [33]. Le terminateur possède des séquences

palindromiques, c'est-à-dire des séquences adjacentes, responsables de la formation de l'épingle à cheveux dans la séquence de l'ARN, par l'appariement de ces séquences complémentaires (figure 2.4.2) [40].

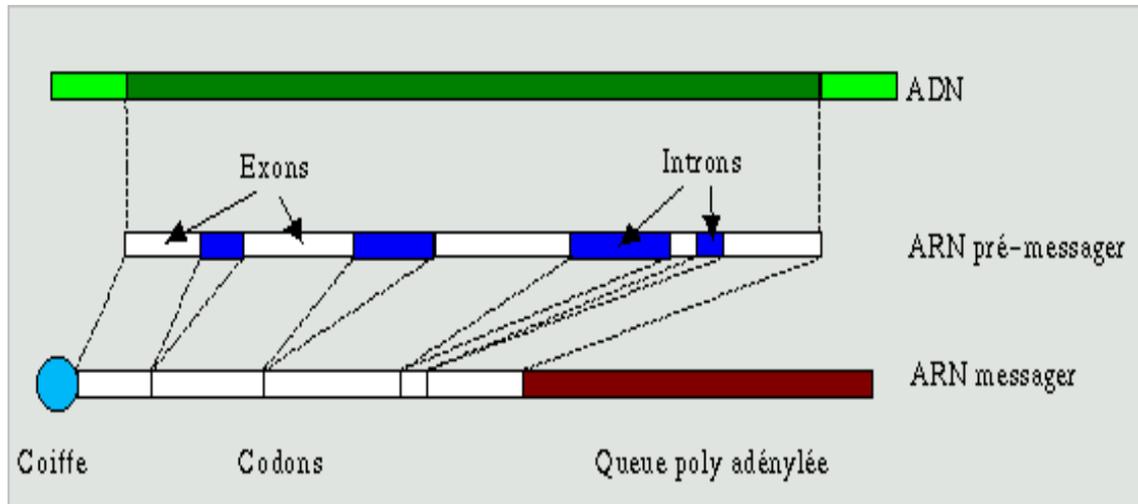


Figure 2.4.2 : La synthèse de l'ARN messenger à partir de l'ADN [42].

### 2.4.3 Les outils de génie génétique

Le génie génétique englobe un ensemble de concepts et de techniques qui permettent d'étudier et de modifier les gènes et leurs fonctions, au cours même du fonctionnement des cellules et des organismes vivants. Ces outils qui se sont développés au cours des trente dernières années grâce aux découvertes de la biologie moléculaire, ont permis des avancées remarquables dans notre compréhension du monde vivant, grâce à l'amélioration et l'automatisation des techniques existantes mais aussi au développement de techniques nouvelles [43].

#### 2.4.3.1 Les outils enzymatiques du traitement de l'ADN *in vitro*

Toute la biologie moléculaire est née de l'identification et la purification d'enzymes bactériens ou virales permettant, *in vitro*, de manipuler les acides nucléiques ADN ou ARN, comme leur découpage, leur collage, leur clonage, la mesure de leur taille, l'établissement de leur séquence, l'identification de variations ponctuelles (mutations). Toutes ces manipulations ont ouvert ainsi la voie à la construction de génomes recombinants (OGM) utiles à la recherche

depuis près de 30 ans ou à des applications dans l'industrie agronomiques ou pharmaceutique (tableau 2.4.3.1) [44].

### Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction sont produites par les bactéries pour se défendre contre les phages. Ces enzymes jouent le rôle de ciseau et coupent l'ADN du phage, ce qui l'inactive. Les enzymes de restriction ne coupent pas l'ADN au hasard, leurs coupures ont lieu au niveau des séquences cibles spécifiques dans l'ADN ce qui explique en partie leur importance pour la manipulation de l'ADN [40]. Cette étape de coupure est souvent appelée Digestion de l'ADN [14].

Selon Meftah et Raymond (2003) [39], la première enzyme de restriction à site de coupure spécifique fut découverte par Hamilton Smith en 1970. Elle a été extraite de la bactérie *Haemophilus influenzae* est nommé Hind II. Depuis plusieurs centaines d'enzymes de restriction ont été découvertes. Les séquences reconnues par ces enzymes comportent en général 4, 6 ou 8 bases.

La coupure peut être de deux types, francs ou collants. Dans le premier cas on obtient des bouts dits francs (avec par exemple Hae III ou Sma I). Dans le second cas, on obtient des bouts dits collants ou cohésifs (avec par exemple Bam HI, Ecol RI, Hind III ou HpaIII) [14].

Envisageons un exemple : l'enzyme de restriction *EcoRI* (provenant d'*E. coli*) reconnaît la séquence suivante de six paires de nucléotides, dans l'ADN de n'importe quel organisme :



Ce type de segment est appelé un palindrome d'ADN, ce qui signifie que les deux brins ont la même séquence nucléotidique, mais dans une orientation antiparallèle. L'enzyme *EcoRI* pratique une coupure à l'intérieur de cette séquence

mais sous la forme de deux décalées, entre les nucléotides G et A (figure 2.4.3.1) :

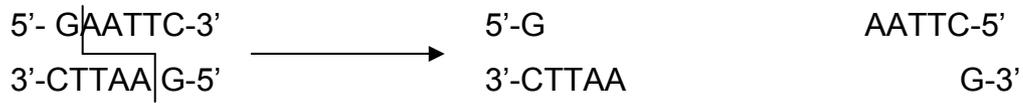


Figure 2.4.3.1: L'action de l'enzyme de restriction *EcoRI* dans le site palindromique.

Cette coupure écalée laisse une paire d'extrémités collantes simple-brin identiques. On dit ces extrémités sont collantes (ou cohésives) car elles peuvent former des liaisons hydrogènes (se coller) avec une séquence complémentaire [6].

Tableau 2.4.3.1 : Exemples d'enzymes de restriction de type II [44].

Nom	Site de restriction ( / indique la coupure)	Site de coupure dans le sens 5' / 3' conséquences et remarques
Eco RI	5' G/AATTC 3' 3' CTTAA/G 5'	Coupure décalée, extrémités cohésives 5' AATT.
Msp I	5' C/CGG 3' 3' GGC/C 5'	Coupure décalée, extrémités cohésives 5' CG.
Hae III	5' GG/CC 3' 3' CC/GG 5'	Coupure franche, entre G et C. Attention : site différent de celui de Msp I, du fait de l'orientation 5'/3'
Sma I	5'CCC/GGG 3' 3' GGG/CCC 5'	Coupure franche, le site Sma I inclut un site Msp I ou Hpa II, le site Sma I étant plus rare que le site Msp I (palindrome plus long), les fragments de restriction Sma I sont en moyenne plus longs que les fragments Msp I
Apa I	5' GGGCC/C3' 3'C/CCGGG5'	Coupure décalée, extrémités cohésives GGCC 3', inclut le site Hae III, donne des fragments plus longs, différent du site Sma I du fait de l'orientation 5'/3'.
Ava II	5' G/G (A ouT) CC 3' 3' CC (TouA) G/G 5'	Palindrome imparfait, coupure décalée, extrémités 5' G (T ou A) C non obligatoirement cohésives.
Bgl I	5'GCCNNN/NGGC3' 3' GGN/NNNCCG5'	Palindrome imparfait avec bases centrales indifférentes, extrémités NNN3' rarement cohésives.
Hpa II	5' C/CGG 3' 3' GGC/C 5'	Coupure décalée, extrémités cohésives 5' CG, site identique au site Msp, mais sensible à la méthylation de la deuxième cytosine (pas de coupure si méthylation), utile pour mettre en évidence des méthylations de l'ADN sur ce site.

### Les ligases

Les ligases sont des enzymes capables de ressouder entre eux des fragments d'ADN quand ils sont mis bout à bout en reconstituant une liaison phosphodiester entre une extrémité 3'OH et une extrémité 5'P [44].

Grâce à ces enzymes (tableau 2.4.3.2), on peut recoller ces morceaux d'origines variées et réaliser de nouveaux assemblages génétiques, dans le but d'éprouver des hypothèses scientifiques ou de conférer une nouvelle propriété à l'organisme étudié [43].

Certaines ligases ( $T_4$  ADN ligase) peuvent ressouder des fragments à bouts francs, d'autres comme celle de *E. coli* n'agissent que si les fragments sont préalablement renaturés par des extrémités cohésives [44].

### Taq polymérase

Taq polymérase est une ADN polymérase issue d'une bactérie (*Thermophilus aquaicus*) vivant dans les sources d'eau chaude. Cette enzyme est stable à haute température et reste active pendant le déroulement de l'amplification de l'ADN *in vitro* [45].

Tableau 2.4.3.2 : Nom, fonction, mode d'action et utilité de quelques enzymes couramment utilisées en biologie moléculaire [44].

Nom	Fonction	Mode d'action et utilité
ADN pol I	Polymérase ( <i>E.coli</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité ADN polymérase 5'/3'</li> <li>- Allonge en 3' OH une amorce ADN ou ARN sur matrice ADN</li> <li>- Activité exonucléasique retour (3'/5') ou 5'/3' (digestion nucléotide par nucléotide des brins en aval de sa progression, hybridés à la matrice).</li> </ul>
Fragment de Klenow	Polymérase ( <i>E.coli</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ADN pol I, dépourvue de son activité exonucléasique 5'/3'.</li> <li>- Utilisée dans la synthèse d'un deuxième brin d'ADN face à un brin ADN matrice : ADNc, marquage de sonde...</li> </ul>
Taq pol	Polymérase ( <i>Thermophilus aquaticus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité ADN polymérase 5'/3' par allongement d'une amorce ADN/ matrice ADN.</li> <li>- Thermostable, utilisée pour les cycles de PCR.</li> </ul>
Transcriptase reverse	Polymérase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité ADN polymérase 5'/3' par allongement d'une amorce ADN ou ARN sur matrice ARN.</li> </ul>
T4 ADN pol	Polymérase ( <i>E. coli</i> infecté par T4)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Activité ADN polymérase 5'/3' et exonucléasique 3'/5', semblable à celle du fragment de Klenow.</li> <li>- Préférable à celui-ci dans certains protocoles (mutagenèse dirigée).</li> </ul>
Terminal transférase	Polymérase	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Allonge les molécules d'ADN par incorporation aléatoire de nucléotides aux extrémités 3' OH.</li> <li>- Utile pour générer des queues polydT ou dU porteuses d'un marquage</li> </ul>
ADN ligase	Ligase ( <i>E.coli</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assure la formation d'une liaison phosphodiester entre 3' OH et 5' P</li> <li>- Utile pour récolter des fragments d'ADN réassociés par hybridation d'extrémités cohésives et constituer de l'ADN recombinant.</li> </ul>
T4 ADN ligase	Ligase ( <i>E. coli</i> infesté par T4)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Assure la formation d'une liaison phosphodiester entre deux extrémités 3' OH et 5' P de deux fragments avec extrémités cohésives ou bouts francs.</li> <li>- Utile pour récolter des fragments à cloner sur bouts francs.</li> </ul>

### 2.4.3.2 Vecteur de clonage et cellules hôtes

Un vecteur de clonage est une molécule d'ADN qui peut intégrer un ADN étranger pour permettre son transfert dans une cellule hôte. Les vecteurs de clonage sont nombreux et nous décrivons ici que les principaux :

#### Plasmide

Un plasmide est une molécule d'ADN circulaire extra chromosomique présente chez la plupart des Procaryotes et chez quelques Eucaryotes. Les plasmides se multiplient de façon indépendante au sein des cellules hôtes et sont transmises de manière régulière au fur et à mesure de divisions. Chaque plasmide contrôle de façon autonome son propre nombre de copie c'est-à-dire le nombre de répliques dans la cellule hôte [39].

La distribution de n'importe quel plasmide à l'intérieur d'une même espèce est généralement sporadique ; certaines cellules possèdent le plasmide, tandis que d'autres cellules en sont dépourvues [6].

La structure typique d'un vecteur de clonage comprend (figure 2.4.3.2) :

- ◆ Une origine de réplication pour assurer la multiplication autonome du vecteur,
- ◆ Une série de sites de restriction aussi appelée région à sites multiples de clonage (MSC) qui offre de grandes possibilités de clonage d'un fragment d'ADN étranger sans affecter l'autofécondation du plasmide ;
- ◆ Un ou deux marqueurs de sélection, ce sont des gènes qui confèrent la résistance à des antibiotiques (Ampicilline, Streptomycine, Tétracycline),
- ◆ Un autre gène est parfois présent avec, placé en son sein, les sites de clonage de l'ADN étranger. L'interruption du gène entraîne une perte de l'activité de la protéine correspondante [39].

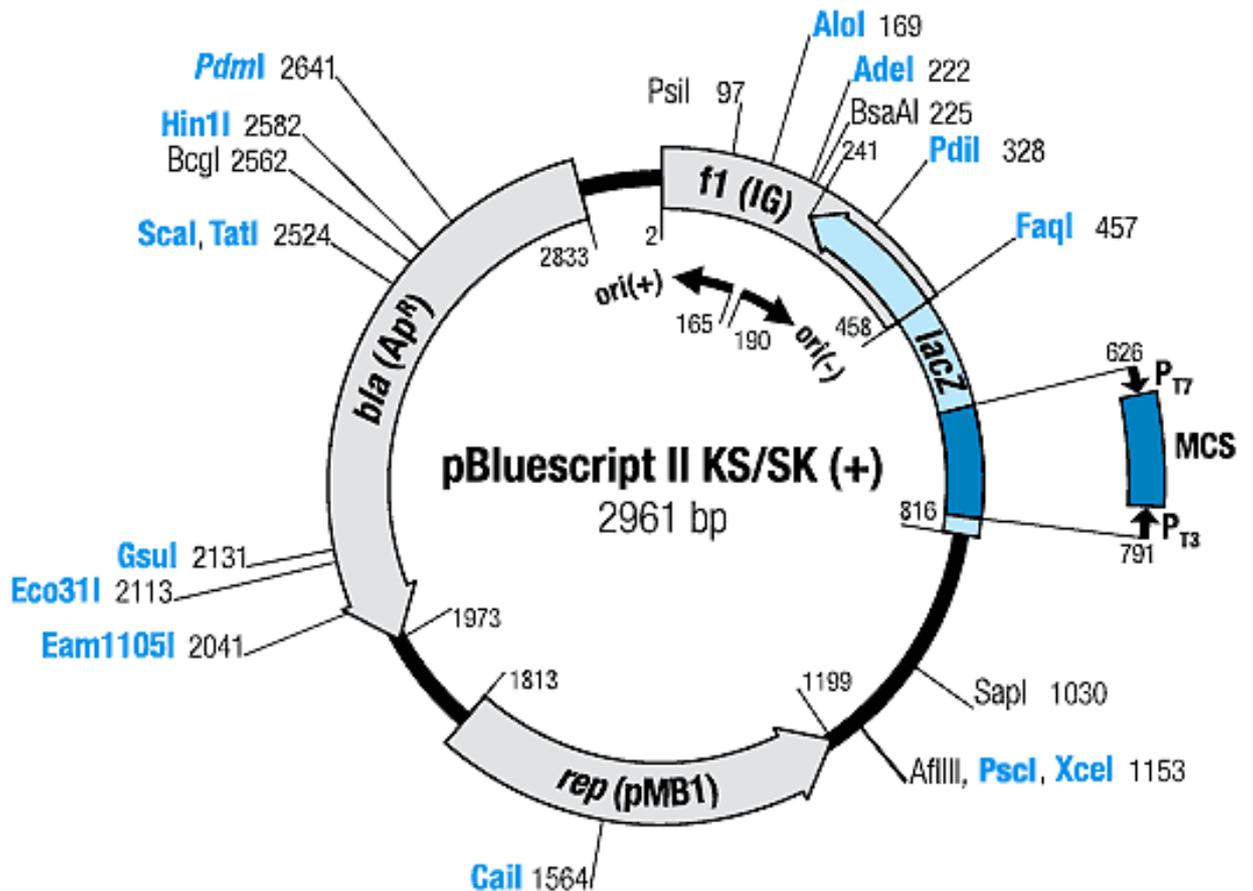


Figure 2.4.3.2 : Schéma de plasmide pBluescript avec les trois gènes et les différents sites de restriction [46].

Bla ( $Ap^R$ ) : gène de résistance à l'ampicilline

Rep : origine de réplication

F1 : origine de réplication

T3 et T7 : promoteurs permettant deux sens opposés de transcription

Ce plasmide bactérien, de près de 2700 paires de bases possède un origine de réplication qui assure sa copie, un gène de résistance à l'ampicilline (amp), le gène lacZ avec son promoteur (plac) et un site multiple de clonage polylinker permettant grâce à des enzymes de restriction spécifiques l'insertion de séquences d'ADN exogènes [33].

Les cellules ayant intégré un plasmide recombinant perdront l'activité de la galactosidase et un test colorimétrique sur colonies permet directement de les identifier. Il suffit d'étaler sur l'agar et qui possèdent une activité  $\beta$ -galactosidase (lac Z intégré) libérons le produit X de couleur bleu. Les colonies bleues correspondant ainsi aux cellules possèdent un plasmide non recombinant alors que les colonies blanches possèdent un plasmide recombinant (gène lac Z interrompu) [39].

### Bactériophage

Les bactériophages ou phages (virus parasites des bactéries) autorisent le clonage de fragments d'ADN très grands car environ un tiers de l'ADN des bactéries peut être remplacé par un ADN étranger [39].

Le phage lambda  $\lambda$  est un vecteur de clonage commode pour plusieurs raisons. Premièrement, une tête de phage  $\lambda$  empaquète de façon sélective un chromosome d'environ 50 Kb de long. La partie centrale du génome de ce phage n'est pas nécessaire à la réplication ou à l'empaquetage des molécules d'ADN de  $\lambda$  chez *E. coli*. C'est pourquoi la partie centrale peut être coupée à l'aide d'enzymes de restriction et de ce fait éliminée. Les molécules chimériques peuvent soit être introduites directement par transformation dans des bactéries *E. coli*, soit être empaquetées dans des têtes de phage *in vitro* [6].

### Cosmides

Ce sont des molécules d'ADN circulaires qui combinent à la fois les avantages des plasmides et des bactériophages. Ils possèdent une origine de réplication plasmidique, un ou plusieurs marqueurs de sélection, une région de sites multiples de clonage et un site cos. Ils permettent le clonage de fragments d'ADN de grande taille. Le cosmide est pour cela ouvert par l'action d'une enzyme de restriction [38].

Les cosmides peuvent transporter des inserts d'ADN environ trois fois plus longs que ceux transportés par  $\lambda$  lui-même (jusqu'à 45 kb). Le secret de cette

construction réside dans le fait que la majeure partie de la structure du phage  $\lambda$  a été détaillée, mais que les séquences de signalisation responsables de l'empaquetage de l'acide nucléique dans la tête du phage (sites cos) sont toujours présentes. Cette structure modifiée permet de remplir les têtes des phages avec quasiment n'importe quel ADN donneur [6].

### 2.5 Criblages des mutants

Une étape très importante dans la mutagenèse est le criblage des mutants on choisissant parmi les plants obtenus ceux portant le phénotype recherché, le repérage de gènes mutés est devenu possible en recourant à différentes méthodes.

L'utilisation de gène NPT II (néomycine phosphotransférase) pour le criblage, ce gène confère une résistance à la kanamycine (antibiotique qui inhibe la synthèse de protéines bactériennes [47]) qui a été largement utilisée, et qui continue de l'être, pour sélectionner des plantes transformées sur un milieu de culture contenant cet antibiotique [48]. La séquence de gène NPT II est issue du transposon Tn5 et placée sous le contrôle du promoteur nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* [49].

La disponibilité des gènes reporteurs en combinaison avec les méthodes de la transformation d'un certain niveau d'efficacité, a fait que les approches de génétique ont ouvert l'accès aux phénotypes recherche repérable. Typiquement le gène reporteur code LUC, GUS ou GFP sont fusionnés au promoteur de gène à étudier [50].

Le test GUS est un test particulier, fondé sur le repérage *in situ* de l'activité de la  $\beta$ -glucuronidase, qui est largement utilisé en biotechnologie végétale lorsqu'il s'agit de connaître les sites d'expression d'un gène. Le principe consiste à créer des modèles transgéniques exprimant une fusion entre le promoteur du gène à étudier et la séquence à étudier codante du gène de la  $\beta$ -glucuronidase, enzyme généralement absente chez les plantes [51]. L'hydrolyse du substrat

synthétique X-gluc se manifeste par l'apparition d'une coloration bleue, ce qui permet la détection histochimique de l'enzyme. Cette analyse présente un désavantage que les cellules à analyser doivent être fixées, donc elles seront tuées pour permettre la visualisation de la coloration bleue [34].

Le criblage des mutants d'*Arabidopsis* peut se faire par l'utilisation de la thermographie infrarouge. Ce type de capture d'imagerie, non distrayant pour les plantes permet de déterminer de façon précise la température entre les plantes normales et un mutant affecté dans l'hormone végétale impliquée dans la fermeture stomatique (l'acide abscissique) [51].

## **CHAPITRE 3**

### **IMPORTANCE ECONOMIQUE DES SEMENCES POTAGERES**

#### 3. L'importance économique des semences potagères dans le monde

Pour un agriculteur, la semence est le facteur le plus important de rendement : une semence de mauvaise qualité signifie la perte de rendement, pour cela il veille à produire la semence de qualité dans sa ferme (une identité de l'espèce, pureté variétale élevée, pureté physique, un bon pouvoir germinatif et un bon état sanitaire [53]), de la sélectionner et de la conserver [54].

#### 3.1 Dans les pays développés

La naissance des grandes firmes semencières a eu lieu après la deuxième guerre mondiale où de nombreux gouvernements se sont rendu compte que la force d'une agriculture est liée à son degré d'utilisation de semences et plants de qualité et se sont dépêchées d'organiser ce secteur par la mise sur pied d'un véritable programme de production d'une part et de la commercialisation d'autre part [55]. Il y a 50 ans déjà quand la semence hybride et les variétés performantes deviennent une clé pour la révolution verte, les scientifiques ont réussi de produire des variétés productrices mais cette productivité exige une utilisation des fertilisants chimiques, des pesticides et avec une irrigation suffisantes [54].

La Hollande par exemple selon Pop Vriand (2005) [56], comme pays vedette dans le domaine de production de semence maraîchère, exporte 85 % de sa semence améliorée, pour se classer en deuxième place des pays exportateurs après les USA, la recherche intense en amélioration des plantes potagères, a permis à ce pays de maintenir cette classe (trois siècles d'activités) et de l'extension de ses produits à 120 pays dans le monde, cela pour les deux types

de semences sèches (tomate, concombre, haricot...) et fraîches (pomme de terres, fraises...), dont notre pays est une de ces directions.

### 3.2 Dans les pays en voie de développement :

Dans un autre côté, il existe des pays dans le monde classés comme pays en voie du développement qui ont préféré de produire leur propre semence et de conserver leurs ressources phylogénétiques, cela par la création des banques de semences de communauté. Le programme de conservation de ces ressources fait intégrer des agriculteurs multiplicateurs pour renouveler les stocks des semences ou des améliorateurs pour la création des nouvelles variétés hybrides lors des problèmes survenant pour la variété dominante. Ces pays savent très bien que ces ressources phylogénétiques constituent la base biologique de la sécurité alimentaire, les diverses espèces locales et la diversité génétique qu'elles renferment jouent un rôle primordial dans le développement économique, social et cultural. Les ressources phylogénétiques locales demeurent la matière première la plus importante pour le sélectionneur [57].

#### Aux Philippines

La patate douce est une des principales cultures aux Philippines selon Hideliza et al (2007) [58], elle occupe une place économique très importante, elle est cultivée dans des terres de deux principales provinces. La culture est multipliée végétativement, les besoins en semence pour un hectare sont estimées de 50 000 plants qui coûtera à un agriculteur environ 11 500 pesos philippins (équivalent de 230 Dollars Américains), pour réduire ces frais en semences, les agriculteurs des deux provinces se sont organisés d'une façon que des multiplicateurs assurent la production de plants de patate douce dans une région avec des choix des parcelles et des plants mères pendant trois mois, et seront cultivés dans la deuxième région pour la consommation. Avec cette stratégie de sélection des plants mères, les mêmes parcelles depuis 50 ans passés sont utilisées toujours pour assurer les besoins croissante en semence.

D'après les mêmes auteurs, un deuxième programme de multiplication est suivi par un laboratoire de culture *in vitro* de l'institut d'agronomie de l'université de

Los Banos, ce laboratoire assure la multiplication des variétés atteintes des maladies virales, donc les plants obtenus par régénération seront de qualité supérieure et d'une quantité élevée permettra d'assurer les besoins des agriculteurs.

#### Au Mali

Les agriculteurs Maliens, selon Schöde et Moggs (2005) [59], sont convaincus que la semence étrangère vendue au marché ne convient pas à leurs conditions pédoclimatiques (des longues périodes de sécheresse), ils ne font appel à la semence importée que très rarement quand le stock de banque de semence atteint des niveaux trop bas.

Les terres de Dogon sont cultivées annuellement par des semences locales (millet, culture d'hiver et les cultures maraîchères), ce stock de semence est suffisant pour couvrir les besoins de 2 ans sans aucun renouvellement, le cas d'une période de sécheresse qu'avait vécu la zone (2000-2002) où l'Etat n'est intervenu par des distribution des aliments (céréales) qu'après l'épuisement des stocks de semence à force de ressemer les terres. Une association Allemande responsable des programmes d'aide d'alimentation German Agro Action, a réalisé une enquête en 2002 d'un contexte socioculturel auprès des agriculteurs, afin de connaître les causes de cette famine, les résultats de cette enquête ont montré que les agriculteurs préfèrent utiliser que de la semence locale.

#### Au pays d'Afrique de Sud

En 1988, 13 pays d'Afrique de Sud se sont organisés en association de SADC (Southern African Development Country) et créant un centre de ressources phytogénétiques (SADCRC), situé au Zambie [60]. Ce centre, selon Kasange (2007) [60], active avec d'autres centres de recherche pour coordiner les activités de conservation de la dite région, jusqu'à ce jour, il renferme jusqu'à 37 000 accessions. Ce stock est renouvelé continuellement *ex situ*, des agriculteurs spécialisés volontaires reproduisent une espèce ou une variété donnée pour rembourser à la fin de campagne le double de la quantité utilisée au

départ. Egalement des échanges ont eu lieu entre les 13 pays pour combler les déficits après les périodes de sécheresse ou d'inondation.

### Au Soudan

Les changements des conditions climatiques au Soudan, spécialement la réduction des jours de pluies de 120 jours à 90 jours, a fait que les agriculteurs ont rencontré des problèmes avec les variétés des cultures stratégiques (arachide, pois, sésame, sorgho et millet) comme variétés à cycle de vie long, pour cela la station de recherche d'EIObeid (1983) qui conservait des variétés locales de zone pluvieuse de pays a programmé (durant 2002-2005) des projets d'amélioration des variétés pour assurer une sécurité alimentaire de plus de 65 000 familles rurales de Kordofan (Ouest de Soudan) qui avait lieu aux fermes pilotes et à la station de recherche, les critères de choix étaient précocité de maturation, tolérance à la sécheresse [61].

D'après le m<sup>e</sup>me auteurs Osman (2007) [61] Les variétés améliorées ont été ensuite multipliées par des agriculteurs dans des conditions d'isolement bien définies, exemple de cette multiplication, durant la campagne de 2005-06 un agriculteur âgé de 27 ans de village Oum Dressa s'est chargé de multiplier 05 variétés de 3 espèces différentes, durant la culture deux contrôles ont été effectués pour certifier la semence produite, 15 autres agriculteurs se sont intéressés de ce projet et se sont intégrés dans le programme de multiplication (15 % de gain est obtenu comparé aux cultures destinées à la consommation), la récolte est devisé entre le banque de semence, les producteurs voisins et des firmes semencières locales [10].

### Au Nicaragua

L'existence d'un centre de stock de semence à Nicaragua, d'après Almekindus (2007) [62], contenant plusieurs variétés d'haricot la culture stratégique de ce pays, a permis d'avoir un matériel végétal de départ pour initier un projet d'amélioration et création variétale des variétés tolérantes au virus de mosaïque doré (GMV) transmis par la mouche blanche (*Bemisia tabaci*), insecte piqueur- suceur et polyphage, introduit en 1990 avec l'introduction des cultures de

tomate et de tabac dans la région. Elle était contrôlée au départ par des pesticides mais la non maîtrise d'utilisation de ces produits a fait apparaître des souches résistantes et a causé des dégâts graves dans les champs d'haricot lors des rotations, une variété améliorée était importée de Columbia entre 1990-93 "DOR364" tolérant le virus mais présentant des caractéristiques organoleptiques et commerciales différentes des variétés locales, elle était rejetée par les consommateurs. La durée de projet d'amélioration d'haricot local d'après le même auteur [62], a duré huit ans, dirigée par un groupe de recherche (centre de recherche, ONG, une association des agriculteurs multiplicateurs) par des croisements entre 15 variétés locales, les deux variétés maintenues sont effectivement tolérantes à la maladie GMV et le plus important ayant les caractéristiques culinaires et la couleur rouge demandée par le consommateur.

### 3.3. L'importance économique des semences potagères en Algérie

L'Algérie dispose des conditions de milieu très favorables au développement de secteur de multiplication de semence, le cas des régions des hauts plateaux et des zones d'altitude qui offrent des conditions optimales en matière de chaleur, luminosité et d'isolement par rapport aux vecteurs potentiels des maladies virales (pucerons et nématodes) [63].

La flore Algérienne est caractérisée par sa diversité florale : méditerranéenne, saharienne, et une flore paléo tropicale, estimée à plus de 3000 espèces appartenant à plusieurs familles botaniques, ces espèces sont pour la plus parts spontanées avec un nombre non négligeable (15 %) des espèces endémiques [64] et malgré ces potentialités demeurent tributaires des marchés internationales pour couvrir nos besoins en semences.

#### 3.3.1. Importance des cultures maraîchères en Algérie

Notre richesse en terre exploitable en agriculture est très limitée, estimée à environ 19 % de la superficie totale du pays dont la SAU ne représente que 18 %, cette dernière connaît des héritages agressifs suite à la progression de l'urbanisation, de désertification due à la fois des avancés de sable du sud, aux incendies et de l'érosion (tableau 3.3.1.1).

Tableau 3.3.1.1 : Répartition des terres Algériennes en 10<sup>3</sup> ha [65, 66]

Vocation des terres	SAU	Pacage et parcours	Terres alfatières	Terres forestières	Terres improductives	Total
Superficie (10 <sup>3</sup> ha)	8227	31054	2916	4 196	191 331	238 174
Pourcentage de la superficie totale	3.45	13.22	1.22	1.76	80.33	-

Les cultures maraîchères selon Baci (1995), Laredj (1999) et Adamou (2005) [67,68 et 69], occupent une place très importante dans l'agriculture algérienne, ainsi que la consommation. La pratique de ce type de culture revêt une caractéristique économique particulière elles occupent près de 5 % de la SAU une superficie de 350 000 ha, deuxième place après les céréales, avec une production de 3,5 millions de tonnes, mais également une caractérisation sociale puisqu'elle crée annuellement plus de 30 millions de journées de travail. Les cultures maraîchères (cultures intensives) de saison occupent une surface de 269 560 hectares, représentant 13 % de la S.A.U totale.

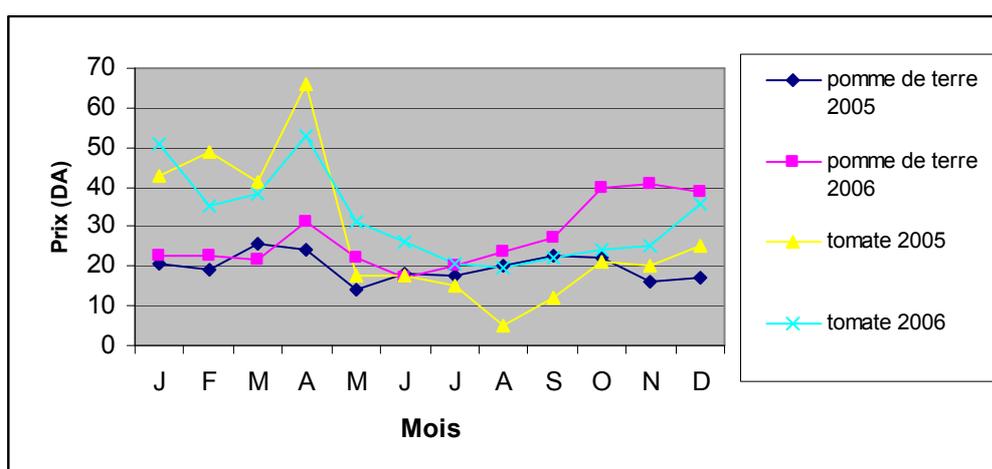
Dans la ration alimentaire, les légumes occupent la deuxième place dans le modèle alimentaire algérien d'une moyenne de 120 Kg/Hab/an, après les céréales avec 200 kg/Hab /an [65] dont la pomme de terre et la tomate représente plus de 50 % de cette ration (tableau 3.3.1.2). L'Algérie qui était traditionnellement exportatrice de fruits et légumes, fait face depuis une quinzaine d'années à de sérieux problèmes d'approvisionnement et de régulation de son marché. La consommation de fruits et légumes frais n'a cessé de croître et continuera vraisemblablement en raison de la forte demande (tableau 3.3.1.2) [67].

Tableau 3.3.1.2 : Evolution de la consommation des légumes entre 1972-2000 (en kg/hab./an) [67, 65].

Années	1972	Moyenne 1981-1984	Moyenne 1985-1988	Moyenne 1989-1992	2000
Légumes	67,0	73,1	101,3	135,5	140
1. Pomme de terre	21,7	33,2	32,5	41,8	46
2. Tomate	10,0	9,0	19,4	22,5	-

Malgré cette importance, les rendements des cultures maraîchères restent très faibles comparés à la moyenne mondiale et à celles des pays méditerranéens, ces rendements fluctuants se répercutent sur les prix des légumes, puisque la balance d'offre est inférieure de celle de demande, le cas de hausses de prix des pomme de terre durant l'année 2007 (figure 3.3.1), cela est due à plusieurs facteurs, entre autre la pratique inadéquate des techniques culturales, les conditions climatiques instables et à l'utilisation des semences importées non adaptés aux conditions climatiques du pays avec des retards d'approvisionnement.

Figure 3.3.1 : Evolution des prix de gros (en DA) de pomme de terre et de tomate (à 13 marchés de gros) durant les deux dernières années 2005 et 2006[19]



Les prix des légumes fraîches double pratiquement durant la période de Ramadhan où nous observons des augmentations des prix de toutes les légumes suite à la forte demande [70].

### 3.3.2 La production de la semence potagère en Algérie

La production de semence des espèces légumières est limitée à certaines espèces dont les quantités produites sont plus ou moins importantes. Historiquement, durant la période coloniale et la première décennie de l'indépendance, l'Algérie exporta la semence de pomme de terre à l'Europe [71], elle était également un terroir pour beaucoup d'espèces légumières citons les exemples de la carotte muscade de Meskiana, les fèves de Doucen, le melon de Biskra, l'oignon rouge de Mascara, courgette verte d'Alger et le melon jaune canari de Chlef [1] dont la semence était produite localement dans des zones bien spécifiées.

Après l'indépendance, une stratégie de développement était adoptés pour développer la filière semence suite au niveau faible qu'avait atteint la production de semence en Algérie (0 % en 1970 et 3 % en 1973) cela par la création des organisations bien structurées et spécialisés dans la création et la multiplication de semences et plants de qualité ainsi le contrôle et l'homologation des variétés nouvellement introduites.

Selon MADR (1990) [54], l'institut technique des cultures maraîchères et industrielles (ITCMI crée en 1974 sous le décret n° 74-90) était chargé de diriger ce secteur, la programmation et la planification annuelle des multiplications de plants de pomme de terres et les semences potagères était établie par le ministère de l'agriculture et l'ITCMI sur la base des adaptations variétales et des disponibilités en semence et de propositions formulés par les wilayets, ainsi que d'autres organismes (UNAPSA , OFLA,) jouant différentes rôles dans la filière, cette structuration a permis le maintien et la régulation de la production, pour atteindre un taux de couverture en production de semence et plants de 43 % durant la période 1985-89 [54].

L'ouverture de pays au marché international a transféré l'activité des opérateurs cités aux importateurs privés, ces derniers faisant recours aux marchés extérieurs pour couvrir nos besoins en semence jusqu'à atteindre une dépendance à l'étranger à 98 %, avec un taux de satisfaction nationale très faible variant de 0.5 à 6 % [1]. L'enveloppe financière mobilisée pour l'importation des semences est très élevée, elle a dépassé 24 millions de dinars durant l'année 2003 [71], elle est en constante augmentation suite à la substitution des variétés fixées par les variétés hybrides (Appendice B), passant des espèces protégées pour se généraliser à quelques espèces de plein champ [68], sept espèces dominent les importations de graines potagères (plus de 70 %) qui sont le melon, pastèque, courgette, tomate, navet et carotte [53], dont les prix sont pratiqués par certains revendeurs selon la demande des agricultures et la saison des cultures.

En plus de coûts élevés de semences introduites, elles peuvent introduire des agents pathogènes inconnus dont leur maîtrise nécessiterait des longues recherches scientifiques, citons l'exemple de semence de tomate hybride durant l'année 2003, qui a causé une année de crise de tomate maraîchère, suite à une maladie virale de l'enroulement des feuilles de tomate en forme de cuillère TYLCV (Tomato Yellow Leaf Curl Tomato), ce virus dont le vecteur est la mouche blanche (*Bemisia tabaci*) a causé la destruction totale des champs de production de tomate de plein champ, les agriculteurs étaient obligés d'utiliser des semences améliorées qui tolèrent le virus, dont le prix a atteint durant l'année citée jusqu'à 300 000 DA/Kg [72]. La maladie s'est généralisée les campagnes suivantes à la culture de tomate de primeur et de saison, les mêmes symptômes sont également observés sur le poivron et la pomme de terre mais avec moins de dégâts.

La conformité des semences importées aux certificats de ventes pose également un autre problème, puisque rien n'assure que le contenu de l'emballage contient réellement la semence de la variété mentionnée, l'exemple de la semence de petit pois importée en 2004, la variété Merveille de Kalvedon connue par les agriculteurs a été remplacée par une autre variété fourragère qui n'atteint pas le stade de floraison, ce qui signifie l'absence de la production.

### 3.3.3 Stratégie d'amélioration variétale des espèces légumières en Algérie

Un programme d'amélioration des plantes est généralement tracé sur la base de disponibilité en ressources phytogénétiques de pays, et de besoins de l'agriculteur, de consommateur, des industries agroalimentaires. Les ressources phytogénétiques algériennes présentent une distribution liée aux conditions pédoclimatiques, elles sont estimées à 3000 espèces concentrées dans les régions Nord de pays, cette richesse diminue au fur et à mesure de la direction vers le sud algérien, mais cela n'empêche pas que le Sahara algérien renferme des espèces végétales d'un intérêt génétique évident suite au pouvoir d'adaptation aux conditions spécifiques de cette région [65].

La mise à la disposition de l'agriculteur d'une variété résistante incite celui-ci à relâcher les pratiques culturales : tendance à la monoculture, fortes densités, abandon d'amendements organiques...etc, ainsi cette variété modérément résistante à une telle maladie déçoit le producteurs qui avait tiré prétexte de résistance pour abandonner les rotations [73].

Les études menées pour les estimations des besoins en semence, font ressortir la nécessité de mobiliser une surface de 129, 22 ha pour couvrir les besoins en semences de près de 128 000 ha, en considérant uniquement les principales espèces, les besoins en semences des cultures maraîchères pour l'année 2004 sont résumés dans le tableau 3.3.2 [1]. Il faut signaler que ces besoins sont estimés pour couvrir la superficie de production de cultures maraîchères de consommation sans les cultures à multiplication végétative ; pomme de terre, artichaut et fraisier.

Tableau 3.3.2 : L'estimation des besoins en semence des cultures maraîchères  
(objectif de l'année 2004) [72].

Espèces	Superficies (objectif 2004) (ha)	Dose (kg/ha)	Besoins en semences certifiées (qx)	Superficies nécessaires à la semence certifiée (ha)	Besoins en semence de base (kg)	Superficies pour la semence de base (ha)
Tomate						
Fixée	16 500	0,5	82,50	82,50	16,50kg	1,65
Hybride	4 500	0,2	-	1	-	-
Poivron						
Fixée	23 000	1	230	230	115kg	1,65
Hybride	3 000	0,5	-	-	1	-
Tomate industrielle						
Fixée	25 000	0,5	125.	125	25	0,25
Hybride	5 000	0,2	-	-	-	-
Melon / Pastèque	24 000 100	3,5 2,5	871,5 -	2 486 -	6,97 -	27,88 -
Concombre						
Fixée	2 800	2,5	70	35	140	0,7
Hybride	200	2,5	-	-	-	-
Petit pois	18 000	100	18 000	1200	144 qx	72
Aubergine						
Fixée	2 500	0,5	12,50	5	1,5 kg	6,00
Hybride	60	0,25	-	-	-	-
Haricot	7 000	80	5 600	466,6	279,9 kg	23,33
Courgette						
Fixée	2 000	3,5	70	17,5	52,5	1312,5
Hybride	7 500	1,5	-	-	-	0,13
Carotte	11 000	5	550	110	440	0,88
Navet	9 000	5	450	90	360	0,72
Oignon	35 000	1,5	450	175	175	0,58
Total	128 000	-	26 586,5	6 022,6	16 705,46	129,22

L'introduction des semences améliorées occupent de plus en plus des superficies au détriment des ressources génétiques locales, pour tant cette dernière est bien adaptée aux conditions dans lesquelles elle est créée et a évolué [57].

Une variété améliorée, selon Deshayes (1991) [26 et Macijaweski (1991) [27], ne veut pas dire forcément qu'elle va résister à tous ses parasites, même cette tolérance portée par son génome n'est pas durable si des techniques culturales ne sont pas respectées. L'utilisation de ces variétés introduites caractérisées par une forte homogénéité génotypique et d'une faible valeur adaptative a entraîné dans beaucoup de cas la disparition des cultures locales alors que cette dernière renferme une variabilité génétique considérée pour les améliorateurs une réserve de gène dans laquelle ils chercheront les caractères à transférer dans la variété intéressante.

La tendance à la monoculture de pomme de terre, malgré les choix des variétés tolérantes au mildiou (*phytophthora infestans*), a provoqué la généralisation de cette maladie aux parcelles de production à la région d'Ain Defla (première zone productive au pays), également l'application abusive des fongicides après les changements climatiques des mois de Février-Mars, sans respecter aucunes de notes d'utilisation de ces produits (doses et moments d'application, mode d'action de produit, la durée de rémanence) , pour que la satisfaction en ce légume stratégique reste déséquilibré pour presque une année (2007), et de faire recours encore une autre fois à l'importation de pomme de terre de consommation et de multiplication.

### 3.3.3.1 Les contraintes de développement de la filière semence potagères en Algérie

Un ensemble de contraintes a fait que cette filière reste confrontée aux problèmes pour son développement, citons quelques unes :

- L'absence de coordination entre les structures intervenantes dans la filière
- Faiblesse dans l'encadrement technique de cette filière et d'appui à la production.

- L'éparpillement des zones de production rendant l'encadrement et le suivi technique difficile.
- La concurrence sévère imposée par des firmes étrangères très structurées scientifiquement, techniquement et commercialement pouvant produire à des prix bas n'encourageant pas la production nationale
- Absence d'infrastructures adéquates nécessaire au contrôle, à la maintenance et à la conservation du matériel végétal de base.
- Manque de moyens spécifiques d'extraction à la parcelle par groupe d'espèce et de conditionnement permettant une bonne présentation.
- La production de semence de base à l'ITCMI et de faible quantité (tableau 3.3.3.1), également la qualité est compromise aux facteurs de détérioration due au manque des moyens de stockage et de conservation.

Tableau 3.3.3.1 : La liste de la collection de semence maintenu par l'ITCMI (2005-2006) [70]

N	Espèces	Variétés	Total par espèce	
			m <sup>2</sup>	Kg
01	Tomate	Aicha Saint pierre	110	2,155
02	Poivron	Doux marconi	400	0,4
03	Piment	Corne de chèvre	100	0,47
04	Concombre	Super Marketer	720	10,900
05	Aubergine	VLH Ronde de Valence	1240	7,85
06	Courgette	Verte d'Alger	1040	32,8
07	Haricot	Djadida Cotender	1200	63
08	Petit pois	Merveille de Kalvédon	320	04
09	Fève	Aguadulce	2000	300
10	Oignon	Rouge local Jaune local	3950	5500
Total	10	14	12070	5921,57

La conservation de collection des ressources phylogénétiques touchent également 03 espèces maraîchères : tomate, arachides (10 populations), niébé (14 populations) et 06 espèces condimentaires : fenugrec, nigelle, coriandre, lin oléagineuse, cresson, sisymbre. Cette conservation est réalisée par des multiplications de ces variétés dans les stations expérimentales de l'ITCMI afin de renouveler le stock de collection et d'éviter la dégénérescence. Toutes ces ressources phylogénétiques sont très faiblement exploitables, seulement quelques variétés de tomate sont utilisées dans des essais d'hybridation pour plus de 5 campagnes agricoles, réalisés à la station expérimentale de Staouéli, faisant l'objet d'un axe de recherche de l'Institut National d'Agronomie pour la création des hybrides performants.

Au même titre, plusieurs instituts de recherches et techniques effectuent la collection des ressources phylogénétiques des zones dont ils activent et la vocation de la région, le cas de l'Institut Technique de Développement de l'Agriculture Saharienne (ITDAS) avec ces différentes stations expérimentales au nombre de cinq (tableau 3.3.3.2) dont il s'occupe de maintenir une collection des fèves et de conserver un ensemble d'espèces maraîchères.

Tableau 3.3.3.2 : Liste des activités et actions réalisées par l'ITDAS [69].

	Sites	Actions réalisées
<u>Prospection et caractérisation</u> Culture de fève	Zibans Oued Righ Biskra	Inventaire et caractérisation d'écotypes de fèves.
<u>Conservation</u> Culture de fève	Biskra El Oued	Constitution d'une collection de semence de fève.
<u>Production de matériels de base</u> Plants maraîchers	Biskra -Adrar El Oued Ouargla	Réalisation de programme de multiplication et de production de semences et de plants.
<u>Diffusion</u> Plants maraîchers	El Oued Biskra -Adrar Ouargla	Distribution de semences et de plants aux producteurs des régions sahariennes.

En plus de ces activités de conservation des ressources phytogénétiques des espèces maraîchères, l'ITCMI a dirigée durant la campagne 2004-2005, deux enquêtes nationales, la première était pour l'inventaire des produits de terroir et la deuxième pour un recensement des agriculteurs multiplicateurs de semence potagères. Ces deux enquêtes ont révélé que les agriculteurs ont joué un rôle très important dans la maintenance de ressources phytogénétiques Algériennes, certes qu'ils ne sont pas nombreux. Dans la wilaya d'Alger, Blida et Médéa (zone d'action de la station de Staouéli) les produits de terroir maintenu sont : la patate douce de Birtouta, courge de Chréa, carotte muscade de Mehalma, fève bouséta de d'El Hamdania.

Pour les agriculteurs multiplicateurs dans la même zone, les espèces auto produites sont de nombre de 19 dans 29 exploitations, la majorité de cette production est destinée à l'autosuffisance de besoins de l'exploitation, mais il existe entre ces agriculteurs ceux qui commercialisent leur semence (des espèces carotte et chou et les semences des légumes feuilles : laitue, épinard, coriandre, céleri...), soit aux agriculteurs voisins ou bien vers les marchés locaux, dans les deux cas elles sont vendues en vrac.

Les semences fraîches, le cas de la pomme de terre qui est multipliée par des agriculteurs multiplicateurs dans 19 wilayets de pays dont les parcelles de multiplications sont contrôlées périodiquement par les cadres de Centre National de Contrôle et de Certification des semences et plants (CNCC). En parallèle, un laboratoire de biotechnologie localisé à Bab Ezzouar de l'Entreprise Nationale d'Aménagement des Réserves et de Parcs Nationaux et de Loisirs (E.N.A.R.P.), il s'occupe de la multiplication végétative *in vitro* des plants de fraisier et de pomme de terre à partir de culture de méristème et/ou de boutures et de préserver les espèces en voie de disparition, ce laboratoire est encadré par des chercheurs universitaires et des ingénieurs expérimentés, et d'une capacité de production annuelle d'environ 15 millions de plants sains.

## **CHAPITRE 04**

### **MATERIELS ET METHODES**

#### 4.1. Présentation de laboratoire de biologie moléculaire

Le département de génétique et biotechnologie horticole de l'institut agronomique méditerranéen de Chania (I.A.M.Ch) est spécialisé dans la recherche dans les domaines de génétique, biotechnologie, marquage des espèces végétales et les variétés, détection des O.G.M. et l'étude de post récolte.

#### 4.2. Objectif des essais de caractérisation moléculaire de la plante *Arabidopsis thaliana*

L'objectif de cette expérience est la maîtrise des manipulations de génie génétique, partant de l'isolement de l'ADN génomique et plasmidique, préparation de la cassette de transgène, son clonage dans la bactérie, amplification bactérienne et *in vitro* d'une séquence d'ADN, l'optimisation de cette amplification jusqu'à atteindre l'étape de la transformation par *Agrobacterium* de transgène au tissu végétal et enfin le criblage des plantes transgéniques ou les mutants obtenus. Egalement l'extraction d'un rendement maximale d'ARN génomique première étape de création de banque d'ADN complémentaire et la détection de protéine synthétisée au stade de l'extraction.

La maîtrise de ces étapes, nous permettront d'accéder à la caractérisation moléculaire des espèces légumières d'une importance économique nationale et de créer ainsi le banque de gène, de marquer génétiquement les variétés locales, d'améliorer ces dernières pendant une courte durée en faisant appel à la transformation génétique. Ces techniques nous permettront également de contrôler les introductions variétales et de vérifier la conformité des lots des semences importées aux caractéristiques demandées.

Dans ce chapitre, nous allons passer par les étapes suivantes :

- ❖ Isolement de l'ADN génomique et plasmique ;
- ❖ Isolement e l'ARN génomique,
- ❖ Amplification *in vitro* et bactérienne de l'ADN,
- ❖ Création e gène chimère NPT II ::HsP<sub>90</sub> ::GUS ;
- ❖ Transformation de gène par *Agrobacterium*,
- ❖ Criblage des mutants.

### 4.3. Extraction de l'ADN génomique

#### 4.3.1. Objectif

L'extraction du matériel génétique ADN à partir de tissus des espèces vivantes est une étape primordiale pour la caractérisation moléculaire d'une espèce donnée, pour le marquage moléculaire d'une variété, la détection des variabilités génétiques au sein de l'espèce, des mutations ou transgenèse des variétés.

L'adaptation de protocole d'extraction (Appendice C) à l'espèce étudié, *Arabidopsis thaliana*, pour récolter le maximum du matériel génétique avec une qualité supérieure est l'objet de ces manipulations. Ce même protocole peut être utilisé pour d'autres espèces végétales.

#### 4.3.2. Le matériel végétal

Le matériel végétal de départ utiliser est constitués de feuilles de la plante *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia. Celle-ci est cultivée dans des alvéoles 3.5' avec un substrat du tourbe, sous les conditions du laboratoire (température 25°C, un photopériodisme de 16 heures et luminosité et 8 heures d'obscurité et humidité relative 60 – 70 %).

#### 4.3.3. Isolement de l'ADN

L'extraction et la purification des acides nucléiques sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant. Le protocole d'extraction d'ADN (appendice C)

utilisé est sensiblement le même quelle que soit la nature de l'échantillon. L'utilisation des kits commerciaux d'extraction (les minis colonnes) les manipulations seront réduites, et l'ADN est obtenu en moins de deux heures.

#### 4.3.3.1. Extraction

A partir de 100 mg du matériel de départ (deux feuilles) sont broyées à l'aide d'un mortier et pilon en présence de l'azote liquide (-180°C) qui congèle les cellules végétales, l'action du broyage détruit la membrane cellulosique. A la fin une poudre blanchâtre est obtenue, est transférée à un tube de 1.5ml.

Une quantité de 400 µL du tampon d'extraction EDTA est ajouté au broyat, l'EDTA se lie au magnésium (entre autres métaux) le cofacteur des ADNases, dont sa chélation conduit à une réduction dans l'activité des enzymes. L'utilisation des détergents SDS et CTAB pour piéger les débris des cellules, le SDS a la propriété de séparer les deux couches de membrane cellulaire et nucléaire et de piéger ainsi les protéines et les lipides. Les CTAB forment un complexe avec les polysaccharides.

#### 4.3.3.2. Purification

Pour la purification de l'ADN et l'isolement des autres molécules, un volume de Phénol-Chloroform-IsoAmylAlcool (25 :24 :1) est utilisé pour dénaturer les protéines, après centrifugation le tube comporte trois couches distinctes, les débris au fond du tube ensuite une couche de phénol et l'ADN au top du tube. Quand la cellule contient des débris une deuxième purification peut être nécessaire.

#### 4.3.3.3. Précipitation

Le traitement successif avec l'éthanol 70% permet une purification et une élution supplémentaire des sels résiduels. Egalement, l'éthanol déshydrate l'ADN ce qui entraîne l'agrégation des molécules en multiples brins qui forment des fibres blanchâtres visibles et le culot obtenus est séché à l'air libre puis redissout dans de l'eau distillée stérile.

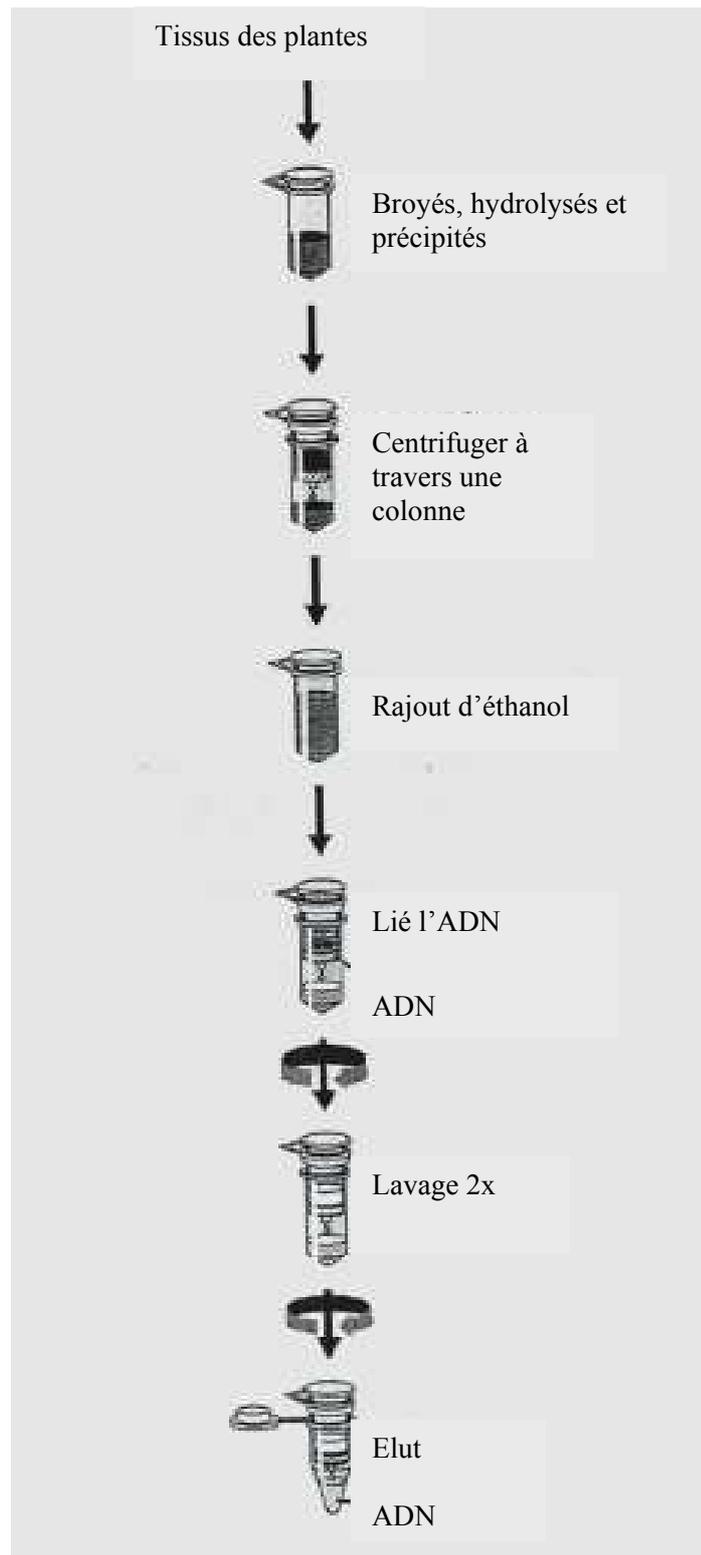


Figure 4.3.3 : Procédure générale pour l'extraction d'ADN avec ADNase [75].

#### 4.3.4. Quantification de l'ADN isolé

L'extraction de l'ADN d'un échantillon biologique se fait dans le but des analyses et observations ultérieures, la quantité et la qualité de ce rendement en ADN sont des facteurs importants pour procéder à des observations ou manipulations ultérieures. Parmi les méthodes de mesure de quantité d'ADN isolé, l'électrophorèse et la spectrophotométrie sont les deux méthodes utilisées dans cette étude.

##### 4.3.4.1. Par spectrophotomètre

Le spectrophotomètre utilise la transmission de la lumière à travers une solution pour déterminer la concentration d'un soluté à l'intérieur de la solution. L'appareil fonctionne suivant un principe simple dans lequel de la lumière d'une longueur d'onde connue traverse un échantillon où la qualité d'énergie lumineuse transmise à l'aide d'une cellule photoélectrique placée de l'autre côté de l'échantillon.

La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé blanc. L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'une ration. Les protéines absorbent à 280 nm, le ratio  $A_{260}/A_{280}$  est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique, l'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8.

Le dosage d'une solution d'ADN par spectrophotomètre se fait avec plus de précision, permet de connaître la nature des contaminants puisque chaque molécule a sa propre longueur d'onde d'absorption. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbones, les peptides, les phénols ou les composées aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio  $A_{260}/A_{230}$  devrait être environ 2,2 [76].

La solution d'ADN à mesurer est préparée en diluant 5  $\mu$ l dans 195  $\mu$ l d'eau, l'appareil de spectrophotomètre est vérifié par mesure d'absorbance d'eau qui doit être égal à zéro, en suite l'échantillon est mesuré et à partir de système

d'imagerie un graphe et un tableau des résultats sont obtenus. La concentration de l'ADN (mesurée par  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ ) est calculée par la formule suivante:

$$[ADN] = \frac{DO_{260} \times FC \times Dilution}{1000} = \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

DO: densité optique lue à la longueur d'onde 260nm

FC: facteur de conversion  $50\mu\text{g}/\text{ml}$  pour l'ADN [75].

La concentration de l'ADN isolée est obtenue en  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  Pour vérifier la pureté de l'échantillon, deux ratios seront calculer de A260/A280 et A260 /A230 [76].

#### 4.3.4.2. Par électrophorèse

Le principe d'électrophorèse est basé sur la nature chimique et le poids de la particule à étudier, pour la charge, les molécules chargés positivement migrent vers le cathode et les molécules chargés négativement migrent vers l'anode, alors que celles dont la charge est neutre ne migre pas. Pour le poids moléculaire, les molécules d'un poids moléculaire élevé se déplacent lentement sur le gel contrairement à ceux avec un poids léger qui migrent plus rapidement [77].

Le gel d'agarose à 01 % est utilisé pour la migration. La solution tampon TAE est préparée à partir d'une solution mère par élution, dont un volume de 80 ml est utilisé pour dissoudre la poudre d'agar, le TAE joue un rôle pour augmenter la conductivité électrique du gel formé. Un faible volume de bromure d'éthidium BET est ajouté a la solution qui facilite la localisation de échantillon après migration.

La solution obtenue est chauffée dans un bain marée pour fondre l'agar. Elle prend un aspect translucide et utilisé pour la formation de moule de migration (quand elle atteint une température de 45 à 55 °C).

Un peigne spécial est utilisé pour marquer les empreintes des puits des dépôts et des lames pour limiter les bordures du gel ; la solution du gel est versée dans le moule sans atteindre le sommet du peigne. La durée de solidification est située entre 30 minutes à 01 heure.

Après ce temps, les lames et le peigne sont retirés et la solution TAE est versée pour couvrir le gel de quelques millimètres, la solution facilite la migration des molécules en créant un champ électrique. Les échantillons d'ADN à analyser par électrophorèse doivent être préparés au préalable pour faciliter leur migration. Une solution de charge (voir annexe) est ajoutée (un volume) qui permet de densifier l'ADN migrant (04 volumes).

A l'aide de l'extrémité de la micropipette, nous repérons l'emplacement des puits dans le gel et immergé dans du tampon, une fois repéré l'ADN est versé (5 à 15  $\mu\text{L}$ ) et puisque la solution à une coloration bleu de celle de la solution de charge, le remplissage devient visible. Généralement le premier puit est rempli par le marqueur de taille, ensuite, et par ordre (pour les distinguer à la fin d'électrophorèse) les autres échantillons sont déposés, nous veillons à chaque fois de changer les trips pour éviter toute contamination.

La cuve est fermée et après le branchement des cordons de la cuve à l'alimentation, le câble rouge coté anode et le câble noir coté cathode, une application d'une tension de 100V. Une formation des bulles d'air de coté anode est un signe de début d'électrophorèse.

La migration est repérée par l'avancement de bandes bleues dans le gel, quand les échantillons sont bien séparés et les bandes de marqueurs de tailles bien positionnés, l'électrophorèse est arrêtée, environ après 45 minutes.

L'électrophorèse est une méthode d'estimation de la densité et la qualité des échantillons, c'est à partir de l'inflorescence des bandes, la distance de migration et la forme de bande qui peut nous faciliter l'interprétation des résultats. Le marqueur de taille et les témoins blancs sont des indicateurs de pureté et de

quantité d'échantillon. La figure 4.3.4.2 représente les différentes possibilités d'image des gels.

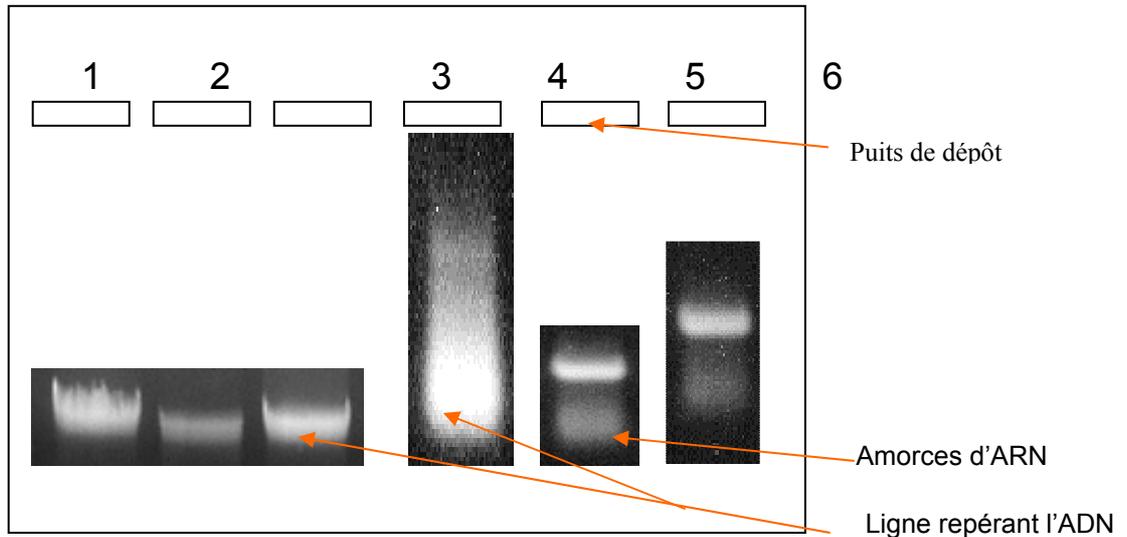


Figure 4.3.4.2 : Schéma représentatif des différentes formes de bandes de migration de séquences d'ADN sur un gel

Les bandes de migration obtenues dans la figure 4.3.4.2 donne une indication sur la nature et la densité de l'échantillon. La première image de numéro un (01) indique que l'ADN isolé est très dense, car l'image est sous forme d'une flamme. Les échantillons 2 et 3 ne réalisant pas de flamme expliquent une faible densité et donc une présence d'ADN peu dense. Pour l'image quatre (04) la séquence d'ADN est découpée en petits morceaux, la migration de ces fragments donne la forme barbouillée. La dernière image montre à la fois la bande d'ADN d'une densité moyenne et au fond du gel de migration les petites séquences d'ARN. Ces dernières suite à leur nature monocaténaire et leur taille très inférieure aux molécules d'ADN, se localisent au fond du gel.

Un des puits doit contenir le marqueur de taille, qui est un ensemble de séquence d'une taille connue, par exemple un plasmide dont sa taille et les séquences sont connues et qui est digéré par une enzyme pour donner de petits fragments construisant l'échelle des tailles. Un autre puit contient le témoin négatif ; ce témoin contient tous les composants de la mixture sauf l'ADN. Le

témoin négatif est un indicateur d'absence d'ADN contaminant, sa bande n'est pas visible.

#### 4.4. L'optimisation de PCR

La réaction PCR (Polymerase Chain reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné pour obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation dépend de la composition en bases des oligonucléotides amorces, elle est légèrement inférieure à la température de demi dénaturation ( $T_m$ ).

Les cations bivalents  $Mg^{2+}$ , sont des cofacteurs indispensables pour la réaction de polymérisation avec Taq polymérase. La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents  $Mg^{2+}$  et de cations monovalents ( $K^+$  ou  $NH_4^+$ ) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN /ADN.

##### 4.4.1. Objectif

Pour réaliser une amplification sélective du fragment recherché, l'expérimentateur va devoir optimiser les conditions expérimentales. La technique de gradient PCR est utilisée en biologie moléculaire pour optimiser un des facteurs de cette technique et spécialement pour la température d'hybridation des amorces utilisés qui est généralement inconnue ( $T_m$ ). Dans cette expérience, nous allons tester deux facteurs, la température d'hybridation à deux niveaux 47 et 56 °C et le deuxième facteur, la concentration de  $MgCl_2$  agent catalyseur de la réaction avec deux niveaux 1.5 et 3 mM dans le but est de tester avec quel traitement nous obtenons les bons résultats.

##### 4.4.2. Matériel biologique

Le matériel génétique utilisé dans cette expérience pour être amplifié *in vitro* par PCR, est une séquence d'ADN isolée à partir de tissus de la plante *Arabidopsis thaliana* (voir 4.3). L'ADN est extrait et purifié de gel de migration.

#### 4.4.3. Extraction et purification de l'ADN à partir du gel d'agarose

A partir du gel d'agarose déposé sur la table d'UV la bande d'échantillon d'ADN à purifier est localisée, puis en utilisant une lame de rasoir propre, en prenant soin à ne pas couper la bande d'ADN, le maximum du gel au tour de la bande de l'échantillon est prélevé. Puis il est transféré dans un tube de 1.5 mL.

Le contenu du tube est pesé (gel + ADN), puis 3 volumes du tampon d'extraction sont ajoutés à un volume de gel. Le micro tube est incubé à 50°C dans le bloc chauffant pendant 10 mn pour dissoudre l'agarose, par vortex tous les 2 – 3 mn. Une colonne de filtrage QIAGEN est placée sur un tube à collection de 2mL. Quand l'échantillon est versé dans la colonne, le tube est centrifugé à vitesse maximale durant 30 secondes.

L'éluât est jeté et la colonne est remise dans le même tube à collection, ensuite elle est lavée avec 750 µL de tampon de lavage et centrifugé 30 secondes. L'éluât est jeté et recentrifugé à vitesse maximale durant 2' pour enlever toute trace d'éthanol contenu dans le tampon de lavage. La colonne est placée sur un nouveau tube à collection de 1.5 mL, 50µL d'eau est ajoutée au centre de la colonne et le filtre s'imbiba durant 30 mn. Pour précipiter l'ADN, 2.5 X d'éthanol et 0.1 X acétate de sodium 3M pH 3.2 est ajouté.

Enfin le tube est incubé au congélateur à -80°C durant 10'. Le tube est mis à la centrifugeuse à la vitesse maximale pendant 20 mn puis un volume d'éthanol 70 % est ajouté à la solution, pour le passé à une dernière centrifugation à la vitesse maximale pendant 10'. Le surnageant est éliminé et le culot est séché et il est dissout avec 10 µL de l'eau est conservé à – 20 °C.

##### 4.4.3.1. Préparation de l'ADN à amplifier

En début d'expérience, la quantité des amorces et les dNTP est élevée au même temps la concentration en ADN est très faible. Au fur et à mesure que le brin d'ADN est synthétisé, la concentration des premiers diminue. La difficulté en début d'expérience se situera essentiellement au niveau de la probabilité de

rencontre des amorces avec l'ADN s'accroissent. Cette augmentation de la quantité s'accompagne de modification du milieu réactionnel.

La viscosité du milieu réactionnel augmente, les quantités d'oligo nucléotides amorces et de dNTP diminuent. De plus, la synthèse d'ADN est accompagnée de la libération d'ions pyrophosphates qui en concentration élevée inhibent l'activité de la Taq polymérase. En fin d'expérience PCR, les conditions expérimentales auront changé jusqu'à devenir de plus en plus défavorables à une bonne activité enzymatique. On peut comprendre alors que le nombre de cycles lors d'une expérience PCR soit limité (généralement entre 30 et 40 cycles). Les tubes soumis à la PCR sont mis dans un bloc thermo réfrigérant au sein duquel la température peut monter ou descendre de 1 à 2 degrés par seconde. Cette fluctuation de température est réglable par un programme informatique selon les nécessités des réactions biochimiques.

La réaction PCR est extrêmement rapide et ne dure que quelques heures (2 à 3 heures pour une PCR de 30 cycles). L'amplification *in vitro* par PCR passe par trois étapes comparables à celles déroulant dans la cellule végétales lors de la duplication de l'ADN, ces étapes sont comme suit :

- ◆ la dénaturation de l'ADN réalisée à haute température (0.5 à 1 minute de 94°C) conduit à la séparation des brins d'ADN.
- ◆ l'hybridation des amorces spécifiques se réalise à une température notée  $T_m$  déterminée en fonction de la composition nucléotidique des amorces (0.5 à 2 minutes à 50-60 °C)
- ◆ l'élongation des brins d'ADN est effectuée à 72 °C (0.5 à 1 minute).

Dans des tubes nous avons préparés le mixte destiné au PCR, les quantités sont pour un nombre de 16 tubes (tableau 4.4.4).

Tableau 4.4.4 : Les conditions de la PCR et les réactifs préparés

Les réactifs		Une réaction	Conditions de PCR		
Ampli taq gold	10x	10 µl	Etape	°C	Temps
dNTPs	10mM	2 µl	1 <sup>ère</sup> étape	97	2 min
Amorce 01	10 µM	10 µl	Dénaturation	94	30 sec
Amorce 02	10 µM	10 µl	Hybridation	47 / 56	2 min
Taq	5 u/µl	1 µl	Extension	72	1 min
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1.5/3µl	Etapes additionnelles	72	-
dd H <sub>2</sub> O		-	Nombre de cycles	30	-
Total		100 µl	-	-	-
ADN	2 ml	2 µl	-	-	-

Un volume de 1µl des deux concentrations de MgCl<sub>2</sub> de 1,5 et 3 mM est ajouté dans huit (08) tubes. Tous les tubes sont placés dans la PCR machine, en effectuant les réglages des températures à tester. En utilisant deux blocs différents de la machine, de telle façon à avoir deux traitements (concentration de MgCl<sub>2</sub>) qui subissent la même température.

## 4.5 Isolement de l'ARN génomique

### 4.5.1. Objectif

L'extraction de l'ARN génomique à partir d'un matériel vivant est souvent adoptée pour l'étude des protéines synthétisées à un stade donné dans la vie de cet organisme. Pour la réalisation d'un banque d'ADN complémentaire (ADN c) puisque l'ARN est un ADN codant à une protéine après épissage (élimination des introns, l'adhésion de la coiffe et la queue de poly adénine) une reverse transcriptase des ARN permet d'avoir le gène codant de la protéine recherchée sous forme d'ADN c.

#### 4.5.2. Matériel et méthodes :

##### 4.5.2.1. Matériel végétal

A partir des feuilles de la plante *Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia cultivée au laboratoire, nous avons procédé aux différentes étapes d'extraction d'ARN suivant le protocole d'extraction (Appendice D) qui pourra être utilisé pour d'autres espèces.

##### 4.5.3. Méthodes

Après le broyage de tissu végétal (trois feuilles) à l'aide du mortier et pilon, refroidi préalablement avec de l'azote liquide, la poudre obtenue est transférée dans un tube de 1,5 ml (figure 4.5.3).

Afin d'extraire les protéines, nous utilisons des volumes de Tri EDTA, SDS et le phénol-Chloroform-Isoamylalcool, avec des agitations et centrifugations pour accélérer la séparation des débris des acides nucléiques. La dernière opération d'extraction est répétée pour éliminer plus de protéines.

Les acides nucléiques ADN et ARN sont précipités en ajoutant de l'éthanol, pour éliminer le reste des impuretés. Pour précipiter l'ARN, un volume de chlorure de Lithium (LiCl 8M) est ajouté au tube. L'ARN est ensuite gardé durant une nuit à 4°C.

Pour la purification, des lavages à l'éthanol 70 % sont effectués afin de précipiter l'ARN qui est déshydraté puis dissous dans de l'eau distillée stérile.

##### 4.5.3.1 Quantification de l'ARN isolé

L'extraction de l'ARN à partir des tissus végétaux afin de procéder à des études et analyses, est très délicate car la quantité existante dans les tissus est très faible de l'ordre de 10 pg ( $10^{-12}$ g) des ARN dont la majorité se trouve sous la forme d'ARN ribosomal (80 %). L'extraction d'un rendement moyen dans le cas des ARN est un acquis. Dans notre expérience, nous avons utilisé les deux méthodes de quantification ; l'électrophorèse et la spectrophotométrie utilisées pour l'ADN.

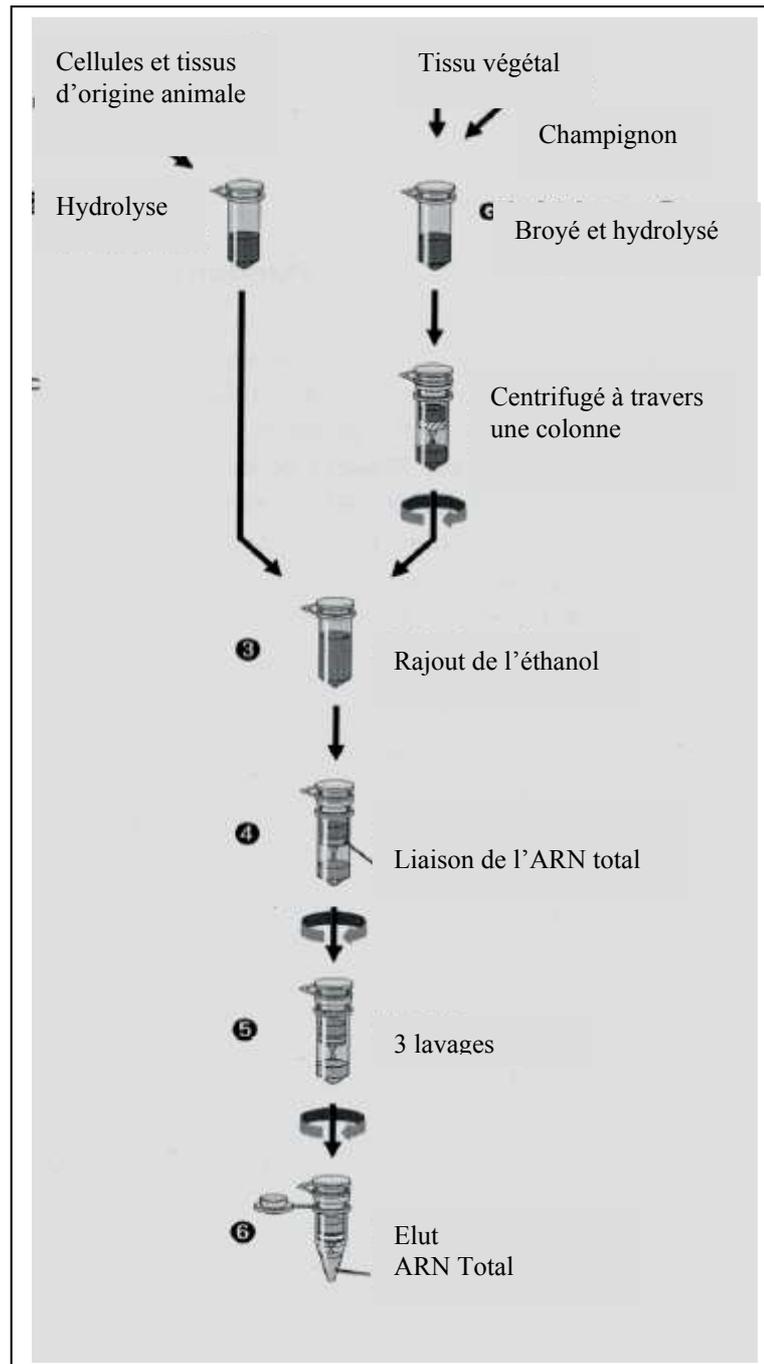


Figure 4.5.3.: Procédure générale pour l'extraction d'ARN avec ARNase [75].

#### 4.5.3.1. Par spectrophotomètre

Après l'étalonnage de l'appareil du spectrophotomètre et la préparation de la solution à analyser, l'absorbance est mesurée. Une courbe est obtenue et la concentration des ARN est calculée en utilisant la formule suivante :

$$[ARN] = \frac{DO_{260} \times FC \times Dilution}{1000} = \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

DO: densité optique lue à la longueur d'onde 260nm

FC: facteur de conversion 40µg/ml pour l'ARN [75].

La concentration de l'ARN isolée est obtenue en µg/µl. pour vérifier la pureté de l'échantillon, un ratio d'A260/A280 est calculé, un échantillon pur doit avoir un ratio de 2. Les hydrates de carbones sont absorbés à la longueur d'onde de 230 nm, dans le cas d'un échantillon pur le ratio A260/A230 doit avoir une valeur de 2,2 [76].

#### 4.5.3.2 Par électrophorèse

Le gel de la migration utilisé est le gel d'agarose, sauf que la préparation des dépôts se fait avec d'autres réactifs. Nous ajoutons des volumes spécifiés de Formamide, de Formaldehyde, pour protéger l'ARN de prendre une structure secondaire, et de le préserver sous une forme linéaire, utilisant le tempon de la migration MOPS spécifique aux ARNs. Les manipulations avec les ARN doivent se faire dans la glace pour assurer leur forme linéaire.

L'image du gel de migration des ARNs est représentée dans la figure 4.5.3.2:

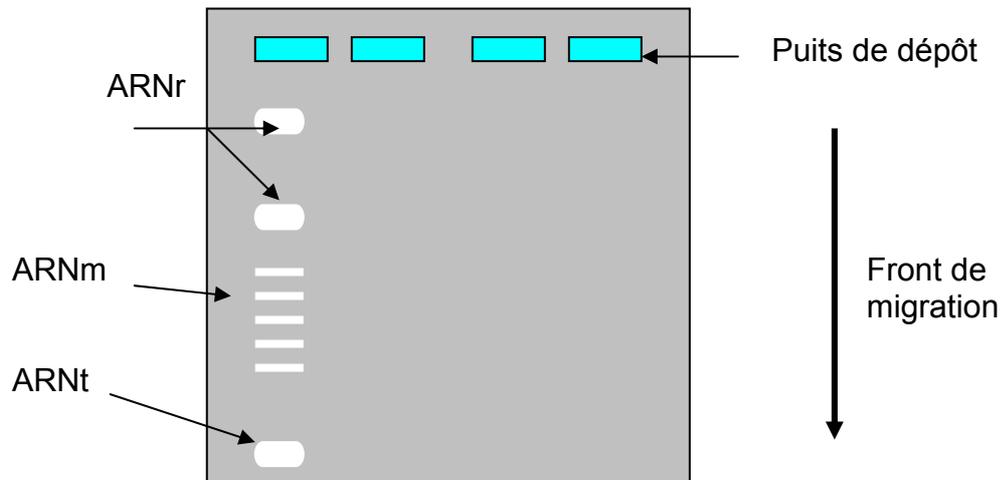


Figure 4.5.3.2: Schéma représentatif d'un gel de migration des différents types d'ARNs.

## 4.6 Transformation génétique des plantes d'*Arabidopsis thaliana* par *Agrobacterium tumefaciens*

### 4.6.1. Objectif

L'objectif de cette transformation génétique par *Agrobacterium tumefaciens* est l'étude de l'expression de gène HsP<sub>90</sub> par l'analyse de son promoteur dirigé par le gène reporteur GUS cela durant le développement de la plante afin de localiser son activité *in vivo* après transcription en protéine.

### 4.6.2. Matériel

#### 4.6.2.1. Matériel végétal

La plante d'*Arabidopsis thaliana*, écotype Columbia est utilisé dans cette partie. La plante est cultivée dans sur un substrat de la tourbe dans des pots de 3,5 pousses, sous les conditions de laboratoire : température de 23 – 25 °C, humidité relative de 60-70%et un photopériodisme de 14 à 16 heures de lumières.

#### 4.6.2.2. Matériel bactérien

Les deux espèces bactériennes *Echerischia coli* et *Agrobacterium tumefaciens* sont utilisés pour la transformation et la multiplication de la cassette de transgène, en utilisant le plasmide avec des marqueurs sélectifs.

#### 4.6.4 Méthodes

##### 4.6.4.1 Extraction et purification d'ADN à partir du gel de migration

La séquence d'ADN isolé à partir des tissus de la plante d'Arabidopsis, quantifier par migration sur gel d'agarose, est ensuite purifier de gel par la méthode des colonnes de filtration, à la fin l'ADN obtenu est amplifié *in vitro* par PCR.

##### 4.6.4.2 Isolement de l'ADN plasmidique

Pour l'isolement de l'ADN plasmidique, nous avons adopté la technique de lys alcalin. Partant des cellules bactériennes, contenant le plasmide pBluescript le protocole d'extraction est suivi :

On procède, en premier lieu, à cultiver les bactéries sous conditions de croissance à 37 °C et avec agitation va et vient durant une nuit. Des solutions d'extraction sont préparées, pour hydrolyser les membranes cellulaires, chélaté le  $Mg^{2+}$  cofacteur des ADNases. Ajoutant de le SDS dans des conditions alcalines afin de piéger les lipides et les protéines et les lipides des membranes.

Les acides nucléiques sont transformés dans l'acétate du Sodium pour protéger l'ADN contre la solubilisation. A la fin, un volume de Phénol-Chloroform est ajouté pour précipiter les débris cellulaires (carbohydrates, phénols..), des lavages successifs par l'éthanol 70% sont procédé à la précipitation.

##### 4.6.4.3 Construction de transgène

Le transgène à transférer est une chimère constituée de plusieurs gènes dont chacun code pour une protéine donnée et seule la protéine à localiser est le facteur variant.

L'utilisation des enzymes de restriction pour digérer les bordures de gènes puisque les séquences des gènes sont connues, misent dans des conditions favorables aux réactions, des enzymes de ligation soudent les bords des deux gènes.

#### Le gène de résistance NPT II :

NPT II (neomycine phosphotransférase) confère une résistance contre la Kanamycine, antibiotique utilisé pour sélectionner les bactéries portant le transgène de ceux dépourvus.

#### Le promoteur HsP<sub>90</sub> :

Le promoteur HsP<sub>90</sub> utilisé joue le rôle de régulateur de la synthèse de protéine recherchée : protéine des ATP des cellules.

#### Le gène reporteur GUS

L'activité du  $\beta$ -glucuronidase d'hydrolyser le substrat de 5-bromo-4chloro-3indoxyl  $\beta$  coronique en 5-bromo-4chloro indoxyl, en donnant une coloration bleue indiquant le tissu d'expression du gène à étudier.

#### Séquence d'ADN :

La séquence d'ADN génomique est isolée à partir des tissus d'*Arabidopsis thaliana*, ensuite amplifiée par PCR. La séquence est d'une taille de 100 pb.

#### Le gène terminateur nos

Le gène terminateur nos, issue du virus du mosaïque de concombre, utiliser pour mettre fin à la transcription de gène.



Figure 4.6.4 : Schéma de la cassette de transgène cloné au plasmide pBluscript et transféré aux plantes d'*Arabidopsis*.

#### 4.6.4.4 Clonage de transgène

##### 4.6.4.4.1 Clonage

L'enzyme de restriction EcoRI est utilisée pour couper le vecteur, le plasmide pBluscript, au niveau des sites multiples de clonage à la séquence palindromique GAATTC. Une quantité de 5 µl de l'enzyme est ajoutée à 10 µl de l'ADN en présence du tampon de digestion, puis ajusté avec de l'eau à 50 µl, les tubes de réaction passent toute une nuit à 37 °C puis conservés à -20°C.

##### 4.6.4.4.2 Ligature

La réaction de ligature demande la présence de quantité égales à 1 :3 (vecteur : insert) de fragment inséré et du plasmide. Il y a donc quantification de l'ADN sur agarose gel. Ensuite, le fragment et les plasmides sont mis en présence de 2 µL du tampon de ligature, de 1 µL de ligase provenant de bactériophage T4 et d'eau distillé pour un volume total de 20µL.

##### 4.6.4.4.3 Transformation

Les cellules compétentes sont gardées sur la glace. Misent avec les plasmides contenant l'insert d'ADN, pendant une heure. Un choc thermique est effectué par un passage de 5 min à 37°C puis les cellules sont déposées sur la glace pour environ 3 min avant d'ajouter le milieu LB. Cette alternance de température permet une dilatation de la membrane cellulaire et l'introduction du plasmide.

##### 4.6.4.4.4 Amplification et sélection

Le milieu de culture LB est préparé en présence de 20 µl de X-gal sélectif et de 20 µl d'IPTG. Quand les boîtes de dessèchent (misent dans l'étuve) ; la suspension bactérienne est y étalée sur la boîte et transférée dans une étuve à 37 °C durant une nuit pour multiplier les cellules ainsi que l'insert. A partir des colonies contenant l'insert (colonies blanches), une suspension bactérienne est préparée.

#### 4.6.4.5 Transformation des plantes

A l'aide des cellules bactériennes une solution à base de siluate est préparée, qui est versée dans le vase de transformation. Quand les plantes d'*Arabidopsis* atteignent le stade de floraison (10 à 15 cm) elles sont aptes à la transformation. Les plantes doivent être en bon état sanitaire pour obtenir des résultats fiables.

Les fleurs des plantes à transformer, en début nouaison sont éliminés ; seules les fleurs fermées et / ou ouvertes sont gardées

Une culture d'*Agrobacterium* est faite en solution de 25 mL (LB + kanamacyne) pendant une nuit et qui est préparée 2 à 3 jours avant l'infiltration.

Les cellules sont collectées après centrifugation, puis suspendus dans 1L de milieu d'infiltration (ML) (DO =2.0, 500mL), une culture de 400 mL donne une quantité suffisante pour infiltration de 6 pots.

La solution d'*Agrobacterium* est versée dans la cuvette de vacuum, les plantes sont trempées dans la solution sens inverse, le pot contenant le sol et les racines sont maintenus hors la solution par deux bandes de ruban adhésif, ces derniers ayant le rôle du support.

La cuvette est fermée et mise sous pression pendant 2 à 10' à 400 mmHg, les bulles sont formées autour des parties de la plante immergée et à la fin (4 plantes) la solution prend un aspect foncé.

La plante est prélevée de la cuvette, mise en position couché, bien séchée à l'aide du papier hygiénique, et déposé dans une boîte (en gardant la même position) est recouverte d'un film plastique pour maintenir l'humidité. Ces conditions favorisent l'activité d'*Agrobacterium* dans les tissus végétaux et le transfert de l'ADN-T.

#### 4.6.4.6 Le suivi cultural des plantes :

Le lendemain, les plantes gagnent leur sens original et sont mises dans une chambre de culture (18 heures de lumière et 6 heures d'obscurité avec humidité relative de 80 -90 %) pendant une semaine et sont irriguées tous les 2 jours. Les pots sont transférés au laboratoire pour 2 à 3 semaines.

Durant le remplissage des gousses, les plantes sont irriguées tous les jours. Les semences de la même plante sont récoltées et conservées dans un seul tube.

Les semences sont mises dans de l'eau stérile puis étalées dans les boîtes du Pétri avec l'agarose à 1 %. Les boîtes sont séchées sous l'hôte, pour que les graines demeurent collées au milieu. Le nombre de graines généralement utilisé est de 100 et peut être très important cependant en dépassant 2000 graines l'antibiotique perd son efficacité.

Les semences sont traitées par le froid 4°C pendant 2 jours puis transféré à la chambre de culture. Après 7 jours, les plants sont suffisamment développés et il est facilement identifiable les plants transformés (couleur vert foncé) de ceux non transformés (couleur vert clair à marron).

#### 4.6.4.7 Préparation des tissus pour visualisation

Dans deux tubes de 2 mL, nous avons séparé les plantules colorées et non colorées et nous avons rajouté de l'acétone froid 90% pendant 20 min dans les conditions de froid (boîte de glace) pour préfixer les tissus végétaux, ensuite la solution fixatrice de couleur est ajoutée (50mM de phosphate de sodium, tampon de pH 7,0, Triton X100, 10mM de ferrocyanide de potassium) les tubes sont incubés pendant 12 h à 37 °C.

En fin les tissus sont déshydratés par des passages successifs dans différentes concentrations croissantes d'éthanol (15%, 30%, 75% et 85%) après cette étape la coloration bleue des plantules est visible à l'œil nu, les plantes sont prêtes à être visualisées sous microscope optique (Appendice E).

## **CHAPITRE 05 RESULTATS ET INTERPRETATIONS**

Les manipulations de biologie moléculaires sont généralement très longues, dépassant au minimum, les deux jours et passent par différents instruments, cela nécessite une rapidité d'exécution de telle façon que la majorité des manipulations s'effectuent en parallèle des autres. D'une manière générale, nous avons essayés durant cette étude, de respecter les rendements horaires habituels des manipulations afin d'obtenir des résultats fiables.

### 5.1 L'isolement de l'ADN

L'utilisation de matériel végétal de départ, 100 mg des feuilles de la plante *Arabidopsis thaliana*, durant le stade de début montaison pour l'isolement de l'ADN génomique et suivant le protocole d'extraction cité dans le chapitre 4.3, les résultats de quantification et de qualification du rendement sont interprétés dans cette partie.

#### 5.1.1 Quantification par spectrophotomètre

Cette méthode de quantification a l'avantage de rapidité et de précision, la quantité d'ADN isolé est obtenue en valeur numérique, ainsi que les contaminants, un échantillon est mesuré dans 5 minutes, mais il faut étalonner l'appareil périodiquement pour le passage à la mesure des autres échantillons.

Les résultats de la quantification de l'ADN génomique par spectrophotomètre sont illustrés dans la figure 5.1 et le tableau 5.1 suivants :

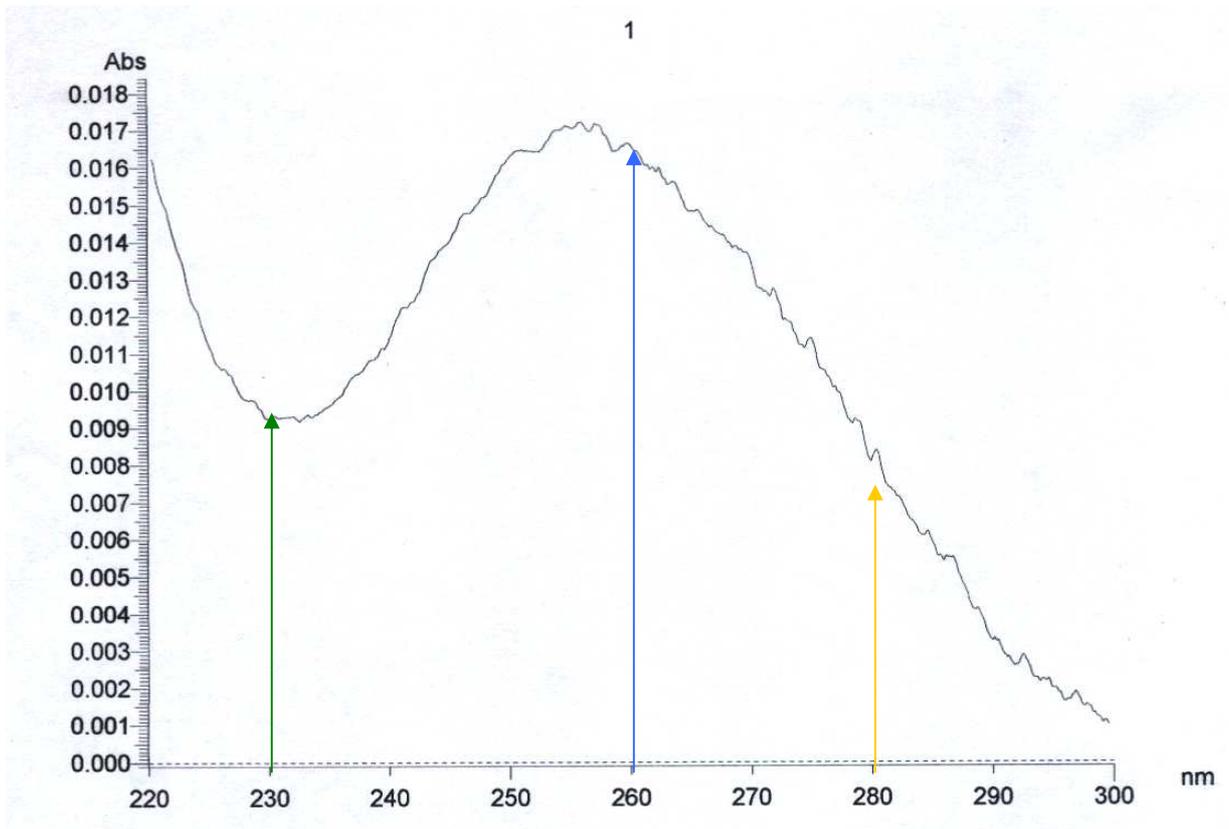


Figure 5.1 : Le graphe de l'absorption à UV de l'échantillon d'ADN isolé à partir de tissus d'*Arabidopsis thaliana*

Tableau 5.1 : Les densités optiques de l'échantillon 01

Longueur d'onde nm	Absorbance
280	0.008
270	0.013
260	0.017
250	0.016
240	0.011
230	0.009

Il est clair que l'ADN isolé est d'une bonne qualité puisque il ne contient pas une quantité élevée des impuretés. D'après la figure et le tableau 5.1 les polysaccharides (absorbé à la longueur d'onde 230 nm) et / ou les protéines (absorbé à la longueur d'onde 280nm), comparée à celle des acides nucléiques (absorbé à la longueur d'onde 260 nm).

Le ratio entre l'absorbance à 260 nm et à 280 nm ( $A_{260} / A_{280}$ ) nous indique sur le degré de pureté des acides nucléique est égal à 2,1, valeur dépassant le ratio spécifique à l'ADN 1,8, ce qui signifie que la quantité des protéines est légèrement faible, se sont dégradés lors de l'extraction soit à cause de non respect de temps nécessaire de SDS et CTAB, ou bien de la mauvaise élimination de ces derniers avant le passage à une autre étape.

Egalement le ratio  $A_{260} / A_{230}$  est un moyen d'estimer la pureté de l'échantillon. Dans notre cas il est faible car il est égal à 1.8 au lieu de 2.2 pour un ADN pur, ce qui signifie que la présence de polysaccharides et de phénols a dépassé la norme, soit à cause de l'élimination rapide de chloroforme avant de précipiter tous les impuretés ou bien le non respect des durées de manipulation.

Pour la quantification de l'ADN, nous avons utilisé la formule suivante :

$$[ADN] = \frac{DO_{260} \times FC \times Dilution}{1000}$$

DO : la densité optique lue à la longueur d'onde 260 nm

FC : Facteur de Conversion est de 50  $\mu\text{g} / \text{mL}$

Dilution : dans ce cas est de 750 / 2.

La quantité d'ADN extrait de cet échantillon est de 0.314  $\mu\text{g} / \mu\text{L}$

### 5.1.2 Quantification par agarose gel

Le deuxième moyen utilisé pour la quantification de l'ADN isolé des tissus d'arabette c'est l'électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %. D'après la figure 5.1.2, l'image de gel d'agarose de migration nous donne des informations supplémentaires sur la qualité et la quantité de l'échantillon d'ADN isolé.

Les manipulations de cette quantification sont longues, la préparation de gel de migration, sa solidification et la préparation des échantillons pour les dépôts nécessite une durée d'environ de 2 heures, pour la migration, la visualisation des gel sur table fluorescente et la prise des images peuvent être obtenue après plus

d'une heures, dont les résultats obtenus ne seront pas des valeurs exactes, mais l'avantage est que un nombre élevée (jusqu'à 21 échantillons) des échantillons peuvent être analysés sur le même gel (figure 5.1.2).

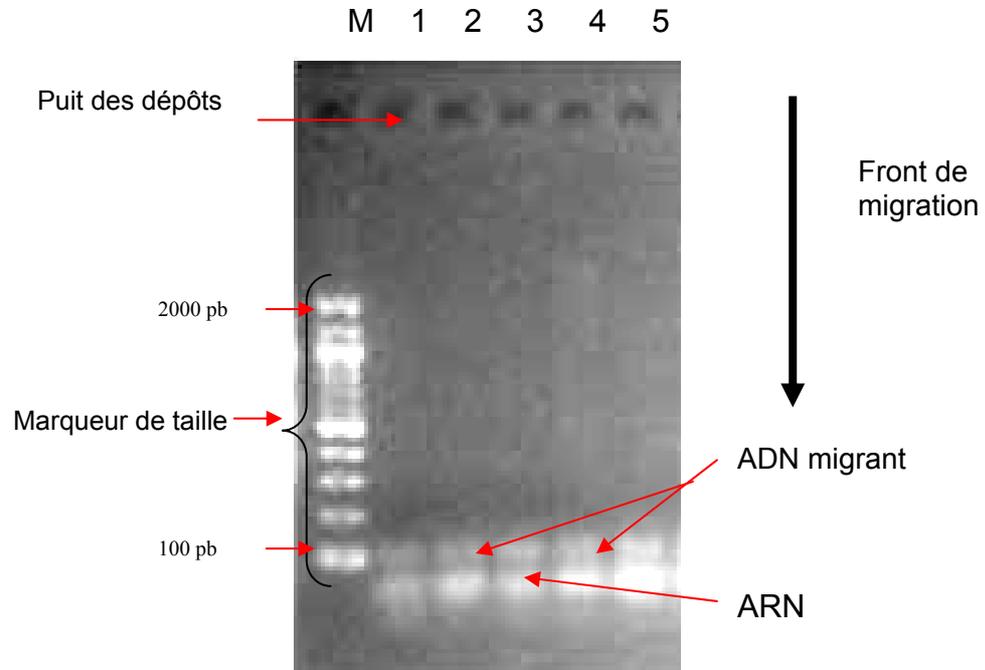


Figure 5.1.2 : L'image de migration des dépôts d'ADN sur agarose gel

Le contenu de premier puit (M) représente les marqueurs moléculaires de taille (M), chaque bande est l'équivalent d'une quantité de 100 paires de base, et selon la fluorescence de la bande en comparaison avec la figure 5.1.3 fournis par le fournisseur des marqueurs moléculaires, une estimation de la quantité d'ADN isolé peut être donnée. Les chiffres 1 à 5 représentent le nombre des échantillons d'ADN à analyser. La distance de migration des bandes de ce marqueur peut être utilisée comme indicateur de fin de l'électrophorèse.

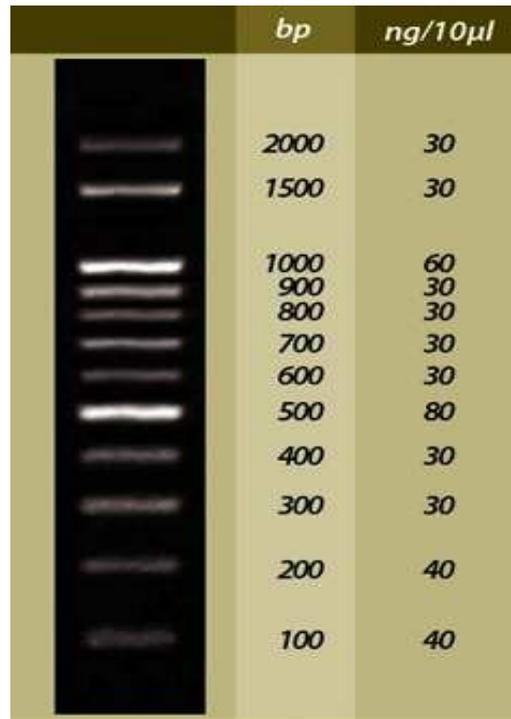


Figure 5.1.3 : Marqueur moléculaire de taille de Real Biotech Corporation (100 bp – 2000 bp)

Les dépôts de la figure 5.1.2, codés par les chiffres de 1 à 5 représentent les échantillons. En comparant les échantillons étudiés avec le marqueur moléculaire de taille, nous avons pu donner une estimation de la longueur de l'ADN extrait à partir de tissus qui est environ de 110 pb et selon l'inflorescence des bande des échantillons contiennent une quantité approximative de 30 ng / 10  $\mu$ L, se qui est déjà confirmé par la lecture sur spectrophotomètre 0,314  $\mu$ g.

L'obtention d'une bande unique pour chaque échantillon signifie que l'ADN extrait n'est pas morcelé, au même temps la quantité obtenue est faible comparé à un isolement d'une quantité élevée présentant une bande sous forme d'une flamme, la longueur de fragment est supérieure à 100 pb, dernière bande dans l'échelle, donc la taille de notre échantillon est estimée d'environ 110 pb.

Pour les bandes situées à la fin du gel, ceux-ci représentent à la fois les amorces d'ADN d'une longueur inférieure à 100 pb spécialement pour l'échantillon 5 où l'inflorescence est marquée, et les différents types des ARNs.

## 5.2 L'isolement de l'ARN génomique

La quantité des ARN dans une cellule généralement est très significative si on la compare à celles des ADN, également son isolement des tissus est très difficile suite à la longue durée nécessaire pour les manipulations et la résistance des ARNases aux basses températures. Donc la faible quantité qui peut être isoler ne peut échapper totalement aux lyses des enzymes.

### 5.2.1 Quantification par spectrophotomètre

Les résultats de l'isolement de l'ARN génomique à partir de l'échantillon des tissus des plantes d'*Arabidopsis*, quantifier par spectrophotomètre, sont illustrés dans la figure 5.2 et le tableau 5.2 suivants :

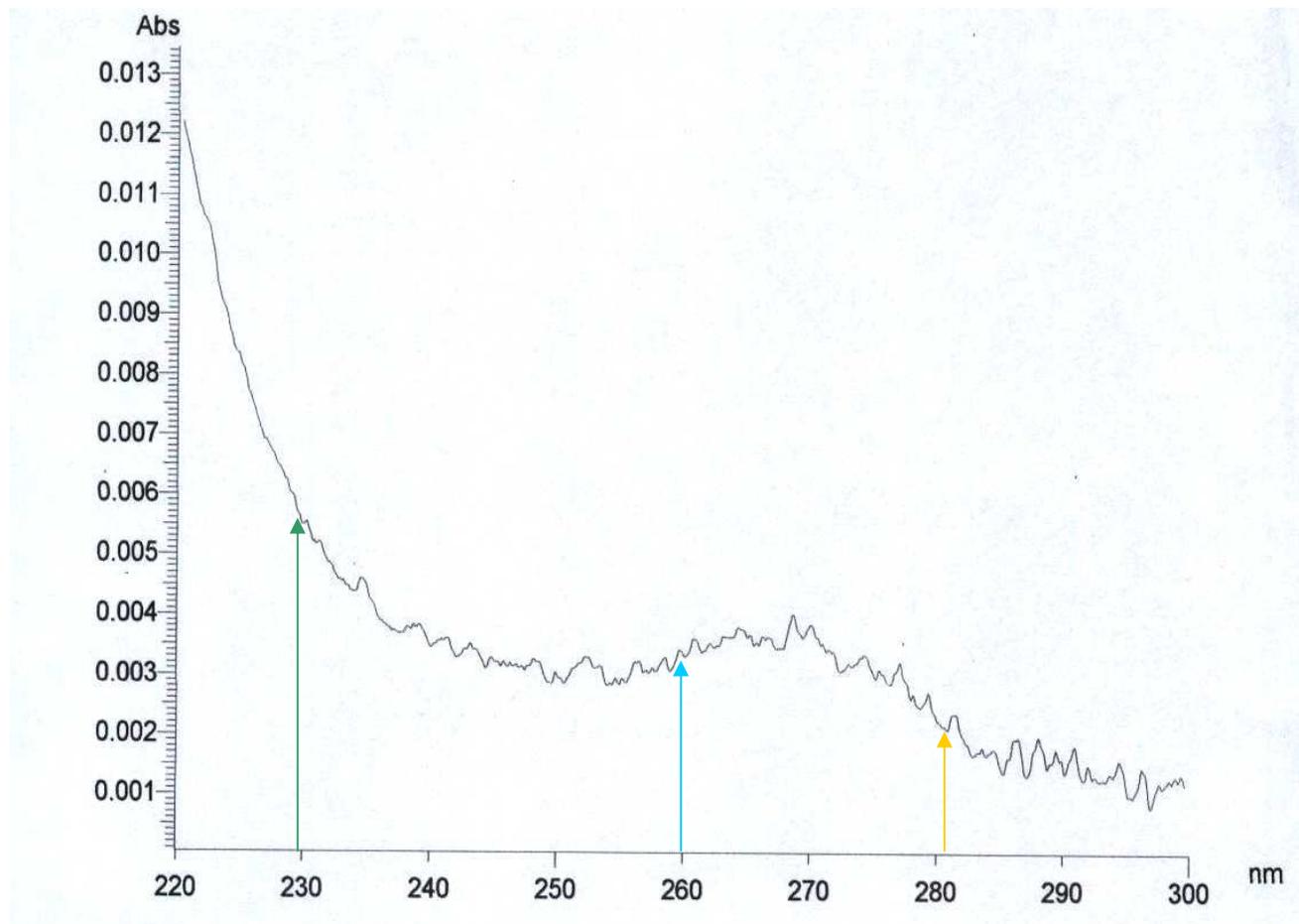


Figure 5.2 : le graphe de l'absorption à UV de l'échantillon d'ARN isolé à partir de tissus d'*Arabidopsis thaliana*

Tableau 5.2 : Les densités optiques de l'échantillon d'ARN

Longueur d'onde (nm)	Absorbance
280	0.002
270	0.004
260	0.003
250	0.003
240	0.003
230	0.006

De la figure 5.2 et le tableau 5.2, nous remarquons que la quantité d'ARN isolé de notre échantillon est très faible. Cela peut être expliqué par les manipulations longues qui ont provoqué une dégradation de l'ARN après une activation des enzymes ARNases à la température de laboratoire.

Comparée à la température de nitrogène liquide  $-180^{\circ}\text{C}$  qui induit l'inactivation de l'ARN, une température de  $-20^{\circ}\text{C}$  à  $0^{\circ}\text{C}$  au bain de glace est un milieu favorable pour activer l'ARNases. Donc le réchauffement des tubes lors des manipulations hors glace pour passer aux de différentes étapes d'extraction jusqu'à celle de précipitation a conduit à ce faible rendement d'isolement.

Le calcul de ratio  $A_{260} / A_{280}$  montre que l'ARN extrait est d'une qualité inférieure, puisque la valeur est de 1.5, alors que celle d'un échantillon de bonne qualité est de 2. Cela est clair dans le graphe dont l'absorption des polysaccharides est 2 fois supérieure à celle des acides nucléiques, le ratio spécifique de la pureté est égal à 1.5 au lieu de 2.2.

La formule de calcul de concentration de l'ARN est la suivante :

$$[ARN] = \frac{DO_{260} \times FC \times Dilution}{1000}$$

DO : la densité optique lue a la longueur d'onde 260 nm

FC : Facteur de Conversion est de 40  $\mu\text{g} / \text{mL}$

Dilution : dans ce cas est de 750 / 2.

La quantité extraite dans ce cas est de 0,045  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ .

### 5.2.2 Quantification par agarose gel

La quantité extraite de l'échantillon étant faible ainsi que la qualité, nous avons fait recours à une extraction de laboratoire pour passer à la quantification des ARN par l'électrophorèse sur gel d'agarose (figure 5.2.2).

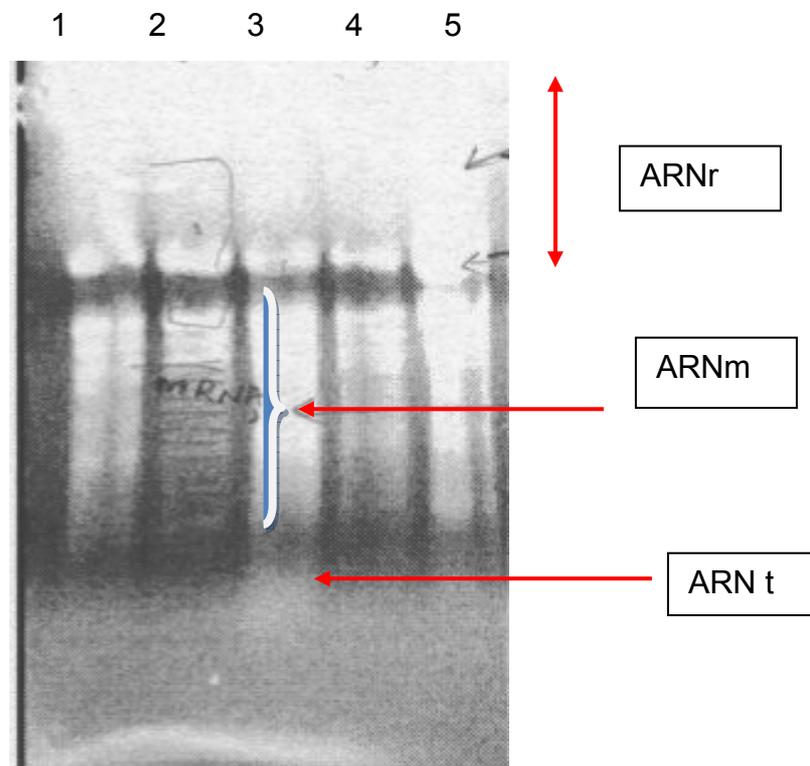


Figure 5.2.2 : L'image de migration des dépôts d'ARN sur agarose gel

Selon la figure 5.2.2 représentant l'image de migration des dépôts des échantillons d'ARNs à quantifier, nous pouvons observer qu'il existe différents types de l'ARN, séparés selon leur taille. Les ARNt sont les premiers à migrer du fait de leur faible taille et leur courte durée de vie dans la cellule.

En ce qui concerne les ARN m, l'obtention des dépôts de type barbouillés (une bande de migration verticale), les fines bandes superposées indiquent que nous avons différents types d'ARNm, chaque bande représente un ARNm codant pour une protéine donnée.

Pour les ARNr, qui sont de tailles différentes, nous distinguons les plus volumineux déposés au début de gel, alors ceux de petite taille juste avant les ARNm séparés par une bande noir signifiant l'absence d'ARN.

### 5.3 L'optimisation de PCR

Avant de passer à l'expérience de l'optimisation de PCR, nous avons procédé à l'extraction et la purification de bande d'ADN à partir d'un gel d'agarose, nous sommes passé à la deuxième étape qui est l'optimisation des conditions d'amplification *in vitro* (PCR) de l'ADN par la méthode de graduant PCR.

Les résultats de l'expérience du graduant PCR avec deux doses de  $MgCl_2$  et température d'alignement des amorces avec la matrice de  $47^\circ C$  est illustrée dans la figure 5.3.

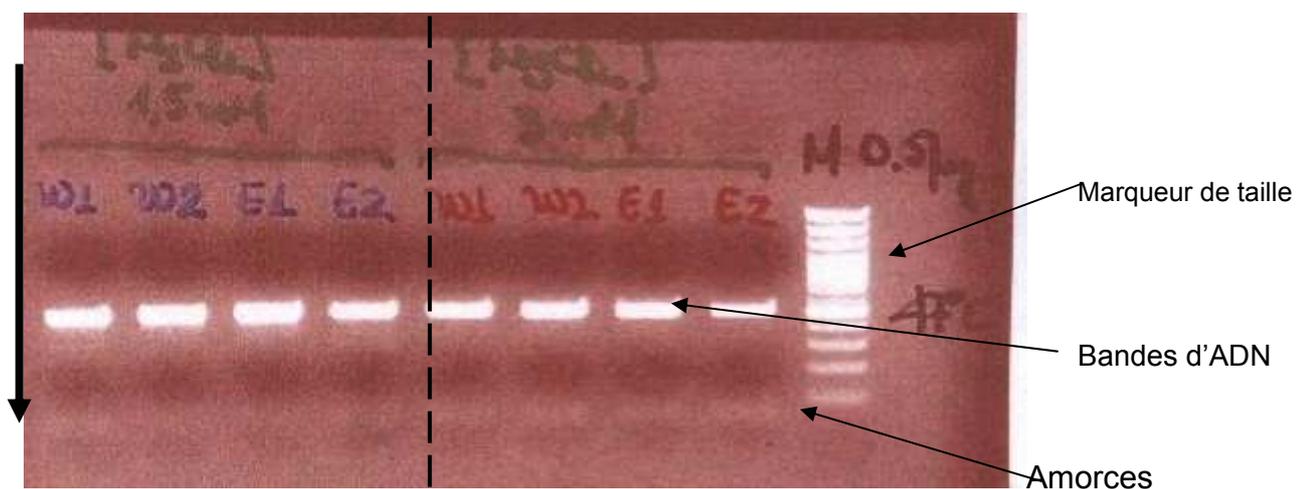


Figure 5.3.1 : Image de migration des échantillons de l'essai de l'optimisation PCR à  $47^\circ C$

La figure 5.3.1 représente l'image de migration des dépôts des échantillons d'ADN après une électrophorèse de 45 min, les quatre (04) échantillons sont codés par :  $W_1$ ,  $W_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$ .

Par comparaison de l'inflorescence des bandes d'ADN et celle de marqueur de taille (figure 5.1.3), nous pouvons donner une estimation de la quantité d'ADN. Concernant le traitement la concentration de  $MgCl_2$  : 3 mM, l'ADN amplifié est e l'ordre de 80  $\eta g/10\mu l$ . pour la deuxième traitement, la concentration de  $MgCl_2$  : 1,5 mM, la quantité d'ADN obtenue est de l'ordre de 90 à 100  $\eta g/10\mu l$ . La longueur de la séquence d'ADN amplifiée dans les deux traitements est de l'ordre de 500 pb.

D'après la figure, il existe une différence entre les deux traitements étudiés  $MgCl_2$  1.5 et 3.0 mM avec une température d'hybridation de 47 °C, l'amplification de la matrice d'ADN est légèrement améliorée par le traitement 1.5 mM cela pour les 04 échantillons. Concernant les amorces d'ADN non utilisés dans l'amplification, ils ont presque la même quantité.

Pour le deuxième traitement avec une température d'hybridation de 56 °C et les deux niveaux de la concentration de  $MgCl_2$ , nous avons obtenu l'image de migration sur agarose gel suivante (figure 5.3.2) :

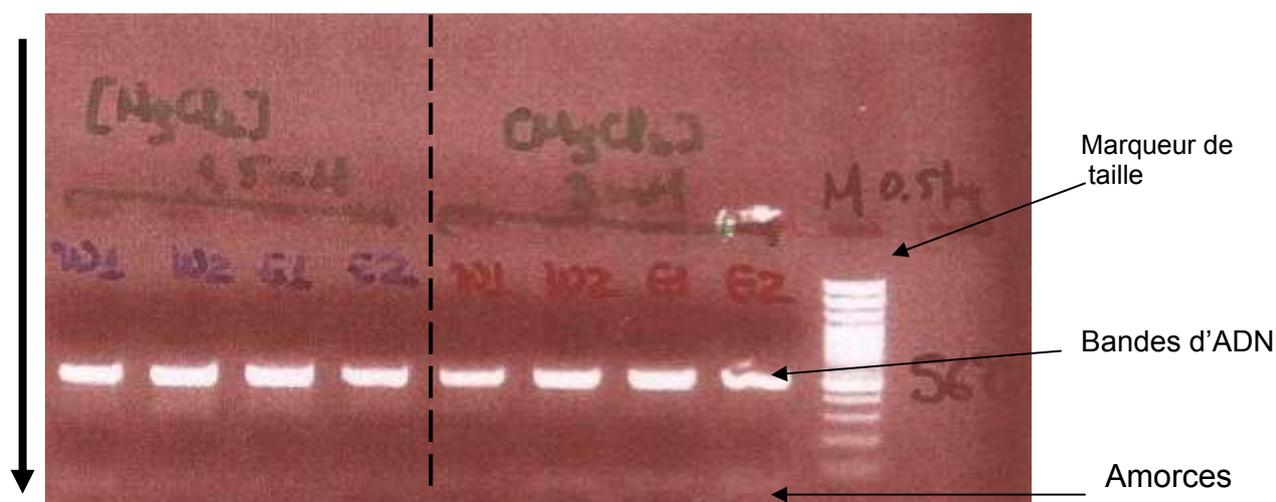


Figure 5.3.2 : Image de migration des échantillons de l'essai du graduant PCR à 56°C

La quantification approximative des échantillons pour les traitements  $W_2$ ,  $E_1$ , et  $E_2$  est plus ou moins égale à 85  $\eta\text{g/ml}$  dans les doses de  $\text{MgCl}_2$  utilisées, alors que pour le traitement  $W_1$ , la quantité est de 85  $\eta\text{g/ml}$  pour la dose de 1.5 mM est moins de cela avec la dose 3.0 mM.

Le deuxième niveau de facteur étudié à savoir la température 56°C , montre que la différence entre les échantillons n'est pas très grande. Pour les deux doses 1.5 et 3.0 mM, notamment pour  $W_2$ ,  $E_1$  et  $E_2$ . Alors que pour le traitement  $W_1$  une légère différence est visible, cela confirme que la dose 1.5 mM donne une amplification d'ADN meilleure. En ce qui concerne les amorces dans les deux cas, une quantité des amorces reste non impliquée dans la réplication.

En comparant les figures 5.3.1 et 5.3.2, les traitements étudiés pour l'optimisation des conditions montrent que la température 47 °C et la dose 1.5 mM améliore la quantité d'ADN amplifié.

#### 5.4. La transformation génétique des plants d'*Arabidopsis thaliana*

Après la transformation par le vase d'infiltration les plantes sont cultivées pour une période d'un mois. Le suivi cultural d'*Arabidopsis* est résumé dans le tableau suivant (tableau 5.4):

Tableau 5.4. : Le suivi cultural de la plante d'*Arabidopsis* transformée.

Conditions de milieu	Période	Stades phénologiques	Opérations effectuées	Observation
Laboratoire	-	Pleine floraison après trois semaines de croissance.	Transformation par vase d'infiltration	Elimination des fleurs nouées.
Laboratoire	1 nuit	Pleine floraison	Recouvrement avec un film plastique.	Position couchée avec humidification
Chambre de culture	Une semaine	Début nouaison Floraison de nouveaux boutons floraux	Irrigation un jour sur deux	Dans la chambre de culture.
Laboratoire	Trois semaines	Pleine nouaison Remplissage des gousses Maturation échelonnée	Irrigation quotidienne	Sous conditions de laboratoire.
Laboratoire	Une semaine	Collection des semences en fin de cycle	L'apport minimal irrigations.	-

Après la formation des siliques (Figure 5.4) et à partir du stade de début maturation, les plantes sont mises sur un papier de couleur blanche pour pouvoir observer et collecter ensuite les graines lors de leur maturation (couleur marron clair) et leur libération par la plante transformée. Cette collecte des graines se fait d'une façon échelonnée puisque la déhiscence des siliques ne se fait pas au même temps. En général, les graines d'une dizaine de siliques sont suffisantes pour le test de confirmation de la transformation génétique.



Figure 5.4 : La plante d'*Arabidopsis thaliana* au stade grossissement des gousses

Les graines collectées sont stérilisées par un trempage à l'éthanol 70% pendant 10 min (15 ml) après cela nous ajoutons l'hypochlorite de sodium (NaClO, eau de javel) à 2 % pendant 15 min, le rinçage est la dernière étape de stérilisation

Pour l'essai de prégermination, les semences sont mises dans la boîte de Pétri (80mm) contenant le milieu de MS et l'antibiotique kanamycine. La boîte était traitée au froid pendant 02 jours puis transportés à la chambre de culture (figure 5.4.1).

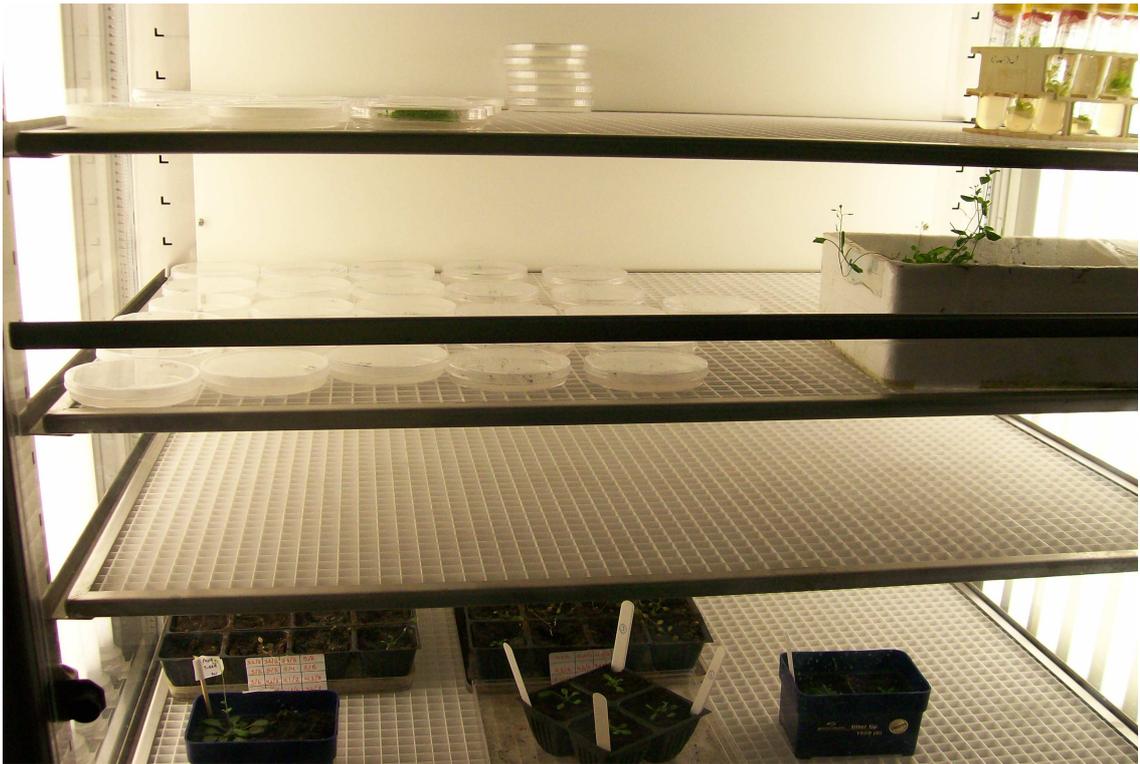


Figure 5.4.1: la chambre de culture destinée pour l'élevage des plants

Les conditions de germination sont : une température moyenne de 23°C et une photopériode de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité, pendant une semaine favorisent l'émergence des plantules. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure de 5.4.2.

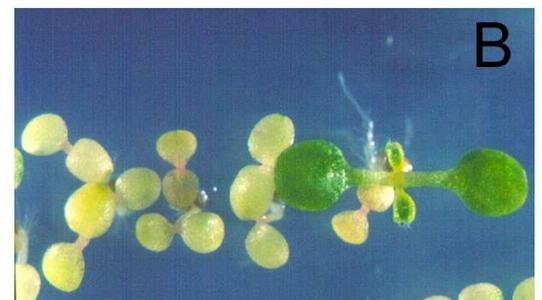
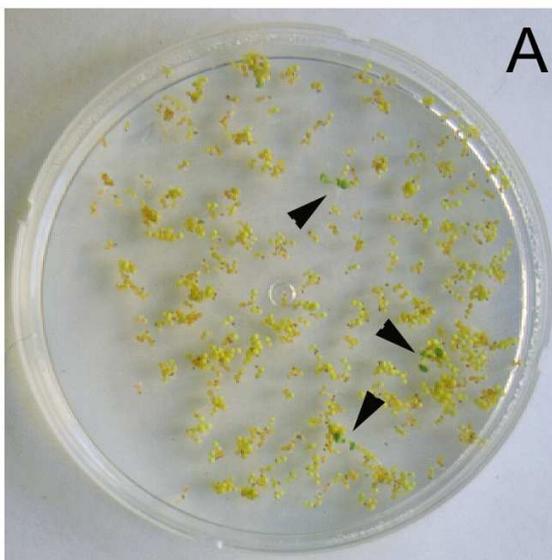


Figure 5.4.2 : A) la boîte de Pétri de test de pré germination.  
B) un plant vert dotant le gène NP II.

Une centaine de graines ont été mises dans une boîte à Petri pour germer, le taux de germination était de 100 %, toutes les graines sont capables d'émettre les deux premières feuilles décotylédonaires mais seules les plantules contenant le gène kan<sup>R</sup> contre l'antibiotique présent dans le milieu de culture, peuvent poursuivre leur croissance normalement uniquement trois plantules ont poursuivi leur développement et poussent les deux vraies feuilles.

Les plants colorés et au stade de formation des vraies feuilles sont mis dans un seul tube et 02 plants non colorés et en stade phénologique de feuilles cotylédonaire sont mis dans un autre tube pour effectuer la visualisation de l'activité de gène reporteur GUS (sous chapitre 4.6.4.7) (figure 5.4.2 A).

Les plants non transformés sont incapables d'atteindre le stade de vraies feuilles car l'antibiotique kanamycine bloque le développement des chloroplastes, la plantule verte se développe normalement car elle contient le gène de résistance NPT II (la figure 5.4.2 B).

Après deux jours de manipulation suivant le protocole de visualisation, la coloration en bleu des plants transformés est fixée et devenue visible à l'œil nu. En utilisant un microscope photonique mené d'un appareil photo numérique, nous avons pris des photos pour les plantes à analyser (figures 5.4.3, 5.4.4, 5.4.5 et 5.4.6).



Figure 5.4.3 : La plante colorée en bleu indique que cette plante est transformée (x10)

Les observations préliminaires indiquent que la coloration bleuâtre (l'activité de gène rapporteur GUS) de cette plante permet de confirmer qu'elle est transformée, et l'émission de la vraie feuille indique sa résistance à l'antibiotique kanamycine. Mais il n'est pas possible de désigner où la protéine était transcrite, cela à cause de la couleur bleu très dense, qui peut être due à une étape de fixation non respectée (soit pour la solution de rinçage ou l'éthanol).



Figure 5.4.4 : Les plantules transformées portant la couleur bleu (x10).

La coloration bleue dans cette photo indique probablement qu'elles sont transformées et l'accumulation de protéine bêta-glucuronidase codé par le gène rapporteur GUS est généralisée dans les tissus des plantes.



Figure 5.4.5 : La plantule de couleur marron jaunâtre non transformée (x10)

La coloration marron jaunâtre indique probablement que cette plantule n'est pas transformée, ne contenant ni le gène reporteur GUS (l'absence de la couleur bleu) et sa sensibilité à l'antibiotique kanamycine car elle n'a pas atteint le stade deux vraies feuilles (l'absence de gène NPT II).

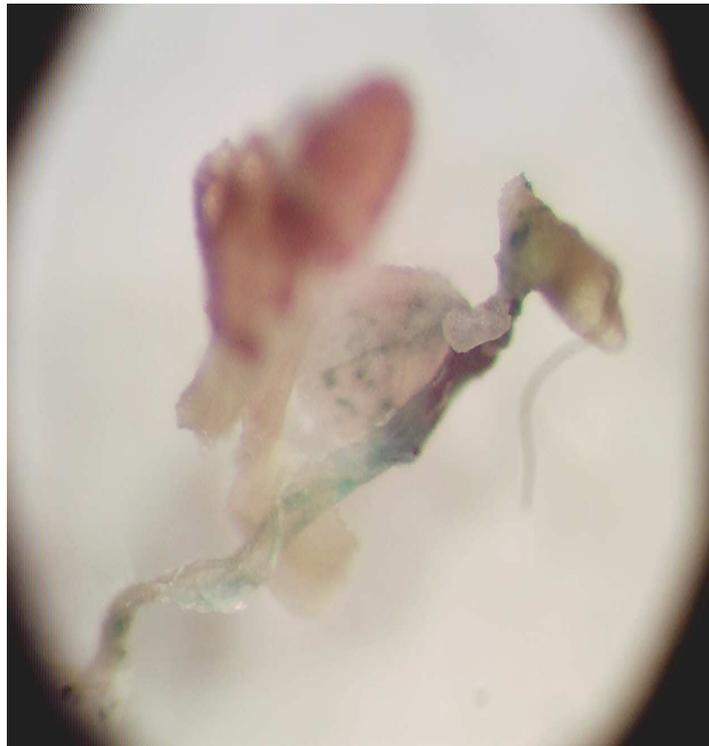


Figure 5.4.6 : Les deux plantules d'Arabidopsis montrent la différence entre la plante transformée (à droite) contre celle non transformée (à gauche) (x 10).

Les observations préliminaires faites au laboratoire donne l'opportunité de confirmé que la plante coloré est transformée. Les protéines de chaperonnes sont accumulées à ce stade avancé de vie de la plantule d'arabette aux deux méristèmes racinaire et apical, dans les vaisseaux conducteurs et les nervures des plantes mais cela reste à confirmer par des études approfondîtes.

Les figures 5.4.3, 5.4.4, 5.4.5 et 5.4.6 prises avec le microscope optique avec un grossissement de 10x, donne l'opportunité de confirmer que les plantes non transformées génétiquement ne présentent pas la coloration bleue et l'absence de la séquence de transgène NPT II : HsP<sub>90</sub> : GUS dans l'ADN car les plantes n'arrivent pas à atteindre le stade de deux vraies feuilles cela à cause de l'effet de l'antibiotique kanamycine qui bloque l'activité des chloroplastes, et l'absence de la couleur bleue signifie que le promoteur AtHsP<sub>90</sub> n'est pas transcrit en ARN messenger de gène rapporteur GUS.

Les observations préliminaires des plantes portant la couleur bleue cela indique à la fois l'accumulation de l'ARNm de gène rapporteur dans les tissus et la résistance au kanamycine. Seule la figure 5.4.6 permet de localiser cette accumulation qui avait eu lieu, dans les vaisseaux conducteurs, les méristèmes racinaire et apicale et dans les nervures des feuilles, ce qui peut être expliqué par le fait que la plante durant ses premiers stade de développement a besoin de protéines kinases dans ces tissus.

## DISCUSSION GENERALE

L'étude menée dans ce document pour une caractérisation moléculaire de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et sa transformation génétique de cette dernière, afin d'avoir un model d'étude à suivre et qui pourra être appliquée aux espèces maraîchères, soit pour un marquage moléculaire pour les variétés locales, soit pour les améliorer ou bien pour contrôler l'introduction des gènes et le flux de ces derniers dans notre pays.

Le protocole suivi pour l'extraction de l'ADN génomique à partir de matériel biologique de départ de 100 mg des tissus végétaux de la plante, durant cette première étape avons obtenu ces résultats :

- ❖ La quantification et la qualification de ADN isolé par les deux méthodes : l'électrophorèse par migration sur gel d'agarose et le dosage par spectrophotométrie ont montré que l'échantillon est d'une pureté plus ou moins bonne, il contient moins de protéines que la norme calculé par le ratio  $A_{260}/A_{280}$ , de l'autre coté il renferme une quantité légèrement supérieure d'un bon échantillon. Ces manipulations exigent plus de rapidité et de respecter les durées nécessaire à chaque étape, la durée totale d'une extraction de l'ADN génomique, ainsi que les opérations de quantification et qualification est d'une moyenne d'une journée.
- ❖ La méthode d'extraction utilisée dans cette première partie en utilisant des kits d'extraction de type de QIA quick, nous a permis d'avoir un rendement faible. Cela par comparaison avec l'échelle de marqueur de taille. Nous avons déduis que la masse moléculaire de l'échantillon est de l'ordre de 314 ng/  $\mu$ L, légèrement supérieur à la dernière concentration dans l'échelle. Egalement pour la longueur de la séquence, elle est d'une moyenne de 110 pb, alors que l'échelle est de 100 pb.

L'extraction de l'ARN génomique à partir des tissus de l'arabette (300mg) en utilisant la méthode de lyse alcaline est une manipulation très délicate et un peu longue comparée à l'isolement de l'ADN, deux journées sont la durée moyenne exigée pour le protocole d'extraction. Les résultats obtenus après cette partie confirment cette difficulté. La quantification et qualification d'ARN isolé après dosage des acides nucléiques par spectrophotomètre, montre que l'ARN obtenue est d'une qualité inférieure, les ratios obtenus sont nettement différentes des normes. Le rendement calculé est de 45  $\eta\text{g} / \mu\text{l}$ , la causes de ce faible rendement peut être due à l'activité des ARNases actives à des températures de l'ordre de  $-20^{\circ}\text{C}$ , ce qui signifie qu'une manipulation rapide à des températures très basses sont des points qui doivent être pris en considération pour récolter plus d'ARN.

- ❖ Bien que nous n'ayons pas procédé à l'estimation de la quantité de chacun des trois types d'ARN de cet échantillon, mais l'image de migration des ARN sur gel d'agarose à permis d'avoir une idée sur la masse moléculaire de chaque type et d'observer de quelle manière les ARNm transcrits dans les feuilles de la plante au stade de début floraison sont placées. De la même image, il apparaît que l'ARNr a une masse moléculaire supérieure à celle de l'ARNm et l'ARNt respectivement.

Pour le deuxième volet, l'optimisation des conditions d'amplification *in vitro* de l'ADN, en utilisant la technique de graduant PCR, cela en jouant sur deux facteurs dans chacun à deux niveaux, la température d'alignement (47 et 52  $^{\circ}\text{C}$ ) et la concentration de  $\text{MgCl}_2$  (1.5 et 3.0 mM). Le matériel utilisé était une séquence d'ADN purifié à partir d'un gel d'agarose, ensuite cette quantité d'ADN est amplifiée avec 04 quatre répétitions. Les meilleurs résultats sont obtenus avec la température 47  $^{\circ}\text{C}$  et la dose de 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , alors que pour les autres trois traitements le résultat est plus ou moins égal, ce résultat nous permet également d'économiser la quantité de  $\text{MgCl}_2$  utilisé ainsi que pour l'énergie.

La transformation indirecte d'*Arabidopsis thaliana* par l'intermédiaire de plasmide d'*Agrobacterium*, nous a permis d'obtenir 3 % des plantules transformées renfermant le transgène dans la génération  $\text{M}_1$ . L'activité de gène reporteur GUS qui fait partie des gène de chimère construit et transféré à la

cellule d'arabette a permis de détecter les plants transformés dont l'accumulation des ARNm des ATPases de promoteur HsP<sub>90</sub> s'effectue dans les méristèmes apicale et racinaire, dans les nervures des feuilles et les vaisseaux conducteurs cela pendant le stade germination - début formation de la rosette.

L'obtention des plantes transgéniques (dans le cas de la plante étudiée l'arabette des dames) a eu lieu après 2 mois de la transformation, nous nous sommes arrêtée au stade plantule après la formation des deux premières vraies feuilles,

## CONCLUSION GENERALE

L'ADN recombinant ouvrent actuellement l'accès à l'amélioration des plantes à intérêt agronomique avec une précision de transfert des gènes comparé aux techniques classique d'amélioration et pendant des périodes courtes, ces nouvelles techniques faisait l'objectif de notre étude.

Les résultats obtenus confirment que la biotechnologie appliquée sur l'espèce *Arabidopsis thaliana*, permet d'obtenir une caractérisation moléculaire durant une période courte (une journée pour l'extraction et quantification de l'ADN génomique, 2 jours pour l'ARN génomique), pour la transformation génétique la première génération des plantes transgéniques est obtenues après le semis de graines collectées à partir des plantes transgéniques avec un pourcentage de 3 %. Ces techniques peuvent être utilisées pour les espèces maraîchères en fonction de leur cycle de vie mais cela nécessiterai l'organisation de la filière semence au préalable avec une division des fonctions sur les acteurs activant, la collection des ressources phytogénétiques.

Actuellement, l'Algérie connaît une dépendance aux pays et firmes semencières producteurs des semences maraîchères, suite à la généralisation d'utilisation de semences améliorées par nos agriculteurs. Plusieurs contraintes ont fait que le développement de filière semence en Algérie est compromis, et que le produit local reste écarté du marché national. L'application de ce programme nécessitera l'intervention d'une équipe pluridisciplinaire (généticiens, écologistes, physiologistes, botanistes...) et une restructuration de la filière semences par une coordination entre les différents secteurs intervenant et le développement de marketing de semences locales pour pouvoir concurrencer les produits introduits.

Une des actions des centres des recherches est l'application des résultats de biologie moléculaire et son application pour :

- Faire un inventaire des variétés potagères locales, pour créer des banques de semences selon les zones bioclimatiques.
- Contrôler l'état sanitaire des introductions variétales.
- Résoudre les principales contraintes techniques au développement des cultures maraîchères
- Faire une caractérisation moléculaire des espèces recensées, d'analyser le flux de gènes, et d'améliorer les variétés locales.

## APPENDICE A

### LISTE DES SYMBOLES ET ABREVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ARN	Acide Ribonucléique
A	Adénine
C	Cytosine
G	Guanine
T	Tymine
U	Uracile
ADNc	Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
EST	Expressed sequencing target
PCR	Polymerase Chain Reaction
Amp	Ampiciline
Tet	Tétracycline
Kan	Kanamycine
Pb	Paire de base
ADN-T	Acide Désoxyribonucléique de Transfert
<i>E coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
M <sub>2</sub>	deuxième génération des mutants
ARNt	Acide Ribonucléique de transfert
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomique
GUS	B-gluconédase
A <sub>260</sub>	Absorbance à la longueur d'onde 260 nm
HsP90	Heat shock protein

**APPENDICE B**  
**LISTE DES ESPECES ET VARIETES IMPORTEES PAR CASAP**  
**D'ALGER**

Listes de variétés importées par CASAP d' Alger [78]

Espèces	variétés	Importateur en Algérie	Fournisseur et Pays producteur
Tomate maraîchère	Bond, Chourouk, Zahra, Nedjma, Doucen, Lawson, Saria, Clovis, Luxor, Doukalia, Faraouna, Ounza	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Tomate industrielle	Rio grande, Sabra, Zinith, Ginon, Firenze, Kenz	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Piment	Fougal Capro, Bruto, Capel hot	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Poivron	Italico, Italico II, Doux de marconi, Poivron bravo, Hadi F1, Toréro, Doux d'Espagne	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Concombre	Winto, Super marketer, Dasher, Conquistador	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Courgette	Reverra, Diamant, Peto Abondonza, Quarantaine améliorée F1	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Pastèque	Eureka, Delta, Grey belle améliorée, Crimson sweet, Royal sweet	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Melon	Super spring, Ananas Yellel, charantais, Harder, Laredo, Goldmine	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Chou fleur	Super boule de neige	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Aubergine	Black beauty	CASAP d'Alger	Peto seed, USA
Tomate	Baltyco	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande

Chou fleur	Brun sweet, Super boule de neige	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Haricot	Contender, Djedida, Coco rose a rame	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Carotte	Touchan touba, Nantaise naba, Touba, Super muscade	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Betrave	Plate d'Egypte, Rouge globe	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Navet	Collet violet	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Laitue	Blande de paris, Romaine, salade tetue de nime, Madrilene	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Concombre	Super marketer	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Courgette	Verte d'Alger, Quarantaine	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Melon	Jaune canari, PMR F1	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Pastèque	Grey belle amélioré	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Petits pois	Kelvedon, Onward	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Oignon	Jaune d'Espagne	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Fenouil	Doux de florance, Laitina	CASAP d'Alger	Bakker brothers, Hollande
Courgette	Friha, Hania	CASAP d'Alger	RB international, France
Petit pois	Onward, Kalvedon	CASAP d'Alger	RB international, France

## APPENDICE C

### LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL

#### Extraction d'ADN [79]

- 1- Broyer le materiel vegetal
- 2- Ajouter 10 ml de tampon d'extraction (aux cellules dégradées) + 500µl 10% SDS, vortex (ou agiter)
- 3- Mixer et incuber le tube à 65 °C pendant 30 min dans un bain mari. Vortex chaque 10 min.
- 4- Centrifuger 15 min à la température de laboratoire.
- 5- Prélever le surnageant contenant l'AND et ajouter un volume équivalent d'isopropanol pour précipiter l'ADN
- 6- Centrifuger 15 min à la température de laboratoire
- 7- Retirer complètement le surnageant avec précaution
- 8- Sécher le culot à l'air libre 30 à 60 mn sur la table.
- 9- Dissoudre le culot dans 4 ml de tampon TE.
- 10- Ajouter 10 µl d'ARNase (pour dégrader l'ARN) puis incubé 10min à 37°C
- 11-Ajouter 4 ml de tampon CTAB.
- 12-Incuber 15 min à 65°C (avec mixage périodique)
- 13-Ajouter 8 ml de phenol:chloroform:IAA (IsoAmyl Alcohol) 25:24:1
- 14-Centrifuger 15 min à la température de laboratoire.
- 15-Prélever le surnageant et ajouter 16 ml (2 volumes) d'éthanol 96% EtOH (pour précipiter l'ADN)
- 16-Incuber à 20°C pendant au moins 10 min (maximum une nuit)
- 17-Centrifuger 15 min et retirer l'éthanol pour avoir le culot d'ADN.
- 18-Rincer le culot avec l'éthanol 70 %.
- 19-Centrifuger 15 min et retirer l'éthanol
- 20-Sécher le culot à l'air libre.

## APPENDICE D LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL

### Extraction d'ARN [79]

1- Le matériel végétal récolté est immédiatement congelé dans l'azote liquide en suite il est broyé en une poudre fine dans un mortier et pilon traité à l'avance avec l'azote liquide. Pour procéder à l'extraction transférer environ 1 g de poudre végétale dans des tubes plastique traité au froid (de 50 ml).

2-Transférer 10 ml de mélange chaud de tampon d'extraction d'ARN et phenol (80°C) 1: 1. S'assurer que l'échantillon ne contient plus d'azote liquide quand le mélange est ajouté un volume de 5 ml. Vortex ou agiter manuellement pendant 30 secondes.

3- Ajouter de chloroforme au mélange et agiter vigoureusement (5 ml). Pour séparer les phases, centrifuger les échantillons pendant 20 min (3500 tpm). Répéter l'extraction à l'aide de chloroforme (volume 5 ml) jusqu'à l'élimination de la phase de milieu (au moins de 2 fois).

4-Transférer la phase aqueuse (clear) vers un tube de 50 ml, ajouter 1/3 de volumes de LiCl (8M) froid et précipiter pendant au moins 3 heures à 0°C (jusqu'à une nuit). Centrifuger l'ARN à 0°C pendant 20 min (2500tpm) et resuspendre dans 500 µL d'eau puis un lavage avec l'éthanol froid de 75 %. Prendre un petit volume de cet échantillon pour déterminer la concentration, et la pureté de l'ARN (1 µL pour le gel d'agarose et 1 µl pour a spectrophotométrie).

5- Précipiter l'ARN dans 2 volumes d'éthanol 96% avec 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH 5.3) pendant 1 h et centrifuger. Resuspendre le culot dans de l'eau (chauffer pendant 5 mn à 65°C pour activer la suspension si nécessaire) pour obtenir 1 mg/ml de solution

## 6- Tampons

2 x STEX (autoclave)	2.0 M NaCl 20.0 mM Tris-Hcl 2.0 mM EDTA 0.2 % triton X-100	PH 8.0
Tampon d'extraction d'ARN (autoclave)	100.0 mM Tris Hcl 100.0 mM LiCl 10.0 mM EDTA 1.0 % SDS	PH8.0
10 x tampon II d'ADNc II (utilise des produits stériles et le filtre de stérilisation)	200.0 mM Tris-HCl	750.0 mM KCl 100.0 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 50.0 mM MgCl <sub>2</sub> 10.0 mM DTT PH7.5
Tampon R/L (x 5)	(10x)- Tampon 500 µl BSA purifier (10 mg/ml) DTT (1M) Milli-Q	25 µl 25µl 450 µl

**APPENDICE E**  
**PROTOCOLE DE FIXATION DES TISSUS VEGETAUX POUR L'ANALYSE DE**  
**L'ACTIVITE DE GENE REPORTEUR GUS**

**GUS assays [80]**

- Les tissus végétaux sont fixées dans l'acétone froid 90% pendant 20mn à 4°C
- Rincé avec de l'eau froide pendant for 5 min
- Rincé avec la solution de rinçage
- Incuber les tubes à 37 °C pendant 12 h
- Les échantillons sont transférés dans différentes concentrations d'éthanol pendant 30 min (20 %, 30 % I, 50% ) et dans 50 µl de la solution fixatrice FAA (50 % éthanol, 5% acide acétique , 3.7 % formaldéhyde)
- Les échantillons sont incubés dans la solution fixatrice toute une nuit
- Déshydrater les échantillons dans différentes concentrations d'éthanol ( 70 % et 85 %).
- Les échantillons sont transférés dans 1 ml d'éthanol à 85 % pendant 20 min
- Observer sous microscope optique.

## APPENDICE F

### MILIEUX PREPAREES

#### Les milieux bactériens préparés [81]

- Luria Bertani (LB) medium (500ml)
  - 5 g NaCL
  - 5 g bacto-tryptone
  - 2.5 g bacto-yeast extract
  
- Luria Bertani (LB) agar (500ml)
  - 5 g NaCL
  - 5 g bacto-tryptone
  - 2.5 g bacto-yeast extract
  - 7.5 g agar
  
- Le milieu SOC
  - 2.0 % (w/v) bacto – tryptone
  - 0.5 % (w/v) bacto – yeast extract
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 10 mM MgSO<sub>4</sub>
  - 20 mM glucose
  
- 1. Tanpon de transformation d'*E. coli*
  - 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>
  - 0.1 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 75% glycerol [79].

### Le milieu d'infiltration (ML)

- 2.2 g de Murshing et Skoog
- 50 g de sucrose
- 0.5 MES
- Le pH est ajusté à 5.7, mis à l'autoclave puis nous ajoutons
- 1 X de vitamine B5
- Et juste avant la transformation 0.01 mg / L de Benzylamino Purine
- 200 L silwer (détergeant).

### L'antibiotique Kanamycine :

La solution mère 50 mg / mL dans l'éthanol -70 % était conservée à -20 °C et filtré avant l'utilisation par un passage à travers un filtre de 0,4 µm.

#### Solution I

- 50 mM glucose
- 25 mM Tris-Cl (pH 8,0)
- 10 mM EDTA (pH 8,0).

#### Solution II

- 0,2 N NaOH
- 1 % SDS

#### Solution III

- 5 M acétate de potassium
- 1,5 %(v/v) acide acétique de glacial [81].

## APPENDICE G

### LISTE DE MATERIELS ET INSTRUMENT UTILISEES

#### Equipement de laboratoire [82]

- Plaque chauffante
- Agitateur de type « vortex »
- Agitateur magnétique
- pH mètre
- Centrifugeuse pour tube de 30 / 35 ml
- Microcentrifugeuse pour microtubes de 500 et 2200  $\mu$ l
- Réfrigérateur ou chambre froide (4°C)
- Congélateur ou chambre de congélation (-20 °C°)

#### Equipement particulier

- Autoclave ou autocuiseur domestique (grand volume)
- Hotte à flux laminaire avec bec à gaz ou réchaud à alcool
- Loupe binoculaire
- Chambre de culture pour tissus végétaux
- Spectrophotomètre UV en gel d'agarose (générateur + boîte à gel)
- Bacs à développement pour film d'autoradiographie
- Thermocycleur pour amplification PCR
- Congélateur à -70°C

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Gacem, B., "Semences potagères en Algérie : configuration et schéma de production", *Macir revue ITCMI* (2004), 15-20.
2. "Arabidopsis thaliana a model organism for studies of the cellular and molecular biology of flowering plants", [www.Arabidopsis.com](http://www.Arabidopsis.com)
3. Lurin, C, Renou, J.D. et Bouchez, D., "la génomique et les outils d'exploitation fonctionnelle chez les plantes", *Rev biofutur* 265, (2006) , 45-49.
4. Marchand. G. et Reyrand. C., "Faut il avoir pour des OGM ?", Edition Sandra Berthe, France, (2000), 125p
5. Meinke, David W., Cherry, J. Micheal., Dean, C., Rounsley, S.D., Koornneef, M., "Arabidopsis thaliana: A model plant for genome analysis", *Rev Science*, (1998), 662-682.
6. Griffiths, A., Miller J.H., Suzuki D.T., Lowontin R.C. et Gelbart W.M., "Introduction à l'analyse génétique ", 3ème Edition Chrystella Sanlaville, (2001), 826p.
7. Clough S. et Bent A.; "Simplified Arabidopsis transformation protocol", University of Illinois at Urbana Champaign (2000); pdf.
8. Weigel, D. et Glazebrook, J., "Arabidopsis. A laboratory manual", Ed Gold spring harbour laboratory press (2002), 343p.
9. Vallade, J., "Structure et développement de la plante. Morphogenèse et biologie de la reproduction des angiospermes". Ed DUNOD (2000) ,224 p.
10. The Arabidopsis genome initiative analyse of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408 (2002), 796 – 815, [www.nature.com](http://www.nature.com).

11. Aubourg, S., Delseny, M. et Lecharny, A., " L'organisation des génomes végétaux révélée par leur annotation". Rev Biofutur 265 (avril 2006), 33-38.
12. Caboche, M., " L'essor de la génomique végétale", Rev Biofutur, 265 (2006): 23-26.
13. Quetier F., Salanoubat M. et Weissenbach J., "le séquençage des génomes nucléaires des plantes". Rev Biofutur 265(avril 2006), 27-32.
14. Harry, M., " Génétique Moléculaire et Evolutive", Ed Maloine Paris (2001), 326p.
15. Sharka : une crucifère en secours des arbres fruitiers à noyau. News letter (December, 2007). [www.reussirfl.com](http://www.reussirfl.com)
16. Lukowitz, W., Gillmov, C.S. and Scheible, W.R., "Positionel cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you", Rev Plant Physiology, V 123 (July, 2000), 795-805.
17. Ostergaard, L. et Yanosfsky, M.F., "Establishing gene function mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* ", The plant journal: Technique for molecular analysis 39 (2004), 682-696.
18. Macijaweski, J. , "Semences et plants", Ed Lavoisier (1991) : 230p.
19. Kalantidis, K., Briaty, L.G., Wilson, Z.A., " *Arabidopsis* mutant characterisation, microscopy, mapping and genes expression analysis", Ed the practical approach, (2000).
20. Weigl, D. et Jurgüens, G., "Stems cells that make plants stems", Rev nature V.415 (February, 2002), 751-754, [www.nature.com](http://www.nature.com) .
21. Ferrandiz, C., "Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis*", Journal of experimental botany, V.53 N377 (October, 2002), 2031-2038.
22. Thamashow, M.F., " So what's new in the field of plant cold acclimation?", Rev. plant physiology, Vol 125 (January 2001) , 89-93, [www.plantphysiol.org](http://www.plantphysiol.org)
23. Giovannouni, J., " Molecular biology of fruit maturation and ripening" Ann Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol, 52 (2003), 725-749.
24. Ottenhof, H.H., Ashurst J.L., Whiney, H.M., Schmitz B.F. et Gween, H.S, "Biosyntheses pathway in higher plants", The plant journal.37 (2004), 61-72.

25. Leveque, C. et Mounolou, J.C. , "Biodiversité, Dynamique biologique et conservation", Ed Dunod (2001) :199.
26. Deshayes, A., " Les transferts des capacités phytosanitaires aux plantes elles mêmes"; Un point sur phytosanitaire protection des plantes bio pesticides, Ed INRA France (1991), 111-119.
27. Casse, F. et Breitler, J.C., "Comprendre les OGMs. Description – méthodes d'obtention – domaines d'application", Ed France Agricole (2001), 166p.
28. Benamour, M., Flores, B., Latche, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. et Romojaro, F., "Inhibition of ethylene biosynthesis by antisens ACC oxidase RNA prevents chilling injury in Charentais cantaloupe melons", Rev Plant Cell and Environement 22 (1999), 1579-1586.
29. Schijlen, G.M. Ric de Vos, C.H, Tunen, A.J et Bovy, A.G., "Modification of flavonoïd biosynthesis incrop plants", Science direct, Photochemistry 65 (Sep 2004) ,, 2631-2648.
30. Fishier, R. et Bennett, A.B. , "Role of cell wall hydrolases in fruit ripining", Annu Rev plant physiology, 42 (1991) , 675-703
31. Tourte, Y., " les OGM la transgénèse chez les plantes", Ed Biotech info Dunod (2001), 142p.
32. OGM et alimentation humaine : "impacts et enjeux pour le Québec" [Chapitre-1. pdf] , Les OGM: de quoi parle-t-on? , (PDF document).
33. Lenseele, U., Bezrthean, Y. et Cass F., " Les OGMs végétaux ", Rev recherche ; 374 (2004) ,79-82.
34. Widmer F., Beffa R. et Bovet L., " Aide – Mémoire de biochimie et de biologie moléculaire ", Ed Médicales Internationale 3eme Ed (2004), 300p.
35. Goacolou, J. et Perdrizet, E., " Transfert de gènes ", INRA (juin, 1988).
36. Bye, P., Descoins, C. et Dashayes, A., " un point sur phytosanitaires. Protection des plantes Biopesqticides". Ed INRA (1991), 187p
37. Briand, P., "Génomique, la transgénèse", Encyclopaedia Universalis, CD ROM.
38. Clouth, S. et Bent, A., "Simplified *Arabidopsis* transformation protocol (brief version for those who are familiar with the method)", university of Illiois at Urbana-Champaign (PDF document).

39. Meftah, A. et Raymond, J., " Biologie moléculaire". 2 ème Ed Dunod Paris (2003), 159p.
40. Kruh, J., " Les acides nucléiques". Encyclopedea Universalis, (2004), CD ROM
41. Valay, J.G., "La transgénèse végétale de l'ADN aux protéines" Les plantes génétiquement modifiées 13, (2002), 1-17.
42. Keller, E.F., "Génome, post génome, quel avenir pour la biologie ?" Rev Recherche n° 376, (juin 2004), 30-37.
43. La synthèse des protéines chez les Eucaryotes. [www.protéine.com](http://www.protéine.com)
44. Guillou, M., " le génomique végétal à l'INRA (2001), [www.inra.fr](http://www.inra.fr)
45. Serre J.L. et Coll, M., " Le diagnostics génétiques", Ed Dunod, (2003), 308p.
46. Guesdon, J.L. , "Polymerase chain reaction", Encyclopedea Universalis (2004) CD-Room.
47. hybridation et clonage (Novembre 2006), [www.fermente.com](http://www.fermente.com)
48. Clavilier, L., Hervieu, F. et Letode, O., "Gènes de résistance aux antibiotiques et plantes transgéniques", Ed INRA Paris (2001): 260p.
49. Casse, F., " Gènes de résistance et plantes génétiquement modifiées utilisées à des fins industrielles et commerciales", Travaux de la commission du génie biomoléculaire. Ed INRA Paris, (2001) ,143-150.
50. Chupeau, Y., " Compte rendu de la session 4. Travaux de la commission du génie biomoléculaire" Ed INRA Paris (2001), 143-150.
51. Page, D.R et Grossnklaus, U., "The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*", Marcmillan magazine, Vol 3 (2002), 124-136.
52. Jefferson. ; "Dérivé de l'Histoenzymologie, l'activité de la  $\beta$ -glucuronidase (le test GUS)", Encyclopedea Universalis (2004) CD-Room.
53. Bouchez, D., Bendahmoun, A., Lurin, C. et Sturbois, B., "Nouvelles approches génétiques chez les plantes". Rev Biofutur 265 (2006), 38-44.
54. Tafur, J.C, Hampson K., Thijssen R. et Roem W., "Securing seed supply", LEISA magazine on law external input and sustainable agriculture (2007), 4-5.

55. MADR, Développement de la production de la semence et plants (1990) ; 70p.
56. Harouadi, B., "La production de plants de pomme de terre en Algérie", Séminaire international de la pomme de terre IDCM (1979), 152-168.
57. Pop Vriend, "Seed catalogue P.V. seeds B.V." , [www.popvriendseeds.com](http://www.popvriendseeds.com)
58. Dantsey-Barry, H. et Kpemoua, K.E. , "Importance de la préservation phytogénétiques locales dans le développement durable", Institut Togolais de recherche agronomique ; (2005) : 27-32
59. Hideliza, C., Lorna, S., Rizalina, T. et Dindo, D.C., "Local multiplication to ensure timely planting", Rev LEISA; Securing seed supply (june 2007), 2-9.
60. Schröde, J. et Moggs, M., "Organizing access to local seeds in a context of crisis", Rev LEISA, More than money (june 2005): 22-24.
61. Kapange, B.W., "Conserving the plant genetic resources of southern Africa", Rev LEISA, Securing seed supply (june 2007) , 2-17.
62. Osman, A.K., "Comminiy based seed supply in Sudan", Rev LEISA, Securing seed supply (june 2007) : Securing seed supply (june 2007) : 18-19.
63. Almekinders, C., Aguilar, E. et Herrera, R. , "New bean seeds and the struggle for their dissemination", Rev ELEIZA, Securing seed supply (june 2007) ,14-16.
64. Bensaid, T. , "Etude comparative d'Hybride F1 de la tomate *Lycopersicu esculentum* Mill et leurs parents", mémoire d'ingénieur d'état en agronomie, INA El Harrach (2006), 76p.
65. Smadi, A. ; "Etude de l'extrait chloroformique d'*Oudneya africana*", mémoire de magister, chimie organique, université El hadj Lakheder Batna (2006), 118 p.
66. Ministère de l'Agriculture, "Evolution des superficies et des rendements de la pomme de terre", (2002).
67. Nedjraoui, D. , "Profil fourrager de l'Algérie", (2002).
68. Baci, L. ; "Les contraintes au développement du secteur des fruits et légumes en Algérie : faiblesse des rendements et opacité des marchés",

- CIHEAM - Options Mediterraneennes Sér. B / n°14, 1995 - Les agricultures maghrébines à l'aube de l'an 2000, (1995) , 265-278.
69. Laredj, M.S. ; "Aspect technique et économique de la production de semence en plein champ du piment (*Capsicum annuum* L, Variété corne de chèvre) ", mémoire Ing d'Etat, INA (1999), 100 p.
70. Adamou, S., Berrenane W., Haddadi F., Hammadouche S. et Saddouk S. , "Quel rôle pour les fermes pilotes dans la préservation des ressources génétiques en Algérie ? ", Série de document de travail N126 (2005), 119 p, ( PDF document).
71. ITCMI, " Bilan des activités campagne 2005-2006", (Dec 2006), 115p.
72. Ayred,, S. , " La culture de pomme de terre, conseil et pratique agricole", Rev Agriculture et développement, INVA (2007) , 49-54.
73. Amedjkouh, A. ; " Productivité de quelques hybrides F1 de la tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) et leurs parents", mémoire d'Ing d'Etat INA, (2007), 62p.
74. Messiaen, C.M. ; "Les variétés résistantes, méthodes de lutte contre les maladies et ennemis des plantes", INRA France (1981), 194-214.
75. Caron, S. et Matton, D.P. , "Travaux pratique de biologie moléculaire Bio 3102", Université de Montréal (2004),47p, pdf.
76. Somma M., " Analyse d'échantillon alimentaire pour la présence d'organisme génétiquement modifiées". Module 04 : Extraction et purification de l'ADN, OMS Bureau régional de l'Europe, PDF (2004) ,19 p.
77. Charlionet, R. et Rivat, C., "Electrophorèse principes et concepts méthodologiques" Ed INSERNA Paris (1999) ,151p.
78. CASAP, "Gamme complète de la semence commercialisée par CASAP campagne 2006-2007", CASAP d'Alger (2007), 45 p.
79. Sambrook, J., Fritsch, E.f., Maniatis, T., " Mocular Cloning: a laboratoraty Manule, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).
80. Sessions, A., Weigel, D. and Yanofsky, M.F., " The *Arabidopsis thaliana* MERISTEM LAYER 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia", Rev the plant journal, Vol 20 (1999), 259-263.

81. Belmihoub A., "Contribution of Arabidopsis P<sub>4</sub>H<sub>9</sub> RNAi cassette and P<sub>4</sub>H<sub>9</sub> promoter GUS cassette and preliminary characterization of P<sub>4</sub>H<sub>9</sub> knockout mutant", Master thesis MAICh (2006), 96 p.
82. Haïcour, R., "Biotechnologies végétales, techniques de laboratoire", Ed Technique et Document, (2002), 193 p.