

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHRECHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MENTOURI CONSTANTINE
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE ET ECOLOGIE

MEMOIRE EN VUE D'OBTENTION DU DIPLOME DE MAGESTER EN
GENETIQUE ET AMELIORATION DES PLANTES.
OPTION : GENOMIQUE ET TECHNIQUES AVANCEES DES VEGETAUX.

THEME :

CONTRIBUTION A L'ETUDE CYTOGENETIQUE DE L'ESPECE
Bellevalia mauritanica Pomel (Hyacinthaceae)
ENDEMIQUE DE L'AFRIQUE DU NORD

Présenté par :

-BENBELKACEM Sofia

Devant le jury :

-Président : Pr. KHELIFI D. Professeur à l'Université Mentouri Constantine.

-Promoteur : Pr. KHALFALLAH N. Professeur à l'Université Mentouri Constantine.

-Examineur : Pr. SATA D. Professeur à l'Université Mentouri Constantine.



Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord vers M^m **Khalfallah N.** Professeur à l'université Mentouri de Constantine, et directrice de ce travail, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et donné la chance d'y travailler. Je la remercie pour ses conseils et directives qui ont guidé mes pas.

Je remercie M^r **Khelifi D.** Professeur à l'université Mentouri de Constantine, d'avoir bien voulu présider le jury et juger ce travail.

Il m'est agréable de remercier également M^m **Sata D.** Professeur à l'université Mentouri de Constantine pour sa précieuse présence dans le jury et l'évaluation de ce travail.

Je n'oublie pas de remercier les personnes du laboratoire de Biochimie Génétique et Biotechnologies végétales, M^{me} **Tourki M.** et M^r **Belbekri N.** pour leurs aide et les moyens qu'ils ont mis à notre disposition.

Je remercie également M^{me} **Benamara M.**, M^r **Baziz K.**, et M^{me} **Benhizia H.** pour leur précieuse aide, conseils et instructions.

Je voudrais en fin exprimer ma sincère reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont aidé tout au long de ce travail pour leur sympathie, soutien et encouragements.

A tout le monde merci du fond du cœur.



Résumé

Bellevalia mauritanica Pomel de la famille des Hyacinthaceae est une espèce endémique de l'Afrique du Nord. Dans le but d'étudier l'organisation du génome de cette espèce, nous avons appliqués des méthodes de cytogénétique classique par les colorations au Feulgen, et aux nitrates d'argent (AgNO_3), de fluorochrome banding par la chromomycine A_3 (CMA_3) et DAPI, et de cytogénétique moléculaire par la technique de la FISH (Fluorescence *in situ* hybridisation). L'espèce est tétraploïde à $2n=4x=16$, le nombre de base x est égal à 4. L'Etablissement du caryotype a révélé l'organisation suivante: 2 grandes paires métacentriques (I et II), 2 grandes paires subtélocentriques (III et IV), et 4 petites paires submétacentriques (V, VI, VII, et VIII). La technique de CMA_3 a révélé 26 bandes dont la plupart sont centromériques distribuées sur les 16 chromosomes. Les bandes DAPI sont au nombre de 12 en position centromérique avec une bande intercalaire, tous distribués sur les bras longs des chromosomes des paires II, III, IV, V, VI, en juxtaposition avec les bandes CMA_3 . La coloration aux nitrates d'argent (AgNO_3) a mis en évidence un nombre de nucléoles allant de 1 à 7 avec une grande fréquence pour 4 et 5 nucléoles ; ce qui indique le niveau d'activité des sites NORs.

La FISH a révélé 5 locis d'ADNr 18S et 5 locis d'ADNr 5S. Les sites 18S sont tous télomériques sur les paires chromosomiques I, II, III, IV, V alors que les 5S varient entre intercalaires, centromériques, et télomériques et sont portés par les chromosomes des paires II, III, VII, VIII. La paire II porte deux sites 5S en même temps.

Mots clés : *Bellevalia mauritanica*, Caryotype, FISH, NORs, Fluorochrome banding.

Abstract

Bellevalia mauritanica Pomel from the family of Hyacinthaceae is an endemic species of North Africa. In order to study the organization of the genome of this species, we had resorts to methods of classic cytogenetics by Feulgen staining, and silver nitrates (AgNO_3), fluorochrome banding by chromomycine A_3 , DAPI, and molecular cytogenetics by FISH (Fluorescence *in situ* hybridisation). The species is tétraploïde with $2n=16$ with a basic number x equal to 4. The Establishment of the karyotype revealed the following organization: 2 big pairs métacentriques (I and II), 2 big subtélocentrics pairs (III and IV), and 4 small submétacentrics pairs (V, VI, VII, and VIII). The technique of CMA_3 revealed 26 bands (strips) almost centromeric distributed on 16 chromosomes. DAPI bands are among 12 in centromeric position with an intercalary band on the long arms of the chromosomes of the pairs II, III, IV, V, and VI, in juxtaposition with bands (strips) CMA_3 . The silver nitrates coloration (AgNO_3) revealed a number of nucleuses between 1 and 7 with a big frequency for 4 and 5, which indicate the activity of NORs.

The FISH revealed 5 loci rDNA 18S and 5 loci rDNA 5S. 18S sites are all in telomeric position on the chromosome pairs I, II, III, IV, V while 5S loci varies between intercalary, centromeric, and télomeric and are carried by the chromosomes of the pairs II, III, VII, VIII. Pair II wears two 5S sites at the same time.

Key words: *Bellevalia mauritanica*, Caryotype, FISH, NORs, Fluorochrome banding.

ملخص

Bellevalia Mauritanica Pomel صنف مستوطن لشمال إفريقيا، بهدف دراسة لتركيبها الجينية تطرقنا إلى الدراسة الكريولوجية بواسطة تقنيات التلوين الكلاسيكية للتلوين Feulgen، التلوين الفسفوري Fluorochrom banding (CMA₃, DAPI) إضافة إلى تقنية البيولوجية الجزيئية بواسطة FISH. التلوين با Feulgen اظهر الصيغة الصبغية 2ن=4س=16 و يتكون النمط من زوجين métacentrique (I, II) ومن زوجين subtelocentriques (III, IV) و4 أزواج (V, VI, VII, VIII) submétacentriques. تقنية التلوين ب CMA₃ اظهرت وجود 26 شريط، متوضعة على مستوى الجسم المركزي للكروموزومات ال 16. بينما يبلغ عدد الأشرطة التي أظهرها التلوين بال DAPI 12 شريطا، متوضعة في الجسم المركزي عدى واحدة على أحد الأذرع الطويلة، وذلك على كل من الأزواج VI, V, IV, III, II بالتجاور مع أشرطة CMA₃. التلوين ب AgNO₃ يؤكد على وجود عدد يتراوح من نوية واحدة إلى سبعة نويات، مع كون النسبة الأكبر تتراوح بين 4 و 5 نويلا في الخلية الواحدة مما يظهر مستوى نشاط مناطق تكوين النويات (NORs). بينما أظهرت ال FISH وجود 5 مواقع ADNr 18S وكذلك 5 مواقع ADNr 5S، مواقع ال 18S كلها متوضعة بشكل نهائي على الأزواج V, IV, III, II، بينما تتنوع المواقع 5S بين بيني و متمركز، و نهائي على الأزواج VIII, VI, III, II. تحمل الزوج II موقعين 5S في نفس الوقت.

الكلمات المفتاحية

Bellevalia mauritanica، نمط النواة، كروموسوم، مناطق تكوين النويات، Fluorochrom banding, NORs

Liste des tableaux et figures

Les tableaux

Tableau 1: Liste représentant quelques genres transférés de la famille des Liliaceae aux Hyacinthaceae. Page 4

Tableau 2: Différents caractères distinguant l'espèce *Bellevalia mauritanica*. Page 15

Tableau 3: Nomenclature chromosomique proposée par LEVAN et Coll. Page 28

Tableau 4: Données morphométriques de *Bellevalia mauritanica*. Page 38

Tableau 5 : nombre de nucléoles observés dans les cellules de *Bellevalia mauritanica* après coloration aux nitrates d'argent AgNO_3 . Page 43

Tableau 6: Résumé des résultats obtenus par chromomycine CMA, DAPI, FISH, chez différentes espèces du genre *Bellevalia* (étude anonyme non publiée) et de *Bellevalia mauritanica*. Page 45

Les figures

Figure 1 : Distribution géographique des *Hyacinthaceae* dans le monde. Page 7

Figure 2: Photographie de l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel. Page 11

Figure 3: Dessin représentant l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel. Page 14

Figure 4: Distribution de l'espèce *Bellevalia mauritanica* en Algérie. Page 17

Figure 5: Carte géographique montrant la distribution du genre *Bellevalia* Lapeyr dans le monde. Page 17

Figure 6: Caryotype de l'espèce *Bellevalia mauritanica*. Page 39

Figure 7: Photographies des chromosomes de *Bellevalia mauritanica* indiquant les différents marquages sur les chromosomes. Page 42

Figure 8 : histogramme représentant le nombre de nucléoles obtenus par noyau. Page 43

Figure 9: Les nucléoles après coloration aux nitrates d'argent. Page 49

Figure 10 : Photographie d'un herbier de l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel. Annexe

Abréviations

CMA₃ : chromomycine A₃

CMA+:coloration positive avec les séquences GC.

DAPI : Di-Amino-Phénil-Indol

FISH: fluorescent *in situ* hybridation, ou hybridation *in situ* fluorescente.

NORs: régions à organisateurs nucléolaires.

S : Svedberg (unité de mesure des unités ribosomiques exemple 18S ce nom est relié à la vitesse de sédimentation à travers une solution donnée par exemple le saccharose)

SSR : standard saline citrate buffer

Sommaire

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

Partie I : Synthèse Bibliographique

I-Presentation Du Genre <i>Bellevalia</i> Lapeyr.....	3
1-Hyacinthaceae ou Liliaceae.....	3
2-Presentation des Hyacinthaceae	5
2-1 Nom et Histoire.....	5
2-2- Caractéristiques générales	6
2-3 -Distribution géographique.....	6
2-4 -Valeur économique et culturelle	7
3- La notion d'endémisme.....	8
4-Position systématique de l'espèce <i>Bellevalia mauritanica</i>	10
Etymologie du nom.....	10
5- Description Botanique	11
5-1 - Description botanique du genre <i>Bellevalia</i> Lapeyr	11
5-2- Description botanique de l'espèce <i>Bellevalia mauritanica</i> Pomel.....	12
5-3- <i>Bellevalia</i> Lapeyr, <i>Muscari</i> Mill, et les autres genres similaires.....	13

6-Distribution géographique du genre <i>Bellevalia</i> Lapeyr et de l'espèce <i>Bellevalia mauritanica</i> Pomel.....	16
7-Travaux fait sur le genre <i>Bellevalia</i> Lapeyr.....	18
II-Notion de cytogénétique	19
1-Définitions	19
Hétérochromatine	20
NORs (Régions Organisatrices Nucléolaires)	20
2-Les marqueurs de cytogénétique employés dans l'étude	22
2-1-Le fluorochrome banding.....	22
Chromomicyne A ₃	22
DAPI.....	23
2-2-La FISH (Hybridation <i>in situ</i> par fluorescence)	23
2-3-Les nitrates d'argents AgNO ₃	24

Partie II : Materiel et Methodes

I-Matériel végétal	25
II-Méthodes.....	25
1-Dénombrement chromosomique.....	25
2- Analyse du caryotype	26
3- Etude de l'hétérochromatine.....	29

3-1- Coloration à la chromomycine A ₃	29
Préparation des protoplastes.....	29
3-2- Technique d'hybridation <i>in situ</i> par fluorescence	30
3-3- Coloration au DAPI.....	30
3-4- Coloration au nitrates d'argents (nucléoles)	31

Partie III- Résultats et Discussions

I- Etude du caryotype	32
II- Etude de l'hétérochromatine	36
La coloration a la chromomycine A ₃	36
La coloration au DAPI.....	36
III- Organisation des ADNr.....	37
IV- Activité des NORs	39
Discussion.....	40

PARTIE IV- Conclusion

Conclusion et Perspectives	45
References Bibliographiques.....	47

Annexes

Introduction

Introduction

L'Algérie est un pays possédant d'importantes richesses en ressources phytogénétiques. Grâce à sa position géographique, à la diversité pédoclimatique, et sa flore et faune méditerranéenne, il est considéré comme une zone disposant géographiquement d'un haut potentiel de variabilité génétique et d'une large gamme d'écosystèmes, ce qui enrichit la diversité en espèces spontanées et sub spontanées, estimées à environ 1000 genres et plus de 3000 espèces végétales. Cette richesse est principalement localisée dans les régions telliennes, et les secteurs humides et subhumides qui comportent des « hotspots » ou points chauds de biodiversité unique (Amirouche et Misset. 2009, Véla et Benhouhou. 2007).

La flore Algérienne reste mal connue, inexploitée, très peu étudiée en plus du danger de disparition qu'elle encourt. En effet sur les 3139 espèces végétales connues en Algérie 640 sont considérées comme rares et menacées d'extinction, tandis que 168 espèces endémiques à l'Algérie sont absolument à protéger. Sur ce même nombre d'espèces, 1611 soit plus de la moitié du total sont rares ou menacées de disparition. D'où l'urgence à étudier ces ressources et de mettre au point un plan pour leur sauvegarde et leur préservation.

Cette étude entre dans le cadre de l'étude de la biodiversité, nous nous intéressons à l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel endémique de l'Afrique Du Nord. C'est une plante pérennante du genre *Bellevalia* Lapeyr appartenant à la famille des *Hyacinthaceae*, connue pour les vertus et intérêts pharmaceutiques, phytochimiques, et aromatiques des espèces lui appartenant.

Le genre comprend plus de 65 espèces dispersées en régions méditerranéennes et centre ouest asiatiques.

En Algérie, *Bellevalia mauritanica* est localisé dans le Tel Algéro-constantinois. Elle se fait de plus en plus rare ce qui traduit une menace de disparition.

Beaucoup d'espèces de ce genre ont fait l'objet d'études caryologiques, taxonomiques, biochimiques et phytochimiques, à l'exception de *Bellevalia mauritanica*. De ce fait, nos travaux sur le plan caryologique et cytogénétique sont originaux.

Dans le but d'une contribution à l'évaluation génétique de cette espèce nous avons donc mené une étude cytogénétique, par l'application des méthodes de la cytogénétique classique et moléculaire.

Outre l'Introduction et la Conclusion, ce travail sera présenté en trois parties

-Recherche Bibliographique : consacrée à la connaissance de la famille, du genre et de l'espèce étudiée, et quelques notions de bases de la cytogénétique sont également citées.

-Matériels et Méthodes

-Résultats et Discussions : On y exposera les différents résultats obtenus avec les explications, interprétations et comparaisons à d'autres travaux.

Synthèse

Bibliographique

I- Présentation du genre *Bellevalia* Lapeyr

1-Hyacinthaceae ou Liliaceae

Dans la bibliographie des auteurs classent le genre *Bellevalia* Lapeyr dans la famille des Hyacinthaceae alors que d'autres la considèrent encore dans la famille des Liliaceae. La question qui se pose alors est : Quel est la juste classification pour ce genre ?

Un certain nombre de bouleversements de la classification des végétaux sont survenus suite à l'utilisation des phylogénies moléculaires. L'exemple le plus important est celui de la classification des Monocotylédones ; Dès 1985 des travaux sur la phylogénie ont révélé qu'un bon nombre des genres appartenant aux Liliaceae (au sens des flores usuelles) se retrouvaient dispersés dans plusieurs familles de l'ordre des Asparagales et non des Liliales (Mathez. 2008). Les deux groupes ont été considérés comme très proches par leur morphologie et leurs habitudes de vie similaires, néanmoins beaucoup de petits détails propre aux Asparagales (graines noires, nectaires situés dans les cloisons intercarpellaires, caractères biochimiques...) les séparaient et cela a été négligé dans l'ancienne classification.

Les premiers résultats moléculaires importants pour la systématique datent de 1987 (mise en évidence de la première diversification des composées). Mais l'essentiel des cladogrammes et de la classification a été confirmée et complétée ultérieurement par les résultats moléculaires. (Mathez. 2008)

Les phylogénies moléculaires des Asparagales et des Liliales ont donc conduit à une révision conséquente des groupements des différentes familles et leur composition en espèces. De nombreuses espèces rangées dans certaines familles sur la base de critères morphologiques sont reclassées dans d'autres ordres sur la base de ces résultats.

La réhabilitation du statut familial des petits groupes ainsi que la reformulation de la classification se confirme (Angiosperm Phylogeny Group. 2003) .Il reste à présent à éclaircir les phylogénies intra familiales. La définition plus fine de ces relations intrafamiliales grâce aux phylogénies moléculaires s'étend pour l'instant aux familles les plus connues comme les Asphodelaceae, les Hyacinthaceae, (Pfosser et Speta. 1999, Pfosser et al. 2003) les Agavaceae et les Amarylidaceae et d'autres familles plus circonscrites.

Ce qui fait que plusieurs espèces appartenant à la famille des Liliaceae sont réattribuées à la famille des Hyacinthaceae.

Dans le tableau suivant sont récapitulés les plus importants genres qui ont fait l'objet de transfert de la famille des Liliaceae vers les *Hyacinthaceae*

Tableau 01 : liste représentant quelques genres transférés de la famille des Liliaceae aux Hyacinthaceae (Angiosperm Phylogeny Group. 2003, Chilton et Marengo. 2008)

HYACINTHACEAE	
<i>Bellevalia</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Brimeura</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Charybdis</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Dipcadi</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Drimia</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Hyacinthella</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Hyacinthus</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Muscari</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Ornithogalum</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Othocallis</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Prospero</i>	(ex-Liliaceae)
<i>Scilla</i>	(ex-Liliaceae)

Les données de la classification phylogénique moléculaire modernes et la liste dans le tableau ci dessus nous permettent de dire clairement que le genre *Bellevalia* Lapeyr fait partie définitivement de la famille des Hyacinthaceae de l'ordre des Asparagales et n'est plus de celle des Liliaceae qui appartient à l'ordre des Liliales.

2- Présentation des Hyacinthaceae

2-1- Nom et histoire (étymologie)

Le nom de la famille est tiré du nom de la fleur *Hyacinthus*, décrite par le botaniste suédois Carl Von Linnaeus (Linné) en 1753 et classée par lui même en 1754 dans son livre « Genera Plantarum » où il s'est basé sur les critères morphologiques de la fleur. Le genre *Hyacinthus* représente avec *Ornithogalum* et *Scilla* les bases de fondement de la famille des *Hyacinthaceae*.

Le nom de la fleur dérive d'un mythe grec, dans lequel une belle fleur d'un rouge pourpre serait née du sang d'un jeune Lacédémonien Hyacinthus, le bien aimé du dieu Apollon, et qui l'aurait tué accidentellement.

Aujourd'hui la famille des Hyacinthaceae contient approximativement 70 genres et plus de 1000 espèces, dont la répartition a été longtemps contesté, néanmoins de récentes analyses d'ADN ont permis de subdiviser la famille en quatre sous familles :

-*Oziroideae*

-*Urgineoideae*

-*Ornithogaloideae*

-*Hyacinthoideae* à laquelle appartient l'espèce étudiée.

2-2- Caractéristiques générales

Les Hyacinthaceae sont pour la plupart des plantes bulbeuses, les inflorescences sont de simples racèmes comportant une à des centaines de fleurs. L'ovaire est supérieur les différenciant des plantes bulbeuses appartenant à la famille des Amaryllidaceae. (Speta, 2001)

La tige chez les Hyacinthaceae est saillante et ne porte pas de feuillage qui est basal, ce qui les distingue des Liliaceae sensu stricto.

Les fleurs de cette famille sont très visitées par les insectes et même les oiseaux pour certains genres. Les fruits sont des capsules. (Speta. 2001, Speis. 2004)

2-3- Distribution géographique

Les espèces de la famille des Hyacinthaceae ont des centres de diversité importants (Pfosser et Speta. 2001) qui s'étendent sur de vastes superficies autour du globe terrestre : de l'Afrique, la Méditerranée, le Proche Orient jusqu'en Inde avec quelques espèces au Sud Ouest Américain, et des étendues au Nord de l'Europe.

On retrouve donc les espèces dans les régions à climat saisonnier avec des périodes sèches ou froides prononcées et dans les régions tropicales mais peu dans les régions à larges superficies forestières

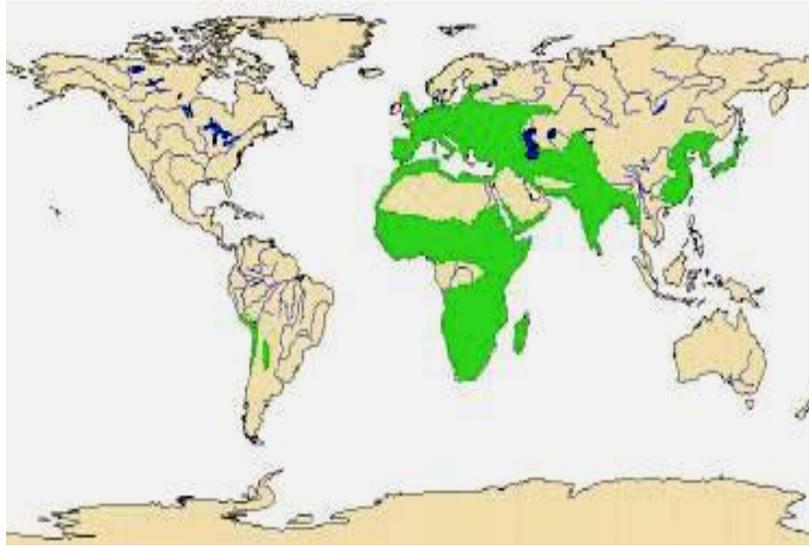


Figure 01 : Distribution géographique des *Hyacinthaceae* dans le monde. (En vert)

(Pfosser et Speta. 2001)

2-4-Valeur économique et culturelle

Certains genres de la famille des Hyacinthaceae sont utilisés en horticulture, tels *Hyacinthus*, *Muscari*, *Hyacinthoide*, *Scilla* voire même *Bellevalia* qui sont considérés comme des fleurs ornementales et sont cultivées et commercialisées dans plusieurs pays et représentent approximativement 3% des surfaces réservés à la plantation ornementale dans le monde. (Speis. 2004)

De nombreux genres appartenant aux Hyacinthaceae sont connus pour leurs vertus médicinales, et sont utilisés comme tel depuis l'antiquité, à commencer par les anciens égyptiens, les grecs, et les tribus africaines. Certaines espèces sont aussi connues pour leurs effets empoisonnants mais cela n'influe pas sur le fait que nombreuses d'entre elles

représentent de nos jours une grande ressource en phytopharmacie et phytochimie. Ainsi de nombreuses molécules à usage pharmaceutique en sont extraites, en plus des essences et huiles essentielles utilisées dans l'industrie des parfums et des produits cosmétiques en général.

Quelques Hyacinthaceae sont même utilisées dans la consommation alimentaire, comme c'est le cas des bulbes de *Muscari comosum*, *Ledebouria aperiflora* et *L. revoluta* ainsi que les inflorescences de *Lancomelos pyrenaicus* qui sont consommées dans certains pays européens et en Afrique du sud. (Pfosser. 2001, Speis. 2004)

3-La notion d'Endémisme

L'endémisme est la présence naturelle d'un groupe biologique exclusivement dans une région géographique délimitée. Ce concept, s'applique à toutes sortes d'êtres vivants.

Une espèce endémique (ou un taxon endémique) l'est obligatoirement par rapport à un territoire nommé. Les espèces endémiques d'une aire géographique forment un sous-ensemble des espèces présentes naturellement sur cette aire, sans que l'homme n'en soit la cause appelées espèces indigènes. Mais les espèces indigènes peuvent ne pas être endémiques si elles existent naturellement dans d'autres régions de la planète.

L'endémisme peut provenir de deux facteurs :

L'apparition de nouvelles espèces, dite « processus de spéciation » liée à l'isolement géographique (divergence progressive des caractéristiques génétiques et/ou morphologiques). On dit alors espèces « *néo-endémiques* », puisque l'endémisme provient de l'apparition de nouvelles espèces. En général plus la région écologique est ancienne plus le têt d'endémisme

est élevé. La position géographique est également un facteur important. (Favarger, Siljak-Yakovlev. 2000)

On parle d'espèces « *paléo- endémiques* » si une espèce disparaît partout ailleurs sur son ancienne aire de répartition et peut devenir endémique sur une aire géographique restreinte et isolée; Des invasions biologiques peuvent éliminer une espèce d'un continent alors qu'elle survivra sur des îles isolées.

L'avancée de déserts ou des glaciations impliquent certaines migrations vers des zones refuge où des mélanges génétiques d'espèces floristiques, fongiques ou animales ont pu induire des phases d'hybridation et de spéciation source d'endémismes locaux

En règle générale, le taux de taxa endémiques d'une région nous indique son degré d'isolement par rapport aux autres territoires. Ainsi les massifs montagneux, les lacs et les îles peuvent être des zones de fort endémisme.

Le taux d'endémisme est un des indicateurs et des éléments d'appréciation de la biodiversité d'une région. Grâce au nombre élevé d'espèces endémiques que compte la méditerranée, soit 50% des 30000 taxons, vivants dans les 2.3 million km² de superficie que compte le Bassin Méditerranéen; en d'autre terme, 1.6% de superficie du globe terrestre contiendrai plus de 10% de toutes les espèces végétales supérieurs de la planète (Medail 2006), la méditerranée et ses abords sont considérés comme un des « *hotspots* » planétaires pour la biodiversité. (Memtsas et al. 2002, Medail. 2006)

4-Position systématique de l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel

L'espèce *Bellevalia mauritanica* entre dans la classification suivante.

Règne : Plantae

Sous règne : Viridae plantae Cavaleer

Division : Tracheophyta

Sous division : Spermatophytina

Infra division : Angiospermae

Classe : Liliopsida (monocotylédone)

Sous classe : Liliidae

Ordre : Asparagale

Famille : *Hyacinthaceae*

Sous famille : *Hyacinthoideae*

Genre : *Bellevalia*

Espèce : *Bellevalia mauritanica* Pomel

- **Etymologie du nom**

Nom donné par P. Picot de Lapeyrouse en 1808, en hommage au botaniste français Pierre Richer de Belleval (1564-1632), fondateur en 1593 du jardin botanique de Montpellier, d'où l'on a le nom *Bellevalia* Lapeyr pour le nom du genre.



Figure 02: Photographie de l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel.

5-Description Botanique

5-1-Description botanique du genre *Bellevalia* Lapeyr

C'est une plante bulbeuse atteignant jusqu'à 30cm ou plus, à feuilles basiliaires (radicales) plus ou moins large, linéaires ou lancéolées. Ses fleurs sont pédonculées, nombreuses en grappes terminales (munies de bractéoles très petites ou avortées). La plupart des fleurs de *Bellevalia* sont d'une couleur brune, et seulement peu de fleurs sont de couleurs attractives et sont généralement de couleur bleu.

Le périanthe caduc est de forme cylindrique, tubuleux ou en cloche, divisé au moins jusqu'au quart supérieur parfois même jusqu'à la moitié en 6 lobes obtus, dressées ou dressés étalés ; les étamines égalant presque le périanthe sont insérés à sa gorge et sont inégales, à filets plus ou moins dilatés à la base et subulées, anthères médifixes , l'ovaire contient de 2 à 6 ovules par loge, le style est simple à stigmate tronqué ou obtus ; le fruit est une capsule triquètre, à coque comprimée-aigüe, loculicide à loge renfermant deux graines lisses et sphériques noires et souvent pruneuses.

Le genre *Bellevalia* comprend plus de 65 espèces, et les qualités morphologiques de différenciation des espèces entre elles sont très faibles, néanmoins les caractères les plus utilisées sont :

Couleur des tépales, Largeur des feuilles, forme et densité du racème, relation longueur du pédicelle/périanthe, relation tube/lobe, en fin couleur du périanthe, formes des anthères et bourgeons (Bareka. 2008) en plus de la morphologie des graines.

5-2- Description botanique de l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel

Bellevalia mauritanica Pomel, est une plante endémique de L'Afrique du Nord selon son auteur Pomel (1860) et par Quezel et Santa (1962), elle se caractérise par les traits suivants:

C'est une inflorescence en grappe les fleurs sont oblongues, cylindriques et assez fournies, d'un violet brunâtre, blanchâtre vers le haut, d'environ 1cm. Le pédicelle est violet, étalé un peu plus court que la fleur. Le périanthe aussi est de couleur violet obscure vers l'extérieur, puis brun violet sur le tube et pale vers le sommet, blanc rayé de vert sur le dos des divisions et blanc lavé de violet intérieurement, long de 10mm oblong, assez épais, divisé un peu au delà du milieu en lobes obdeegs.

L'ovaire est bleu avec des lignés blanchâtres, avec un style bleu à la base et blanc au sommet.

Les anthères prennent aussi la couleur violet, avec des étamines à filets subulés, plus grands que les anthères, élargis contigus et presque cohérents à la base, deux fois larges comme leurs anthères.

La tige porte de 3 à 4 feuilles au moins aussi longues que la hampe, étalées roulées en goullière, largement linéaire, un peu alidupées vers le sommet, elles sont larges de 2 à 3 cm/40cm de long à bords cillés sabrés.

Le bulbe est brun noirâtre. Les capsules sont grandes, à valves cunéiformes subornées par l'échancrure du sommet, alors que les grains sont noirs, globuleuses, lisses, et mates.

La floraison se fait dans la période entre mars et mai. Et pousse sur des terrains argileux.

5-3- *Bellevalia* Lapeyr, *Muscari* Mill, et les autres genres similaires.

Au niveau morphologique le genre *Bellevalia* est très proche de *Muscari* Mill ; les jeunes fleurs non épanouies, situées vers le sommet de l'inflorescence chez *Bellevalia*, présentent souvent une couleur différente des fleurs adultes ; elles peuvent alors évoquer les fleurs stériles que l'on observe dans le genre *Muscari*. Une grande ressemblance est aussi notée avec les espèces *Hyacinthella Schur*, et *Hyacinthus L*, qui sont souvent confondus.

Mais il y'a un petit trait de distinction morphologiquement parlant :

Le trait le plus utilisé est la forme des filets, qui sont liés au tube du périanthe, dont les parties libres, sont plus ou moins triangulaires, dilatés à la base (Persson et Windelbo. 1979).

Au niveau cytologique la différence est plus évidente, car les chromosomes de *Bellevalia* sont très distingués de ceux des autres genres que ça soit par leurs formes plutôt stable, leur grande taille ou le nombre de base qui est de $x = 4$, alors qu'on a un nombre de

$x = 9$ pour *Muscari* et $x = 10$ ou 11 pour *Hyacinthella* avec des formes chromosomiques très différentes.

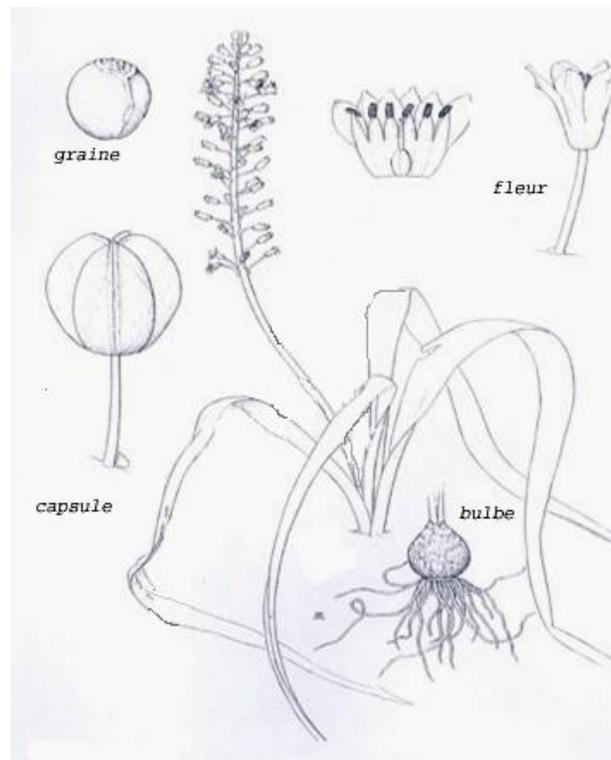


Figure 03: Dessin représentant l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel.

Tableau 02 : Différents caractères distinguant l'espèce *Bellevalia mauritanica* (Brullo et al, 2009)

Caractères	Mesures (formes)
Formes du bulbe	Ovoïde ou subglobulaire
Taille du bulbe (cm)	4×3,5-4
Nombre de feuilles	3-4
Longueur des feuilles (cm)	30-40
Largeur des feuilles (mm)	20-30
Forme des feuilles	Ciliée
Nombre de tige	1
Longueur de tige (cm)	30-40
Nombre de fleurs par inflorescence	30-40
Longueur de la bractée (mm)	2-2,5
Longueur du pédicelle (mm)	8-12
Pédicelle / périanthe	Plus court ou presque égal
Longueur du périanthe (mm)	9-12
Longueur de l'ovaire (mm)	4,5-6
Longueur des filets des étamines (mm)	2,5-2,8
Longueur des anthères (mm)	3
Forme de la capsule	Cunéiforme.
Taille de la capsule (mm)	10-12×10-12
Nombre chromosomique (2n)	16

6- Distribution géographique du genre *Bellevalia* Lapeyr et de l'espèce *Bellevalia mauritanica*

La distribution générale du genre *Bellevalia* s'étend à plus de 65 espèces habitant l'Europe méridionale, l'Afrique Du Nord, et le Sud Est de l'Asie où se trouve le plus grand nombre d'espèces sur tout dans la région Irano-Touranienne (Feinbrun. 1938-1940). *Bellevalia mauritanica* qui est endémique de l'Afrique Du Nord s'étend de l'Egypte jusqu'en Algérie en passant par la Tunisie et la Libye. (Maire. 1958)

En Algérie elle est déclarée par Quezel et Santa (1962), très commune dans le Tell Algéro-constantinois, elle se trouve dans les champs et pâturages, marais, au bord des routes, les forêts et les endroits humides en général.

Nos prospections (dans l'Est Algérien) nous ont permis de constater la rareté de cette espèce, ce qui témoigne sans doute de la menace de disparition qui pèse sur elle.

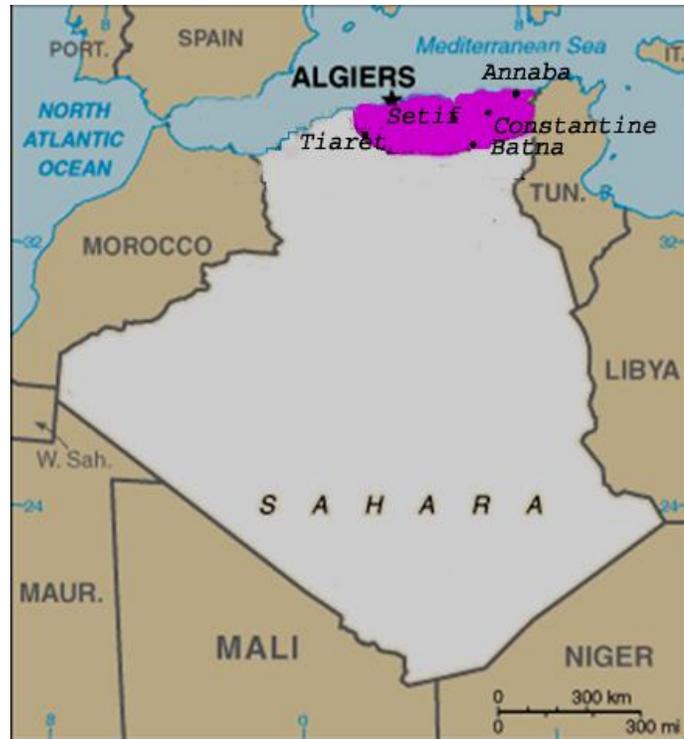


Figure 04: Distribution de l'espèce *Bellevalia mauritanica* en Algérie (en violet) selon Quezel et Santa.



Figure 05: Carte géographique montrant la distribution du genre *Bellevalia* Lapeyr dans le monde (points rouges)

7-Travaux fait sur le genre *Bellevalia* Lapeyr :

Le genre *Bellevalia* Lapeyr a toujours attiré l'intérêt des scientifiques, que ça soit dans les domaines de chimie ou la biologie, et c'est les botanistes et par la suite les cytogénéticiens qui l'ont le plus étudié.

-En 1808 le botaniste français Picot De Lapeyrouse décrit la fleur et lui donne son nom en hommage à Richer de Belleval un autre botaniste français.

-En 1932 Dark parvient à observer les chromosomes chez l'espèce *Bellevalia romana*, et à distinguer leur grande taille, ce qui fait d'elle l'objet d'une série d'études sur les chromosomes, et les formes d'échanges d'ADN inter chromosomiques, et différentes études cytologiques de façon générale par Taylor en 1954-1957, Lindemann en 1956 et Gläss en 1962 jusqu'en 1968.

-Quelques essais de culture in vitro sur cette même espèce ont donné de bons résultats par des équipes italiennes Lupi et al entre 1985 et 1989, mais sans donner suite.

-Dans le domaine de la phytochimie ,des substances homoisoflavonoïdes ont été isolés de certains espèces du genre de *Bellevalia* Lapeyr par une équipe de chercheurs italiens (Adinolfi et al. 1989), ces mêmes substances ont été isolés du genre *Muscari* dans une recherche plus récente (Miadokova et al. 2002) où il s'est avéré qu'elles ont des effets antimutagènes très importants ,ce qui révèle le potentiel que le genre *Bellevalia* peut avoir dans le domaine pharmacologique, d'ailleurs ça a ouvert des perspectives sur cette voie et a inciter d'autres à donner suite à ces travaux sur d'autres espèces du genre *Bellevalia*.

- Pour la part des botanistes, des études morphologiques et systématiques sur plusieurs espèces du genre ont été faites, dans différentes régions où elles vivent, Feinburn. 1932, Maire. 1958, Windelbo. 1970 etc. Pour aller ensuite vers l'aspect caryologique et cytogénétique, et le domaine de la cytotaxonomie, là nombreux sont les auteurs, Feinburn,

Windelbo, Persson, Ozhatay, Gettner, Jafary, Brullo ...etc. Plusieurs espèces du genre ont été étudiées qu'elles soient endémiques ou pas.

A notre connaissance les techniques utilisées dans ces études n'ont pas été plus loin que la cytogénétique classique et l'étude conventionnelle du caryotype.

De nouvelles espèces sont continuellement décrites et les travaux continuent sur l'étude du genre, et beaucoup de choses restent à faire dans ce domaine pour pouvoir arriver aux rapports phylogéniques et l'étude de l'évolution d'un genre aussi largement répondu.

Il est à noter que dans tous les travaux précédents, la seule citation de l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel est celle de la Flore de l'Afrique du Nord par Maire en 1958 et la description morphologique de l'espèce faite par Quezel et Santa en 1962 lors de l'étude de la flore Algérienne.

Tout ça indique qu'il y'a encor du travail à faire sur le genre de manière générale et sur l'espèce *Bellevalia mauritanica* en particulier.

II-Notion de cytogénétique

1-Définitions

Les définitions des principales notions de cytogénétique ont été décrites dans les précédents travaux menés au laboratoire : Benhizya (1999), Hammouda (1999), Bouziane (2003), Benammara (2005), Betina (2005), Hilmi (2010). Dans ce mémoire nous nous attacherons à rappeler celles essentielles à notre étude.

Dans l'aspect cytogénétique les composantes cellulaires étudiées sont les chromosomes et la matière génétique les composant qui est l'ADN. Selon les traitements et colorations utilisés pour observer les chromosomes, on peut visualiser plusieurs types de

régions ou de structures; dans cette étude ceux qui nous intéressent sont, l'hétérochromatine constitutive, et les régions organisatrices nucléolaires.

- **Hétérochromatine**

C'est un segment de la chromatine qui ne se décondense pas durant l'interphase, elle contient des séquences hautement répétées d'ADN riches en paires de bases AT ou GC selon les sites et les espèces, et elle se réplique très tardivement durant la phase de synthèse S de l'ADN. Elle contient en grande partie de longs fragments de séquences assez courtes (5 à 500pb) répétées en tandem. Ce sont les ADN satellites. Ces séquences d'ADN là sont souvent méthylées (Hayes. 2000), ce qui induit une faible densité de gènes exprimés et un taux de recombinaison réduit.

L'hétérochromatine se situe dans les régions juxtaposants les centromères des chromosomes, aux extrémités (les télomères) et même par fois dispersées dans l'euchromatine. (Hayez. 2000)

L'hétérochromatine est proportionnellement pauvre en gènes comparés à l'euchromatine mais cependant elle n'est pas totalement dépourvue d'activité génétique. (Hayez. 2000)

- **NORs : (Régions organisatrices nucléolaires)**

Les Régions organisatrices nucléolaires ont été décrites pour la première fois par Heitz (1931) et Mc Clintock (1934) comme étant des régions de chromatine très faiblement marquées, et autour des quels se forment les noyaux en fin de télophase après qu'ils aient disparues durant la phase mitotique de la cellule (Derenzini. 2000). Sur les chromosomes métaphasiques des eucaryotes, ces régions apparaissent sous forme de constriction secondaires associées aux satellites et leurs nombre varie d'un organisme à un autre (Hayes

.2000) Les NORs sont des segments chromosomiques qui contiennent des gènes ribosomiques (ADNr) et des protéines ribosomiques (Sirri. 2000, Treré.2000, Hernandez-Verdun. 2004).

Ces protéines sont marquées par les nitrates d'argents (AgNO_3) et qui apparaissent sous forme de points noirs dans le noyau interphasique. (Derenzini. 2000).

A l'intérieure des NORs interphasiques sont enfermés tous les composants nécessaires à la transcription ribosomale, ce qui fait d'eux des unités structurales et fonctionnelles pour la synthèse des ARNr. (Derenzini. 2000)

Les régions organisatrices nucleolaires (NORs) contiennent les gènes ADN ribosomiques 18S-5.8S-26S (Heslop-Harrison. 1991, Hernandez-Verdun. 2004)

L'étude de la structure des NORs a montré que les différents gènes ribosomiques sont composés de deux familles de gènes codant pour l'ARN, les gènes codant pour l'ADNr 18S et ceux codant pour l'ADNr 5S. Ces deux familles représentent une composante majeure de l'ADN hautement répété, les gènes sont répétés en tandem regroupés sur un ou plusieurs sites chromosomiques, chaque unité codante d'ADNr 18S est formée de 3 unités (18S, 5.8S, 26S) séparée par des espaceurs internes transcrits (ITS1,ITS2)et bordés par des espaceurs intergéniques non transcrits (IGS). (Hernandez-Verdun. 2004)

Les unités codantes pour les deux familles sont hautement conservées dans tout le règne végétal et sont soit séparées sur tout les chromosomes ou bien portées par le même chromosome, mais il y'a aussi des exemples de leur juxtaposition ou co-localisation (Syljack-Yakovlev, 2003). Le nombre et la position des gènes ADNr sont constants dans une espèce, mais varient entre les espèces, même très proches. Ce qui fait qu'ils représentent un marqueur cytogénétique important pour l'étude d'évolution chromosomique.

2-Les marqueurs de cytogénétique employés dans l'étude.

Le classement des paires de chromosomes aboutit au caryotype de l'individu et nous donne sa formule chromosomique selon une nomenclature bien définie. Cela peut être complété par d'autres marquages et ainsi donner une cartographie plus complète.

2-1- Le fluorochrome banding

Les chromosomes représentent une variation considérable de taille et de contenu en ADN, et leur composition de base peut varier : riches ou pauvres en gènes ceux là ont un pourcentage élevé soit en bases GC ou AT respectivement. Ces différentes régions se disposent différemment sur les chromosomes, d'où la nécessité d'appliquer des colorations et les banding pour les marquer et établir le caryogramme qui est une représentation de la totalité des bandes chromosomiques.

Les bandes reflètent des variations de la structure longitudinale des chromatides et permettent de différencier les chromosomes de manière plus précise.

Différents traitements impliquant la dénaturation et /ou la digestion enzymatique de la chromatine, puis l'incorporation de colorants spécifiques de l'ADN pour faire apparaître sur les chromosomes mitotiques, une succession de bandes colorées et sombres.

- **Chromomycine A₃ :**

Colorant utilisé pour le marquage des chromosomes, qui est à l'origine un anticorps qui se lie préférentiellement aux régions d'ADN riches en GC, il produit une forte fluorescence avec l'hétérochromatine riche en GC incluant l'hétérochromatine associée aux organisateurs nucleolaires dans beaucoup d'espèces (Sumner.1994). Le seul problème avec la chromomycine c'est la pâleur des fluorescences qui se produit par fois lors de l'illumination des lames mais cela peut être réglé.

- **DAPI :**

Di-Amino-Phénol-Indol colore les régions riches en séquence AT ou bien comme il est utilisé dans ce travail pour le marquage de l'hétérochromatine constitutive non spécifique.

2-2-La FISH (Hybridation *In Situ* Par Fluorescence)

C'est une technique qui permet une caractérisation rapide de l'aspect structural des chromosomes, son principe est basé sur l'hybridation efficace et spécifique de sondes d'ADN dénaturées *in situ* et marquées aux fluorochrome avec des séquences nucléotidiques complémentaires dans l'ADN des chromosomes à étudier et pour cela la préparation de chromosomes métaphasiques est faite sur lames.

L'ADN chromosomique est partiellement purifié par traitement à l'ARNase et protéinase K, et dénaturée par exposition à la formamide. L'ADN dénaturé peut ensuite être testé par hybridation *in situ* en ajoutant une solution contenant la sonde d'acide nucléique marqué, recouverte d'une lamelle.

Selon la technique utilisée les bandes chromosomiques peuvent être observées avant ou après l'étape d'hybridation.

Le signal obtenu après avoir enlevé l'excès de sonde peut être corrélé au profil de chromosomes afin de déterminer la localisation des séquences d'ADN reconnues par la sonde.

Le matériel le plus utilisé dans la FISH pour le caryotype (cartographie physique) des plantes sont les séquences ADNr 5S et 25S répétés en tandem, et qui sont spécifiquement répétés près des télomères et centromères. (Kato et al. 2005). Ces séquences sont répétées en tandem dans des milliers de copies dans un ou plusieurs locus chromosomiques. (Heslop-Harrison. 1991) La FISH permet d'estimer le nombre de copies de gènes ribosomiques de ces séquences, ce qui fait d'elle une technique qualitative et quantitative.

2-3 Les nitrates d'argents (AgNO_3)

La coloration aux nitrates d'argents est une méthode de coloration qui fait marquer les protéines ribosomiques à l'intérieure des noyaux interphasique et cela reflète l'activité des sites NORs dans la cellule.

Au même endroit où se trouvent les NORs sont groupées des protéines acides hautement argyrophiliques qui se fixent aux nitrates d'argents et se colorent rapidement ce qui rend la localisation des NORs sur le noyau interphasique rapide et facile. Ces protéines sont appelés les protéines « AgNORs » ou « AgNOR's proteins » en anglais. (Derenzini. 2000)

Une série de recherches ultra structurelles a démontré que durant l'interphase les NORs sont localisés dans la composante fibrillaire du noyau, ces centres fibrillaires et les composantes qui les entourent sont les seules marqués par les nitrates d'argents, visibles même dans les chromosomes métaphasiques et qui contiennent les gènes ribosomiques. (Derenzini. 2000)

Matériel
et
Méthodes

Matériel et Méthodes

I- Matériel végétal

Le matériel végétal utilisé était sous forme de bulbes de l'espèce *Bellevalia mauritanica*. Ces bulbes ont été récoltés à Chaab Erssas Constantine dans un sous bois.

La localité est géographiquement située entre les lignes 36° Nord et 6° Est à 568 m d'altitude. (www.Google earth.com).

Les bulbes sont mis dans de l'eau pour la poussée de nouvelles racines. Une vingtaine d'individus ont été utilisés dans l'étude.

II-Méthodes

1- Dénombrement chromosomique

Le dénombrement chromosomique s'effectue à partir des mitoses racinaires selon le protocole suivant :

- **Obtention de racines**

Les racines sont prélevées après qu'elles aient atteints la taille de 10 à 20 mm et au moment où la division cellulaire est à son taux maximal.

- **Prétraitement**

Les racines prélevées sont trempées dans un agent mitocalsique, qui est la colchicine à 0,3% pendant une durée allant de 3 heures et demi jusqu'à 4 heures à température ambiante puis mises toute la nuit à température entre 4°C à 5°C. (Gettner.2005)

- **Fixation**

La solution de fixation utilisée est le carnoy (3 :1) qui est composée de 3 volumes d'éthanol et un volume d'acide acétique absolu. La fixation dure de 24 jusqu'à 48 heures à

4°C. La fixation détruit toute vie cellulaire, bloque l'évolution des divisions cellulaires et donc conserve la structure des chromosomes.

- **Hydrolyse**

Les racines sont récupérées et mises dans une solution d'hydrolyse qu'est l'HCl (1N) à 60°C pendant 15 minutes.

Cette étape a pour but de détruire la paroi cellulosique et de faciliter l'obtention de cellules séparées et l'observation des chromosomes.

- **Coloration**

Les zones méristématiques hydrolysées sont ensuite mises dans une solution de coloration qui est le réactif de Schiff (Feulgen. 1926 in Jahier. 1992) pendant 30 à 45 minutes (annexe). Ce colorant se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse pour donner une coloration rouge aux chromosomes.

- **Montage des lames**

Après coloration, les racines sont récupérées, et disposées sur une lame, la zone méristématique (la plus colorées) est découpée, dans une goutte de carmin acétique, et écrasée entre lame et lamelle, pour assurer la dispersion des cellules.

2- Analyse du caryotype

- **Observation et photographie**

Après montage final, on procède à l'observation des préparations, la sélection des meilleures plaques métaphasiques et la photographie de celles-ci.

La photographie des plaques choisies se fait à l'aide du photomicroscope (Axiovision, Zeiss) au grossissement $1575 = (2.5 \times 63 \times 10)$ obtenu par la combinaison : (oculaire \times objectif \times coefficient de la camera connectée au photomicroscope)

- **Etablissement du caryotype**

-La plaque métaphasique

-Le caryogramme

A partir des photographies de cinq plaques appartenant à des individus différents, on a dénombré et mesuré les chromosomes, ensuite appariés et alignés de la plus grande paire à la plus petite.

-L'Idiogramme

Différentes mesures sont effectuées sur les chromosomes de l'espèce *Bellevalia mauritanica* pour l'établissement de son idiogramme :

Calcul des longueurs des bras longs (BL), et courts (BC)

Calcul des valeurs moyennes de la longueur des bras longs et courts en μm et les erreurs standards correspondantes.

Calcul des longueurs totales : $LT = BL + BC$

Calcul des longueurs totales relatives : $LTR = (LT / \sum LT) \times 100$

Calcul des valeurs moyennes des rapports bras long/bras court $r = BL/BC$

Calcul des indices centromériques pour chaque paire chromosomique :

$Ic\% = (BC / LT) \times 100$

Calcul de l'indice d'asymétrie du caryotype : $Ias \% = (\sum BL \times 100) / \sum LT$.

Toutes ces mesures sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau 03: Nomenclature chromosomique proposée par Levan et Coll. (1964) in Siljak-Yakovlev. (1986)

Position du centromère	d	r	I.c	T.c
Point médian	0.00	1.0	50.0	M
Région médiane	0.00-2.5	1.0-1.7	50.0-37.5	m
Région submédiane	2.5-5	1.7-3	37.5-25	sm
Région subterminale	5-7.5	3-7	25-12.5	st
Région terminale	7.5-10	7.0-∞	12.5-0.00	t
Point terminal	10.0-.....	∞	0.00	T

T.c : Type chromosomique

M : métacentrique sensu stricto

m : métacentrique sensu largo

sm : submétacentrique

st : subtélocentrique

t : acrocentrique

T : télocentrique

r : bras long / bras court

d : bras long – bras court

I.c : indice centromérique

3- Etude de l'hétérochromatine

Nous avons appliqué les méthodes de marquage du génome suivantes :

- l'utilisation du fluorochrome banding (chromomycine A₃, DAPI) pour localiser les régions hétérochromatiques riches en séquences AT et GC.
- la cartographie physique des gènes ribosomiques par l'hybridation *in situ* (FISH).
- l'analyse de l'activité des organisateurs nucléolaires (NORs) par coloration aux nitrates d'argent (Ag NO₃⁻).

3-1- Coloration à la chromomycine A₃

- **Préparation des protoplastes**

- Les méristèmes racinaires sont plongés dans un tampon citrate à 0.01 M pendant 10 mn.
 - Ensuite sont transférés dans un verre de montre contenant une solution enzymatique.
- (Annexe)
- Le verre de montre est placé dans une boîte de Pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau, qui est mise dans une étuve réglée à température de 37°C pendant une durée de (1 heure 30 min jusqu'à 2 heures) de temps.
 - Après récupération des pointes racinaires, celles-ci sont rincées à l'eau distillée pendant 10 mn ou plus pour dilater les cellules.
 - Les pointes sont triturées dans une goutte d'acéto-orceine ou d'acide acétique à 45% à l'aide de deux aiguilles, sous binoculaire.
 - La préparation est montée entre lame et lamelle pour le repérage et l'observation des chromosomes.

- **Fluorochrome banding**

Le protocole utilisé est celui de Martin et Heisemann (1988) avec quelques modifications concernant le temps de coloration :

- Incubation des lames dans le tampon Mc Ilvaine pH=7 contenant 20 mM de MgCl₂ pendant 15 mn. Il est recommandé de bien secouer les lames pour se débarrasser de l'excès du tampon.
- Rajout d'une grosse goutte de chromomycine A3 pendant 10 mn à l'obscurité.

Rinçage avec le tampon Mc Ilvaine à pH=7.

- Contre coloration au vert de méthyle à 0.01% dans le tampon Mc Ilvaine à pH=5,5 à l'obscurité.
- Séchage des lames.
- Montage des lames dans une goutte de glycérol 1:1 avec le tampon Mc Ilvaine +20 mM MgCl₂ à pH=7.
- Observation au microscope à épifluorescence avec un filtre permettant une longueur d'onde d'excitation de 450 nm et d'émission de 560nm.

3-2-Technique d'hybridation *in situ* par fluorescence

La technique d'hybridation *in situ* doit être appliquée sur des protoplastes.

Les étapes suivies pour la FISH ainsi que pour le DAPI sont expliquées en détail dans l'annexe.

3-3- DAPI

La coloration DAPI effectuée est appliquée après la dénaturation/renaturation de l'ADN, détecte l'hétérochromatine constitutive non spécifique. Explications dans l'annexe.

3 -4- Coloration au nitrate d'argent (Nucléoles)

La méthode utilisée est celle de Howell et Black (1980).

Pour révéler les régions NOR's, il faut faire subir aux plaques métaphasiques un traitement en conditions alcalines. Ensuite, il faut procéder à une coloration avec le nitrate d'argent qui réagit avec les protéines associées spécifiquement aux NOR. Ces protéines seront colorées, si elles ont participé à la formation des nucléoles durant l'interphase.

Cette méthode comporte les étapes suivantes:

- Prélèvement et traitement des racines selon le protocole habituel (colchicine à 0,3% puis fixation à la solution de Carnoy pendant au moins 24 heures).
- Rinçage renforcé des racines avec l'eau distillée afin d'éviter toute trace du fixateur.
- Les racines sont plongées dans une solution de Nitrate d'argent à 15% et un pH=5,5 à 60°C pendant 16 heures.
- Un deuxième rinçage des racines à l'eau distillée.
- Les racines sont transférées dans une solution de révélation constituée de 1% d'hydroquinone et de formaldéhyde (1 % hydroquinone+ Formaldéhyde 10 %), pendant 5 mn.
- Nous passons au rinçage dès que les pointes racinaires se colorent en marron.
- L'écrasement des pointes racinaires se fait dans une goutte d'acide acétique à 45 % entre lame et lamelle.

Les nucléoles sont colorés par le brun, les chromosomes en jaune pâle, les NORs en brun noirci.

NB :

Il est à signaler que deux techniques supplémentaires ont été tentées, le C banding et le N banding, mais sans donner de résultats exploitables. Faute de protocoles adéquats.

Résultats
et
Discussion

Résultats et Discussion

I-Etude du caryotype

L'observation des plaques métaphasiques colorées au Feulgen nous a permis de déterminer le nombre chromosomique de l'espèce qui est de 16 chromosomes ($2n=16x$). Ce nombre est conforme au nombre de chromosomes de base du genre *Bellevalia* qui est de $x=4$ (Johnson. 2003). *Bellevalia mauritanica* est donc tétraploïde ; la polyploïdie est un phénomène très observé dans le genre *Bellevalia*, (Gettner. 2005) avec des niveaux allant de diploïde, à tétraploïde, hexaploïde, pentaploïde, voire même octoploïde. (Persson et Wendelbo. 1979, Ozhatay et Johnson. 1996, Gettner. 2005, Jafari. 2008, Bareka et al. 2008, Brullo et al. 2009).

Les nombres chromosomiques sont donc entre $2n = 8x, 16x, 24x$, jusqu'à $32x$.

Les mesures des chromosomes sur cinq plaques métaphasiques choisies, a permis la constitution du caryotype de *Bellevalia mauritanica*.

D'après le tableau 03 des données morphométriques, on constate que le caryotype de l'espèce est constitué de 8 paires chromosomiques :

-2 paires métacentriques, I et II.

-2 paires subtélocentriques, III et IV

-4 paires submétacentriques, V, VI, VII et VIII.

Les paires I et V ont des constriction secondaires.

Ce qui donne la formule suivante : $2n = 4x = 16 = 4M + 8sm + 4st$.

La présence de constriction secondaires a été observée sur les paires I et V, portée sur le bras court de la première et le bras long de la deuxième. La présence de satellites et /ou constriction secondaires est confirmée chez d'autres espèces du genre *Bellevalia* bien

qu'elles ne soient pas localisées au même endroit ou sur les mêmes paires chromosomiques. (Persson. 1979 et 2005, Jafari et al. 2008, Bareka. 2008, Brullo et al. 2009)

La longueur totale moyenne des chromosomes est comprise entre 9.17 μm et 19.12 μm et les longueurs relatives entre 9.03 μm et 18.83 μm . La moyenne des longueurs totales de l'ensemble des chromosomes est de 12.69 μm , elle nous permet une appréciation de la taille du génome qui est importante. La grande taille des chromosomes est une des caractéristiques du genre *Bellevalia*. Les résultats obtenus nous permettent de dire que les chromosomes de *Bellevalia mauritanica* sont parmi les plus grands chromosomes du genre *Bellevalia* juste après ceux de *Bellevalia saviic* dont la taille du plus grand chromosome atteint une longueur entre 18,98 μm et 19.20 μm .(Getnner. 2005, Jafari. 2008)

Le caryogramme et l'idiogramme montrent une variation concernant la taille des chromosomes ainsi que leurs formes.

La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la plus courte ($R = 2.08$) et la valeur d'indice d'asymétrie ($I_{as} \% = 65,34$), la présence de trois types chromosomiques différents (métacentrique, submétacentrique, et subtélocentrique.), la différence de leurs tailles, et la présence de constriction secondaires sur deux paires, font que le caryotype de *Bellevalia mauritanica* est asymétrique.

Bellevalia mauritanica a un caryotype typique au genre *Bellevalia* Lapeyr, qui de manière générale est formé d'une paire de chromosomes métacentrique, une paire acrocentrique et deux paires submétacentriques de même taille, et dont le nombre chromosomique de base est de $x = 4$.

Tableau 04: Données morphométriques de *Bellevalia mauritanica*

Paire n°	BC (µm)	BL	LT	LTR	D	r	Tc	Ic%
I	8,09 (0,8133)	11,03 (1,5937)	19.12	18.83	2.94	1.36	m	42.23
II	7.49 (0,4142)	9,4 (1,2799)	16.89	16.63	1.91	1.25	m	44.43
III	2.59 (0,4480)	10,48 (0,7325)	13.17	12.97	7.79	3.89	st	24.71
IV	2,50 (0,6441)	10,33 (0,9097)	12.83	12.63	7.83	4.13	st	24.42
V	3,90 (0,5113)	7,06 (0,9890)	10.96	10.79	3.16	1.81	sm	55.24
VI	3,64 (0,4173)	6,30 (0,5983)	9.94	9.79	2.66	1.73	sm	57.77
VII	3,49 (0,3367)	5,95 (0,5818)	9.44	9.29	2.46	1.70	sm	58.65
VIII	3,38 (0,4864)	5,79 (0,7315)	9.17	9.03	2.41	1.74	sm	58.37

R = 2.08
Ias % = 65.34

LTR : longueur totale relative

R : la plus longue paire / la plus courte paire

d : bras court – bras long

Ias % : indice d'asymétrie

Ic % : indice centromérique.

r : bras long /bras court

Tc : type chromosomique.

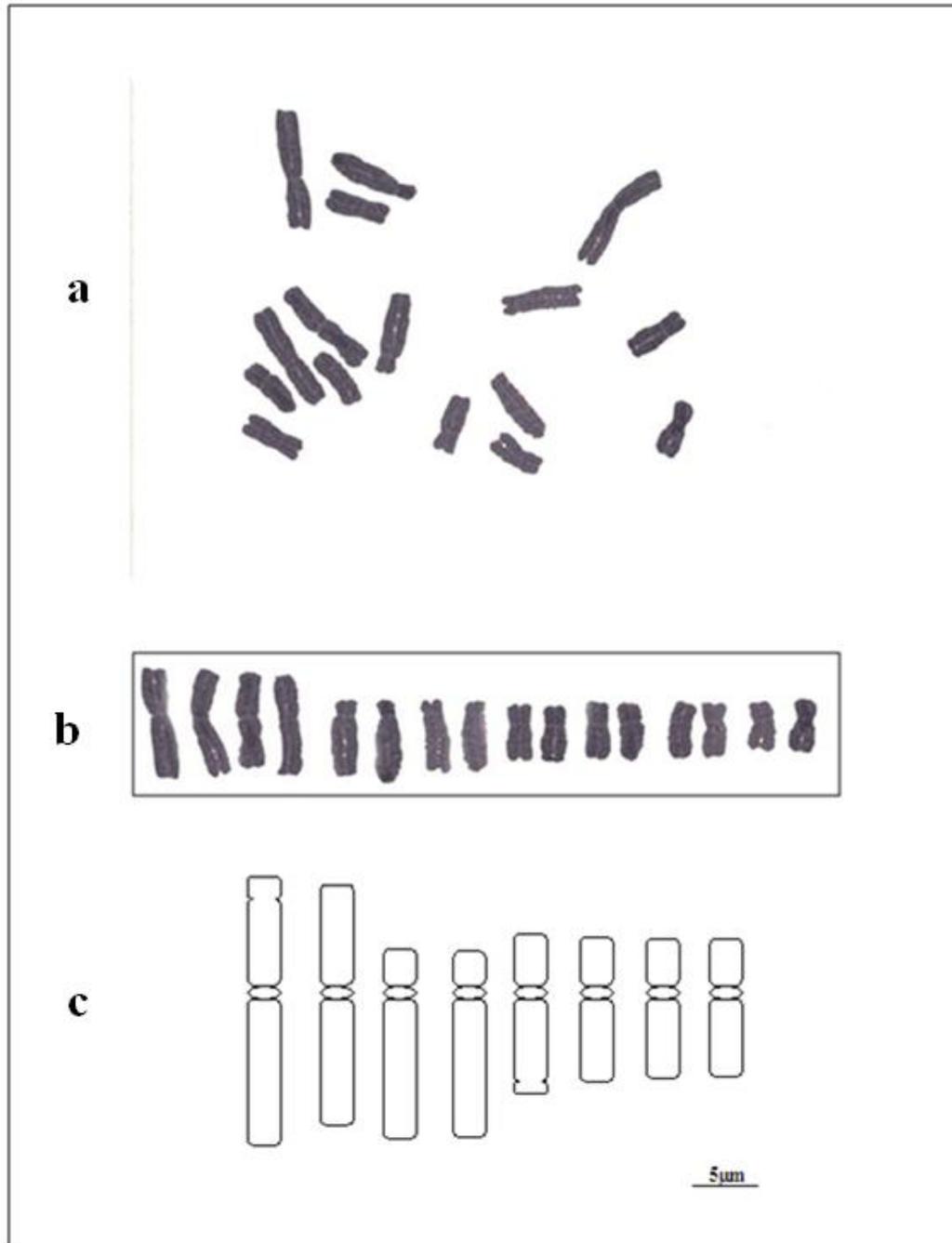


Figure 06 : Caryotype de l'espèce *Bellevalia mauritanica*

a) Plaque métaphasique

b) Caryogramme

c) Idiogramme

Selon Stebbins (1971) la polypléidie ainsi que l'asymétrie du caryotype, sont les principales sources d'adaptation, d'évolution et de spéciation chez les végétaux. Ce sont des critères que nous retrouvons chez *Bellevalia mauritanica*. Cette espèce a évolué comme les autres espèces de son genre (Bareka et al. 2009)

À ce stade l'étude du caryotype est insuffisante et doit être complétée par une étude cytogénétique moléculaire, permettant ainsi une approche plus profonde.

II- Etude de l'hétérochromatine

- **La coloration à la chromomycine A₃**

Le marquage à la chromomycine A₃ (CMA₃) a révélé que les chromosomes de *Bellevalia mauritanica* portent 26 bandes riches en séquences GC, distribuées comme suit :

14 bandes centromériques portées sur les bras longs des chromosomes des paires de I à IIV, et 4 autres sur les bras courts des paires I et II (ce qui fait un total de 16 bandes centromériques), 2 bandes intercalaires sur les bras longs de la paire VIII, et 6 bandes télomériques portées sur les bras courts de la paire I, et sur les bras longs des paires III, et V.

Les bandes télomériques des paires I et V sont associées aux constriction secondaires des chromosomes.

- **La coloration au DAPI**

Les bandes mises en évidence par la coloration au DAPI sont au nombre de 12, dont 10 centromériques, portées sur les bras longs des paires chromosomiques II, III, IV, V, et VI,

et 2 bandes intercalaires situées vers l'extrémité des bras longs près de la région télomérique de la paire III, ce qui fait que cette dernière porte deux bandes DAPI.

La technique du DAPI a révélé que le nombre de ces bandes est inférieur à celui des bandes CMA+, et sont en majorité en co-localisation avec eux, sauf pour la paire VI où les bandes sont situées côte à côte sur le même bras ; la bande intercalaire de la paire III est loin de toutes les autres bandes.

III-Organisation des ADNr

L'utilisation de l'hybridation *in situ* pour localiser les gènes ribosomiques (18S-5,8S-26S) et 5S a révélé un nombre élevé de signaux fluorescents, portés sur les chromosomes de manière différente des bandes du fluorochrome banding (CMA et DAPI).

Les sites ARNr sont disposés comme suit :

-les locis 18S sont au nombre de 10, tous télomériques, portés sur les bras courts des paires I et II, et sur les bras longs des paires III, IV et V.

-Les locis 5S sont au nombre de 10 portés sur les paires II, III, VII et VIII distribués de la manière suivante :

Les chromosomes de la paire II portent 4 signaux intercalaires, 4 signaux centromériques sont portés par les paires III et VIII, sur les bras courts des chromosomes. Dans la paire III le signal 5S est colocalisé avec la bande CMA₃. Enfin deux signaux télomériques sont mis en évidence sur la paire VII. (Figure 06)

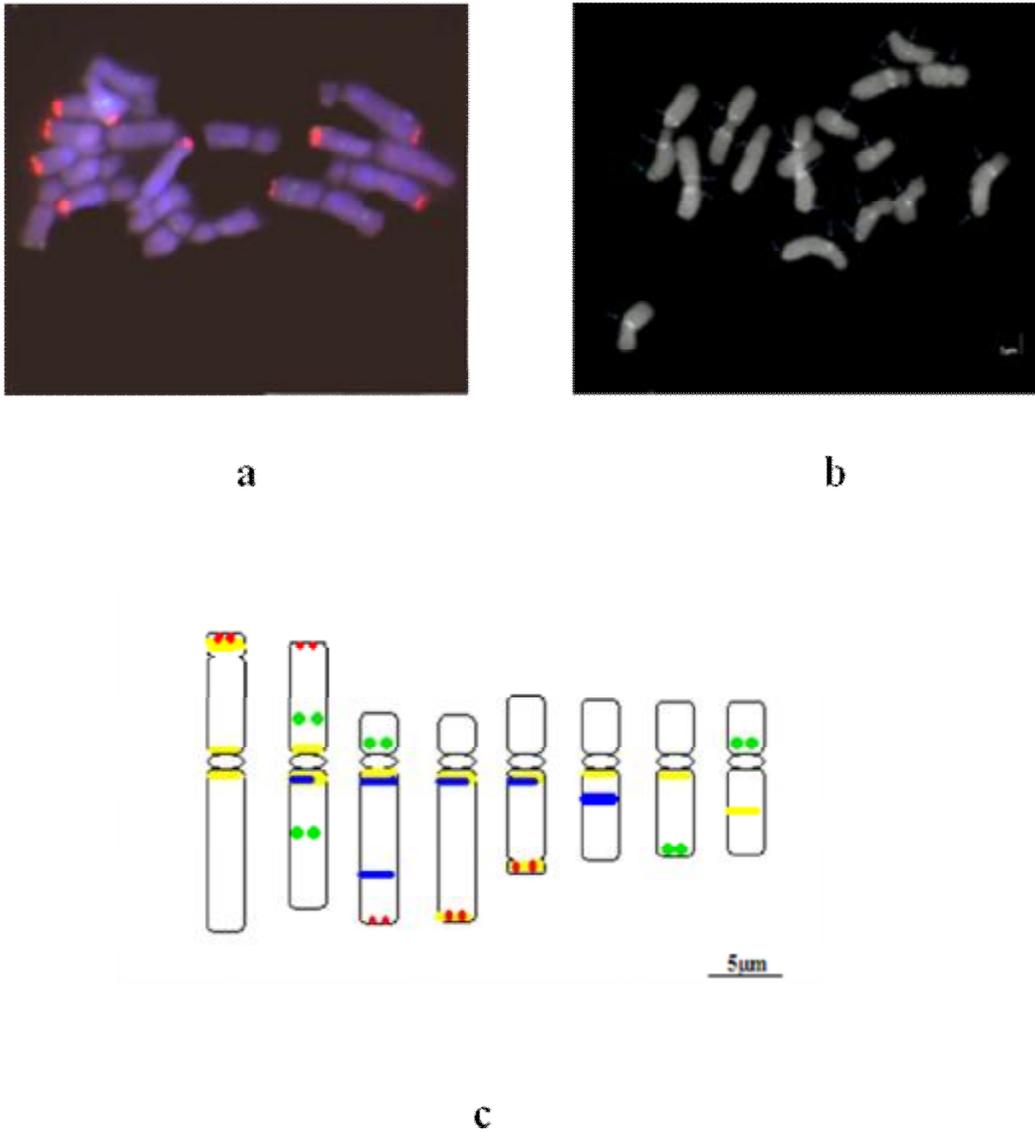


Figure 07: Photographies des chromosomes de *Bellevalia mauritanica* indiquant les différents marquages sur les chromosomes

a) plaque métaphasique marquée par la FISH et le DAPI

b) coloration à la chromomycine A₃ (flèches)

c) idiogramme avec les différents marquages sur les chromosomes.

- Bande CMA
- Bande DAPI
- Signal FISH (5S)
- Signal FISH (18S)

IV-Activité des NORs :

Le marquage des noyaux aux nitrates d'argents a révélé l'existence de nombre variant de nucléoles actifs. Sur 126 différentes cellules observées on a obtenu les résultats résumés dans le tableau et l'histogramme suivant :

Tableau 05 : nombre de nucléoles observés dans les cellules de *Bellevalia mauritanica* après coloration aux nitrates d'argents AgNO_3 .

Nombre de nucléoles	1	2	3	4	5	6	7
Nombre de noyaux	3	8	21	34	38	16	6

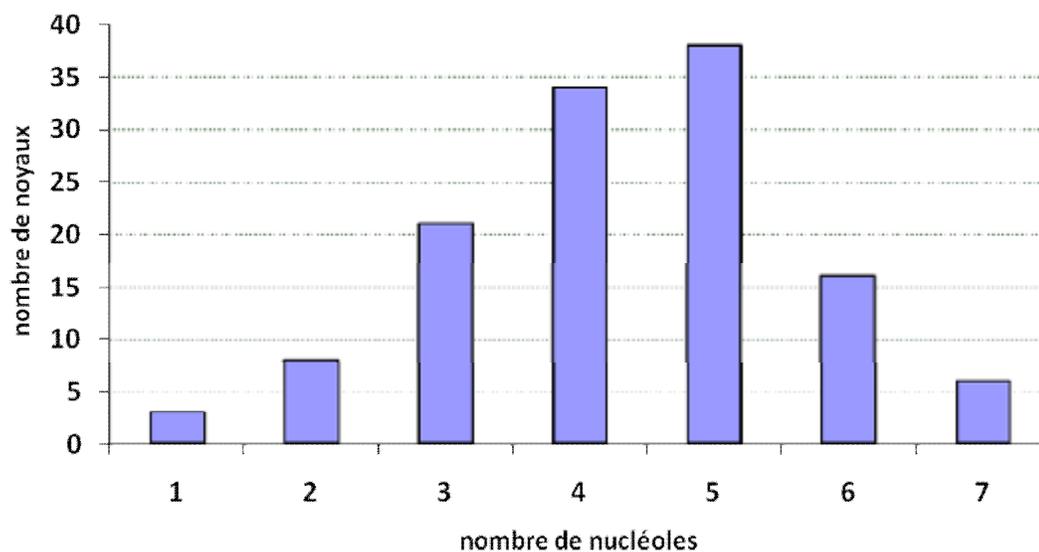


Figure 08 : histogramme représentant le nombre de nucléoles obtenus par noyau

Le tableau récapitulatif et l'histogramme, indiquent que le nombre de nucléoles varie de 1 à 7 pour toutes les cellules observées ; le nombre le plus observé est entre 4 et 5 nucléoles, avec une légère supériorité pour 5 nucléoles, avec des tailles et formes variables certains sont petits et d'autres sont assez grands.

Discussion

De manière générale l'application des techniques de fluorochrome banding et de l'hybridation *in situ* a révélé une richesse particulière de l'espèce *Bellevalia mauritanica* en hétérochromatine et en gènes ribosomiques.

Le marquage à la CMA a révélé un nombre de bandes particulièrement élevé pour cette espèce, l'emplacement des séquences riches en GC se trouvent en majorité dans les régions centromériques des chromosomes, ce sont des emplacements usuels de l'hétérochromatine (Hayes. 2000), mais différents par rapport aux autres espèces du genre (étude anonyme non publiée). Selon cette étude le nombre de bandes CMA+ de *Bellevalia mauritanica* est supérieur à celui des autres espèces (tableau n°06), et les emplacements de ces bandes pour les autres espèces sont télomériques ou intercalaires, ce qui révèle une différence dans leur localisation.

Les bandes CMA télomériques sur les constriction secondaires des chromosomes sont des séquences répétées riches en bases GC dérivées de l'ADN ribosomal d'origine hétérochromatinienne. C'est de l'hétérochromatine de nature associée aux NOR (NORs HC) (Guerra. 2000, Siljak-Yakovlev. 2002) qui est confirmé par les résultats de la FISH.

Résultats et Discussion

Tableau 06 : Résumé des résultats obtenus par chromomycine CMA, DAPI, FISH, chez différentes espèces du genre *Bellevalia* (étude anonyme non publiée) et de *Bellevalia mauritanica* :

(c= bandes centromeriques, i= bandes intercalaires, t= bandes télomériques
Bel=*Bellevalia*, Bel mau=*Bellevalia mauritanica*)

taxon	2n	nb bandes CMA	bandes DAPI	18S-5.8S-26S	5S
Bel 7	8 (2x)	4t	0	4t	2t
Bel 27	8	6t	8c	4t	2t
Bel 42	8	6t	8c	4t	2t
Bel 18	8	8 (6t, 2i)	8c	6t	2i
Bel 32	8	8 (6t, 2i)	0	6t	2i
Bel 39	8	8 (6t, 2i fort)			
Bel 41	8	8 (6t, 2i faible)	14	4t	2i
Bel 73 (=18)	8	8			
Bel 3	12 (3x)	5t			
Bel 58	16 (4x)	12 (8t, 4i)	16c, i	8t	4i
Bel 76	16		16c, i	8t (sur les petits chromosomes)	4i
K 407	16	10 (6t, 4i)	16c, i	8t	2-4i
Bel mau	16	26(18c, 6t, 2i)	12(10c,2 i)	10 t	10(4i, 4c, 2t)

Les chromosomes de *Bellevalia mauritanica* montrent une richesse particulière en hétérochromatine, dont la majorité occupe des régions centromériques, selon Siljak-Yakovlev (1986) cet emplacement joue un rôle dans l'adaptation et la protection des zones vitales du génome ; la distribution de l'hétérochromatine chez cette espèce est différente des autres espèces étudiées, ce qui pourrait être un indicateur du niveau d'évolution chez cette espèce par rapport aux autres de son genre.

Selon Guerra et al (2000) il existe une corrélation entre le caryotype relativement riche en hétérochromatine et le développement du genre, soit une corrélation entre caryotype primitif /pauvreté en hétérochromatine et caryotype évolué /richesse en hétérochromatine.

Ce phénomène existerait chez les végétaux à des niveaux infra et supra génériques. Il est interprété comme étant l'accumulation d'hétérochromatine durant l'évolution de l'espèce ou du genre. Cette évolution peut prendre des voix parallèles comme elle peut être différenciée comme c'est le cas de *Bellevalia mauritanica* où la quantité d'hétérochromatine a évolué différemment des autres espèces du genre étudié.

Bellevalia mauritanica espèce endémique nord africaine évolue dans un milieu différent des espèces européennes. Les conditions environnementales doivent certainement jouer un rôle sur l'évolution, se traduisant par une augmentation de la quantité d'hétérochromatine. (Siljak-yakovlev.1986, Guerra. 2000)

Le nombre de bandes DAPI chez *Bellevalia mauritanica* est moins important que les autres espèces du genre (anonyme non publiée), mais avec les mêmes emplacements c'est-à-dire la plupart sont dans les régions centromériques des chromosomes et une seule bande intercalaire.

Le nombre de locis 18S et 5S obtenu chez *Bellevalia mauritanica* est important comparé aux autres espèces du genre (étude anonyme non publiée), leurs emplacements sont

les mêmes pour les 18S par rapport à cette étude, et varient pour les 5S d'une paire à une autre. Ils sont situés dans les régions intercalaires, centromériques et télomériques. Habituellement les locis (18S-5,8S-26S) et 5S sont portés soit par des paires chromosomiques différentes soit sur le même chromosome (Castilho et Heslop-Harrison. 1996). Dans notre cas, nous constatons que ces locis sont portés en même temps par les paires II et III.

-Quatre locis 5S sont situés sur la paire II, c'est une observation assez rare chez les végétaux. Signalons que les paires II et III portent tous les marquages (CMA, DAPI, locis 18S-5,6S-26S et 5S) ce qui est déjà observé chez les végétaux (Hamon et al. 2009).

Le nombre de locis révélé par la FISH et les autres marqueurs est important ce qui révèle une grande variabilité dans la constitution génomique de *Bellevalia mauritanica*.

Le nombre élevé de nucléoles (de 1 à 7) traduit une importante activité des gènes ribosomiques. Le nombre moyen de nucléoles correspond au nombre de sites NORs révélés par la FISH, ce qui indique que ces sites pourraient être actifs.

L'instabilité dans le nombre et la forme des nucléoles pourrait être due à la fusion de certains d'entre eux (Silyak-Yakovlev. 2002). Selon Sumner (1994) lorsqu'un site NORs est actif au maximum deux nucléoles sont présents dans un noyau. Derenzini (2000) affirme qu'il n'y a pas de relation numérique entre les NOR observés à la métaphase et ceux du noyau interphasique.

Selon Guerra (2000) et Siljak-Yakovlev (2002) les régions télomériques des chromosomes marqués positivement par la CMA et l'hybridation *in situ*, sont de l'hétérochromatine associée au NOR, même si ces régions ne portent pas de constriction secondaires. Dans notre cas nous avons trois paires chromosomiques porteuses de NORs actifs (I, IV et V)

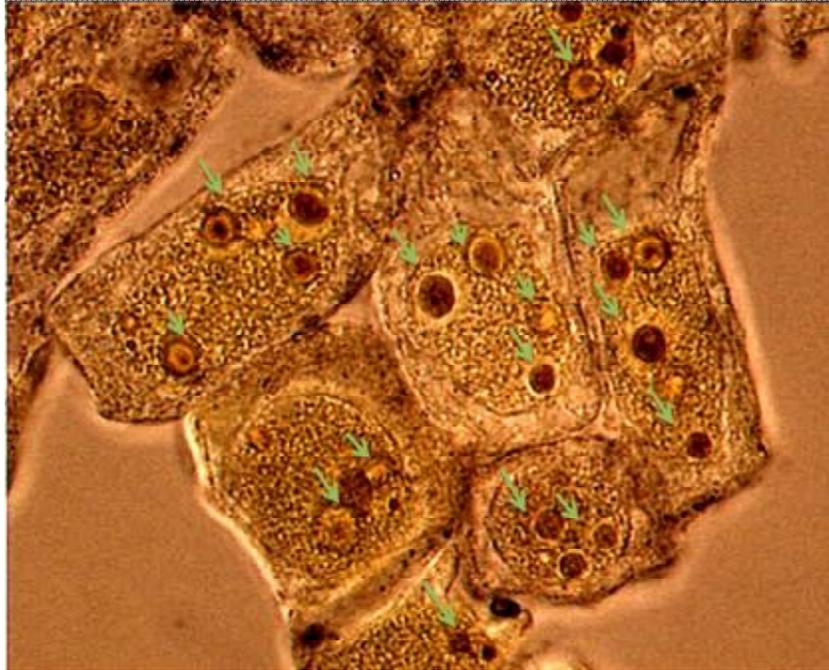


Figure 09 : Les nucléoles après coloration aux nitrates d'argent

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion

Dans ce travail nous avons tenté une approche cytogénétique pour définir l'organisation du génome de l'espèce *Bellevalia mauritanica* ($2n=4x=16$), ainsi que l'implication des régions de l'hétérochromatine riche en séquences répétées GC et AT, des gènes ribosomiques 18S-5.8S-26S et 5S, et des organisateurs nucléolaires (NORs) dans la caractérisation du caryotype de l'espèce.

Nous confirmons que *Bellevalia mauritanica* est tétraploïde, son caryotype est formé de 2 grandes paires métacentriques, 2 longues paires subtélocentriques et 4 petites paires submétacentriques très proches et similaires entre elles, qui se résume dans la formule: $2n = 4x = 16 = 4M + 8sm + 4st$, avec des constriction secondaires sur les paires I et V, c'est donc un caryotype asymétrique et évolué.

La localisation de séquences répétées en tandem composant l'hétérochromatine constitutive par l'emploi des techniques de fluorochrome banding, chromomycine $A_3(CMA_3)$ pour les séquences GC et le DAPI pour l'hétérochromatine constitutive totale, a révélé l'existence de bandes hétérochromatiniennes sur tous les chromosomes dans différentes régions, ce qui indique clairement que le génome de l'espèce en est très riche.

L'hybridation *in situ* pour la localisation des gènes ribosomiques 18S-5.8S-26S et 5S a mis en évidence:

Cinq locis 18S tous situés dans les régions télomériques des chromosomes porteurs et dont trois sont en juxtaposition avec les séquences GC, ce sont des sites NORs actifs.

Cinq locis 5S localisés en co-localisation avec les 18S ou sur des chromosomes différents, et nous avons observé deux locis 5S portés sur le même chromosome qui est un phénomène inhabituel.

Conclusion et Perspectives

La coloration aux nitrates d'argent, a indiqué que les sites NORs sont actifs avec un nombre de nucléoles allant de 1 à 7 et une grande fréquence pour 4 et 5 nucléoles, ce qui révèle une grande activité nucléolaires.

Les résultats de ce travail montrent clairement que *Bellevalia mauritanica* est différente des espèces de son genre, par sa richesse en hétérochromatine et la distribution des bandes hétérochromatiniennes, et par le nombre et localisation des gènes ribosomiques. Cette différenciation pourrait être due au milieu où évolue *Bellevalia mauritanica* qui est une espèce endémique de l'Afrique du Nord et son environnement est différent des espèces européennes. Les conditions environnementales jouent certainement un rôle sur l'évolution, se traduisant par une augmentation de la quantité d'hétérochromatine, ainsi que l'activité des gènes ribosomiques et en l'occurrence les sites NORs.

La caractérisation du génome de cette espèce à travers l'établissement de son caryotype, l'étude de l'hétérochromatine et des régions des organisateurs nucléolaires NORs et la détermination des gènes ribosomiques incite à élargir cette étude :

-à d'autres populations et d'autres espèces du genre comme *Bellevalia ciliata*, *Bellevalia Pomelii*, et *Bellevalia dubia*, qui sont natives de l'Algérie afin de déceler les remaniements chromosomiques et les relations phylogéniques au sein de ce complexe d'espèces.

-à d'autres marqueurs moléculaires tels la cytométrie en flux et la GISH.

- à d'autres domaines tels la phytochimie.

Références Bibliographiques

Références Bibliographiques

Adinolfi M., Aquilla T., Barone G., Lanzetta R et Prilli M.A., 1989:

Homoisoflavanones from *Bellevalia romoana*. *Phytochemistry*, vol 28 N°11 :3244-3246

Amirouche R et Misset M.T., 2009 : Flore spontanée d'Algérie : différenciation écogéographique des espèces et polyploïdie Flore spontanée d'Algérie : Cahier Agriculture, vol. 18 • N° 6 • novembre-décembre 2009.

Bareka A., Phitos D., Kamari G., 2008: A karyosystematic study of the genus *Bellevalia* Lapeyr (Hyacinthaceae) in Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2008, Vol 157: 723-739.

Benamara M., 2004 : Etude de l'organisation du génome de l'espèce *Aegilops teregrina* (Hackel) Maire et Weiller. Mémoire de magistère. Université Mentouri Constantine.

Blakey D.H., Filion W.G., Horgen P.A., 1976: Differential Giemsa staining in plants III DNA base composition. *Experimental Cell Research* Vol 101:278-282

Bogunic F., Muratovic E., Siljack-Yakovlev S., 2005: Chromosomal differentiation between *Pinus heldreichii* and *Pinus nigra*. *Annals For Science*. 63:267– 274. INRA, EDP Sciences.

Bouziane Z., 2003: Identification chromosomique et génomique de deux espèces *Aegilops tauschii* *coss* et *Aegilops uniaristata* vis. Mémoire de magistère. Université Mentouri Constantine.

Références Bibliographiques

Brullo C., Brullo S., Pasta S., 2009: *Bellvalia pelagiaca* (Hyacinthaceae), a new species from the islet of lampione (Pelagian Archipelago, Sicily). *Edinburgh Journal of Botany* 66, vol 1 :65-75

Castilho A., Miller T.E., Heslop-Harrison J.S., 1996: Physical mapping of translocation breakpoints in a set of wheat-*Aegilops umbellulata* recombinant lines using in situ hybridization. *Theories Application Genetics* , 93:816-82.

Derenzini M., 2000: The AgNORs .*Micron*, 31: 117-120.

Douce R., 2000 : Le monde Végétal : Du génome à la plante entière. Rapport sur la science et la technologie N°10. Académie des sciences. «TEC ET DOC » édition Lavoisier, Paris.

Feinbrun N., 1938: A monographic study on the genus *Bellevalia* Lapeyr .*Palestine Journal of Botany*, Jerusalem. In **Bareka P., 2008:** A karyosystematic study of the genus *Bellvalia* Lapeyr. (Hyacinthaceae) in Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society*. vol 157:723-739.

Fuchs J., Strehl S., Brandes A., Schweizer D., Shubert I., 1998: Molecular cytogenetic characterization patterns of the *Vicia faba* genome heterochromatin differentiation, replication patterns and sequence localization. *Chromosoma Research*. 6: 219-230.

Garcia S., Garnatje T., Hidalgo O., McArthur E.D., Siljak-Yakovlev S., Valles J., 2007: Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant Systematics and Evolution* .267: 79–92

Gettner M.E., 2005: Variable karyotype with B-chromosomes in *Bellevalia saviczii* (Liliaceae), *Genetica*.124: 223-234.

Références Bibliographiques

Glässe E., 1962: Die Genomsonderung in den Mitosen der Rattenleber. Kurze Mitteilungen. EXPERIENTIA XVIII/4:192-196.

Glässe E., Marquardt H., 1968: Distribution and Localisation of Induced Breaks on the Chromosomes of *Bellevalia romana*. Molec. Gen. Genetics. 101 : 307-316.

Gorenfolt R., Raicu P., 1980 : Cytogénétique et évolution: 53, 73, 75. Masson Editions 1980

Guerra M., 2000 a: Patterns of heterochromatin distribution in plant chromosomes. Genetics and Molecular Biology.23 vol 4:1029-1041

Guerra M., Galvão Bezerra Dos Santos K., Barros E., Silva A.E., Ehrendorfer F., 2000 b: Heterochromatin banding patterns in Rutaceae-Aurantoideae-a case of parallel chromosomal evolution. American Journal of Botany. 87 vol 5:735-747.

Hamon P., Siljak-Yakovlev S., Srisuwan S., Robin O., Poncet V., Hamon S., de Kochko A., 2009: Physical mapping of rDNA and heterochromatin in chromosomes of 16 *Coffea* species: A revised view of species differentiation. Chromosome Research. 17:291–304

Hamouche Y., Amirouche N., Misset M-T., Amirouch R., 2010: Cytotaxonomy of autumnal flowering species of Hyacinthaceae from Algeria, Plant Syst Evol .Springer-Verlag

Hart D.L., Jones E.W., 2003: Génétique des grands principes : 94, 96, et 98. .3^e édition. Dunod, Paris

Hayes H., 2000:Notions de base de génétique ADN et chromosomes. INRA Production. Animal, numéro hors série « Génétique moléculaire : principes et applications aux populations animales » : 13-20.

Références Bibliographiques

Hernandez-Verdun D., Louvet E ., 2004 : Le nucléole :structure ,fonctions et maladies associés. M/S: médecine et sciences. 20:37-44.

Heslop-Harrison J.S., 1991: The molecular cytogenetics of plants. Commentary. Journal of Cell Sciences 100: 15-21.

Jafary A., Maassoumi A.A., Farsi M., 2008: Karyological study on *Bellevalia* and *Muscari* (Liliaceae) species of Iran Asian Journal of Plant Sciences. 7 vol 1: 50-59.

Jahier J., 1992: Techniques de cytogénétiques végétales .Edition INRA

Kato A .,Vega J.M ., Han F ., Lamb J.C et Bricher J.A ., 2005: Advances in plant chromosome identification and cytogenetic techniques. Current Opinion in Plant Biology. 8:148-154.

Lance., Chilton L., Marengo., 2008: Transfers of genera to other families .Marengo Publications 17 Bernard Crescent Hunstanton .PE366ER England.

Levin D.A., 2002: The role of chromosomal change in plant evolution. Oxford Series in Ecology and Evolution, Oxford University press, New York, New York, USA.ISBNO-19-513860-0

Lindemann R ., 1956 : Vergleichende Cytologisci-Ie Untersuchungen An Den Liliaceen *Bellevalia Romana*, *Agapanthus Umbellatus* Iind *Lilium regal* . Planta, Bd. 48: 2-23

Lupi C., Bennici A., Gennai D., 1985: *In vitro* Culture of *BellevMia romana* (L.) Rchb. I. Plant Regeneration Through Adventitious Shoots and Somatic Embryos. Protoplasma.125: 185-189.

Maggini F., Garbari F., 1977: Amont of Ribosomal DNA in *Allium*(Liliaceae).Plant systematic and evolution 128:201-208.

Références Bibliographiques

- Maire R .,1958:** Flore de l'Afrique du Nord 5. Paris: Paul Lechevalier. In **Brullo C., et al 2009:** *Bellvalia pelagiaca* (Hyacinthaceae), A New Species From The Islet Of Lampione (Pelagian Archipelago,Sicily).Edinburgh Journal of Botany 66(1):65-75
- Marks G.E., 1983:** Feulgen Banding of heterochromatin in plant chromosomes. Journal of Cell Science.62: 171-176.
- Mathez J., 2008 :** Un point de vue sur l'irruption du moléculaire en systématique. Journal de Botanique, 41:13-16.
- Mattei M G ., Luciani J., 2000:** L'HETEROCHROMATINE, du chromosome à la protéine. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.
- Médail F ., Diadema K ., 2006:** Biodiversité végétale méditerranéenne et anthropisation : approches macro et micro-régionales. Annales de Géographie. 651: 618-640.
- Memtsas D., Dimitrakopoulos PG ., Siamantziouras AD., Troumbis AD., 2002 :** Changes in structure and function in response to changing diversity within Mediterranean grassland communities. Ecologia mediterranea International Journal of Mediterranean Ecology Tome 28 • Fascicule 1
- Miadokova E., Masierova I., Vlekova V., Duhova V et Toth J., 2002:** Antimutagenic potential of homoisoflavonoids from *Muscari racemosum* . Journal of Ethnopharmacology .81: 381- 386
- Morot-Gaudry J.F., Briat J.F., 2004:** La génomique en biologie végétale .Science update.INRA. INRA Edition. Paris
- Ohzatay N., 2002:** Diversity of bulbous monocots in Turkey with special reference. Chromosome numbers. Pure Appl. Chem., Vol 74. N°4:547-555.

Références Bibliographiques

Ohzatay N., Johnson M ., 1996 : Some Karyological remarks on Turkish *Allium* sect-
Allium, Bellevalia and *Ornithogalum*. *Bocconea* .5:239-249

Oliveira C., Wright J.M., 1998: Molecular cytogenetic Analysis of heterochromatin in
the chromosomes of Tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei: Cichlidae) *Chromosome*
research 6: 205-211.

Özcan S., Parmaksiz I., Mirici S., Çöçü S., Sancak C., Uranbey S., 2007: Application
of In Vitro Techniques for Micropropagation and Protection of Endemic and Endangered
Flowerbulbs of Turkey. *Plant contributed Papers. InvitroCell. Dev.Biol.Animal* 43:24-32.

Persson K., 2005: One new and one emended species of *Bellevalia* (Hyacinthaceae)
from Turkey., *Botanical Journal of the Linnean Society*,2006,150: 253-260

Persson K., Wendelbo P., 1979 a: The taxonomic position of *Bellevalia tabariziana*
(Liliaceae), *Alrawaia*, a new genus of Liliaceae–Scilloideae. The artificial hybrid
Hyacinthus orientalis × *transcapiseus* (Liliaceae) .*Botaniska Notiser an International*
Journal of Plant taxonomy.Vol 132:179-209.

Persson K., Wendelbo P., 1979 b: *Bellevalia hyacinthoides*, a new name for
Strangweija spicata (Liliaceae) .*Botaniska Notiser an International Journal of Plant*
taxonomy .Vol 132:65-70.

Pfossen M., Speta F., 1999 a: Hyacinthaceae, *Hyacinthus*, *Ornithogalum*, *Scilla* and their
relatives.

Pfossen M., Speta F., 1999 b: Phylogenetics of Hyacinthaceae based on plastid DNA
sequences. *Annals of Missouri Botanical Garden* .Vol86: 852-875.

Pomel A.N., 1860: Type of *Bellevalia mauritanica* Pomel. *Herbier de L’Institut de*
Botanique de L’Université Montpellier II (MPU).Aluka .

Références Bibliographiques

Quezel P., Santa S., 1962 : Nouvelle Flore De L'Algérie et Des Régions Désertiques Méridionales. Edition du Centre nationale de La recherche Scientifique, 15, Quai Anatole-France –Paris 7^e .1962.

Rosselló J.A., Castro M., 2008: Karyological evolution of the angiosperm endemic flora of the Balearic Islands. TAXON 57 (1).p:257-273.

Siljak-Yakovlev S., Cartier D. 1986: Heterochromatin patterns in some taxa of *Crepis praemorsa* complex. Caryologia 39.p: 27–32.

Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Coulaud V., Stoian J., Brown SC., Zoldos V., Jelenic S., Papes D., 2002 a: Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. Theor Appl Genet 104:505–512

Siljak-Yakovlev S., Peceenini S., Muratovic E., Zoldos V., Robin O., Valles J., 2003 b: Chromosomal differentiation and genome size in three European mountain *Lilium* species. Plant Systematic and Evolution, vol 236, p: 165-173.

Spies P., 2004: Phylogenetic relationships of the genus *Lachenalia* with other related liliaceous taxa. Memoire de magistère. University of the Free State, 263p.

Stebbins GL., 1971: Chromosomal Evolution in Higher Plants .Edward Arnold Publisher.

Strachan T., Read AP., 1998 : Génétique Moléculaire Humaine. Médecines-Sciences, Flammarion 1998.

Sumner A.T., 1994 a: Chromosome Banding and Identification .Methods in Molecular Biology, Vol: 29. Edited by JR Gosden .Humana Press Inc, Totowa, NJ.

Références Bibliographiques

Sumner A.T., de la Torre J., Stuppia L., 1993 b: The distribution of genes on chromosomes: A cytological approach.

Taylor J.H ., 1957: Sister chromatid exchanges in Tritium labeled chromosomes.

Véla E., Benhouhou S., 2007: Évaluation d'un nouveau point chaud de biodiversité végétale dans le Bassin méditerranéen (Afrique du Nord). Comptes Rendus de Biologies 330 :589–605.

Weiss-SchneeWeiss H., SchneeWeiss M.G. 2003: Karyological Investigations of selected Angiosperms from Georgia and Azerbaijan. Acta Biologica Carcoviensia Series Botanica 45(2):49-56.

Wendelbo P., 1980: Notes on *Hyacinthus* and *Bellevalia* (Liliaceae) in Turkey and Iran. Notes R.B.G.edinburgh, 38(3): 423-434

Zelenin AV., Badaeva ED., Muravenko OV., 2001: Introduction into Plant Genomics .Molecular Biology, vol 35,(3): 165-173.

Zurita F., Jiménez R., Burgos M ., Díaz de la Guardia R .,1998 : Sequential silver staining and in situ hybridization reveal a direct association between rDNA levels and the expression of homologous nucleolar organizing regions: a hypothesis for NOR structure and function. Journal of Cell Science 111, 1433-1439

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP (APG),, 2003: An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plant: APG II. Botanical Journal of the Linnean Society. Vol 141: 399-436.

Références Bibliographiques

References électroniques:

www.Googleearth.com

www.http.Documents.settings\probic\mes_documents\hyacinth.htm: consulté le
10/06/2007

www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html consulté le 21/06/2008

www.http.monsu.desiderio.free/jardin/Jacinthe.html : consulté le 10/06/2007

www.tela-botanica.org: consulté le 11/05/2008.

Annexe

Annexe

Les différentes solutions utilisées

1. Préparation de la colchicine à 0.3%

300mg de colchicine en poudre dans 100ml d'eau distillée.

2. Préparation de l'éthanol acétique (Carnoy)

On prend 3 volumes d'éthanol pour un volume d'acide acétique.

Pour préparer 40 ml de solution on met 30 ml d'éthanol et 10 ml d'acide acétique glacial.

NB : cette solution doit être fraîchement préparée avant chaque utilisation.

3. Préparation du tampon citrate

Le tampon citrate est formé du mélange de deux solutions A et B.

A : solution d'acide citrique 0.1M (19.21g dans 1000ml d'eau) poids moléculaire
PM=192.1g

B : solution de citrate de sodium 0.1M (29.41g $C_6H_5O_7Na_3, 2H_2O$ dans 1000 ml).
PM=294.10g/ml.

Pour un ph=4.6 on prend toujours

25.5ml d'acide citrique et 24.5 ml de citrate de sodium, compléter à 100 ml par de l'eau.

4. Acide Acétique 45%

Prendre dans une éprouvette de 10 ml, 4.5ml d'acide acétique et compléter avec de l'eau distillée jusqu'à 10 ml.

5. HCl N :

Prendre l'HCl fumant PM= 36,46 g /l

$P/V = d$ et donc $V = P/d = 36.46/1.18 = 30.63$ ml /l

Soit : $30.63 \times 100/37 = 82.78$ ml /l

6. Tampon Mc Ilvaine = Tampon Citrate –Phosphate

Solution mères de Mc Ilvaine :

Sol A : Acide citrique à 1.01g/50 ml H₂O

Sol B : Na₂HPO₄ +H₂O à 1.068g pour 30 ml d' H₂O distillée.

x ml de sol A + y ml de sol B + H₂O = 100 ml

Selon les valeurs de x et d'y on aura des tampons de Mc Ilvaine de différents ph.

ph =5.5

A : 21.6 ml, B : 28.4 ml, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

A : 6.5 ml, B : 43.6 ml, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

Pour ajuster le ph on ajoute soit de l'acide (sol A) soit de la base (sol B).

Ces solutions à ph précis sont à préparer extemporanément.

7. Solution de Chromomycine

2 mg pour 10 ml de solution (tampon Mc Ilvaine ph= 7 + Mg CL₂)

NB : A préparer un jour à l'avance car peu soluble et conserver à 4°C à l'obscurité.

8. L'enzyme de macération des protoplastes :

Pour 50 ml de tampon citrate à ph 4.6 :

Cellulase : 2gr

Pectolyase : 0.5gr

Hemicellulase : 2gr

Bien agiter, verser dans des tubes Eppendorf.

Garder au congélateur.

8. L'Hybridation *in situ* :

-Rinçage à l'éthanol 95% avant le traitement à l'Rnase (étape facultative mais fortement conseillée).

-Séchage à température ambiante.

-Traitement à l'Rnase à 10mg/ml dilué au 1/100^{ème}

-Prendre 16 µl d'Rnase (10mg/ml) et 1584 µl 2×SSC : vortexer la solution pour macérer les protoplastes.

-Déposer 200µl de la suspension par lame

-Recouvrir d'une lamelle en plastique en évitant les bulles d'air

-Mettre les lames dans une chambre humide à 37°C (boite tapissée de kleenex imbibée de 2×SSC) pendant 1heure (le temps n'est pas vraiment précis et peut aller de 45 minutes jusqu'à 75 minutes)

-Rinçage des lamelles après les avoir enlever, avec le 2×SSC 3 fois successives pendant 5mn à température ambiante, puis dans une solution d'H Cl (0.01N) pendant 2mn tout ça dans un portoir sous agitation lente.

-Traitement à la pepsine

-Déposer 100µl de pepsine par lames.

-Recouvrir d'une lamelle en plastique.

-Mettre les lames dans une chambre humide (boite tapissée de kleenex imbibée de 2×SSC) pendant 10min à 37°C (le temps dépend de la quantité de cytoplasme)

-Rinçage des lames dans un portoir avec du 2×SSC sous agitation lente 2 fois pendant 5min chacune à température ambiante. Pendant le premier lavage de 5 mn, les lamelles sont laissées pour se décoller seules puis sont retirées à l'aide d'une pince. Et sont ensuite incubées dans du formaldéhyde à 4%(ph 8) pendant 10 min sous une hotte.

-Déshydratation des lames dans une série de solutions d'éthanol à différentes concentrations dans un portoir sous agitation lente à température ambiante.

-éthanol 70% pendant 3min

-éthanol 90%pendant 3min.

-éthanol 100% pendant 3min.

Laisser sécher les lames au moins pendant 2 heures.

-Préparation de la mixture de la sonde

La mixture de la sonde est composée de :

- Formamide à 50% : il améliore la dénaturation. Il est utilisé à raison de 25µl par lame

-Dextran sulfate 10% : il forme un réseau autour de la sonde. Il est utilisé à raison de 10µl par lame

-SDS à 0.1% : c'est un détergent. Il est utilisé à raison de 3µl par lame.

-Le sperme de saumon 250µl/mg : il bloque les sites pour éviter les fixations spécifiques. Il est utilisé à raison de 1.5 µl par lame.

-20×SSC : C'est une solution saline nécessaire pour le bien être des chromosomes .Cette solution est utilisée à raison de 5µl par lame.

-ADN18Set ADN5S : les sondes sont préparées par *Nick Translation* .Il faut 20 à 30µg par lame

-H₂O pure : compléter le volume jusqu'à obtention de 50µl de mixture.

- Le tout est vortexer et passer pour quelques tours à la centrifugeuse.

-**Dénaturation de la sonde** pendant 5min à 95°C et mettre immédiatement dans la glace pendant au moins 5 min.

-L'Hybridation

-Déposer 50µl de mixture de sonde (jusqu'à 60µl). Recouvrir d'une lamelle plastique.

-Placer les lames (4 par 4) dans une boîte en plastique dont le fond est lavé à l'alcool à 95%.

Pour éviter l'entrée d'humidité il est possible de scotcher l'ouverture.

-Mettre la boîte dans un bain-marie à 72°C pendant 10 min (pour dénaturer les chromosomes sur les lames)

-Transférer la boîte dans le bain Marie à 55°C pendant 5 min.

-Retirer les lames doucement et les mettre sur un portoir dans la boîte tapissée de Kleenex imbibés de 2×SSC préalablement chauffée à 37°C, température d'hybridation.

-Laisser toute la nuit à 37°C.

-Lavage de stringence avec agitation douce

-Allumer dans le bain-marie les tampons à chauffer :

*600 ml de 2×SSC

*20%formamide

*0.1×SSC

*100 ml ×SSCT

-Mettre les lames dans un portoir

-3min dans 2×SSC à température ambiante sous agitation

-3fois 5min dans 2×SSC à 42°C.

-1 fois 5min dans 20% formamide à 42 °C.

-1 fois 5min dans 0.14×SSC à 42°C.

-3 fois 5min dans 2×SSC à 42°C.

-1 fois 5min dans 4×SSCT à 42°C.

-1 fois 5min dans 4×SSCT à température ambiante sous agitation.

-Laisser sécher les lames à température ambiante.

-Traitement des lames avec un tampon de détection

Le tampon utilisé est préparé extemporanément.

-Déposer 100µl de tampon de détection.

-Recouvrir d'une lamelle en plastique.

-Laisser 5min à température ambiante.

-Eliminer l'excès de BSA sans rincer et enlever la lamelle délicatement.

-Détection avec anti-digoxigénin-fluoresceine

-Préparer la solution d'incubation 6 μ l anti-digoxigénin dans 444 μ l de tampon de détection (Concentration finale : 20 μ l/ ml) et vortexer.

-Déposer 50 μ l par lame.

-Recouvrir d'une lamelle en plastique.

-Incuber à 37°C pendant 1h dans une chambre humide tapissée de kleenex imbibée de 2 \times SSC.

-Lavage 3 fois pendant 5mn dans 4 \times SSCT à température ambiante sous agitation douce, la lamelle en plastique s'élimine d'elle même lors du premier lavage. (La retirer à l'aide d'une pince)

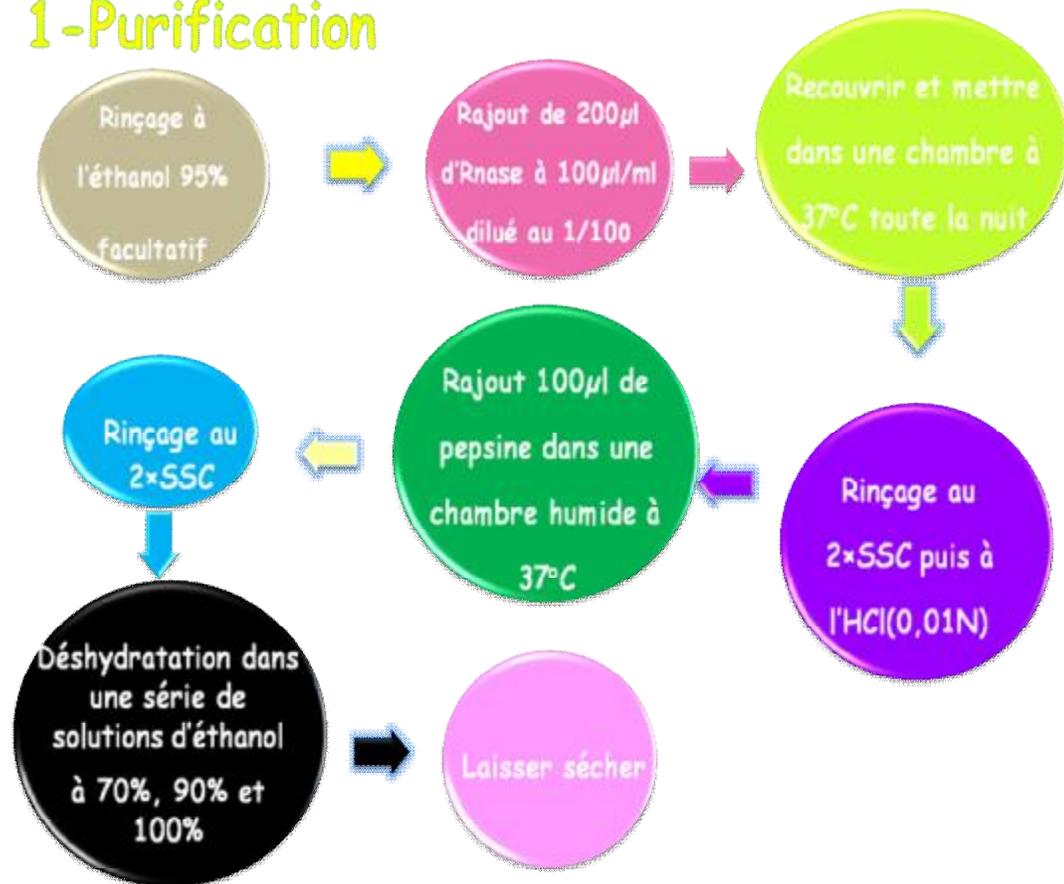
-Séchage partiel des lames sur un portoir en les protégeant de la lumière.

-Montage

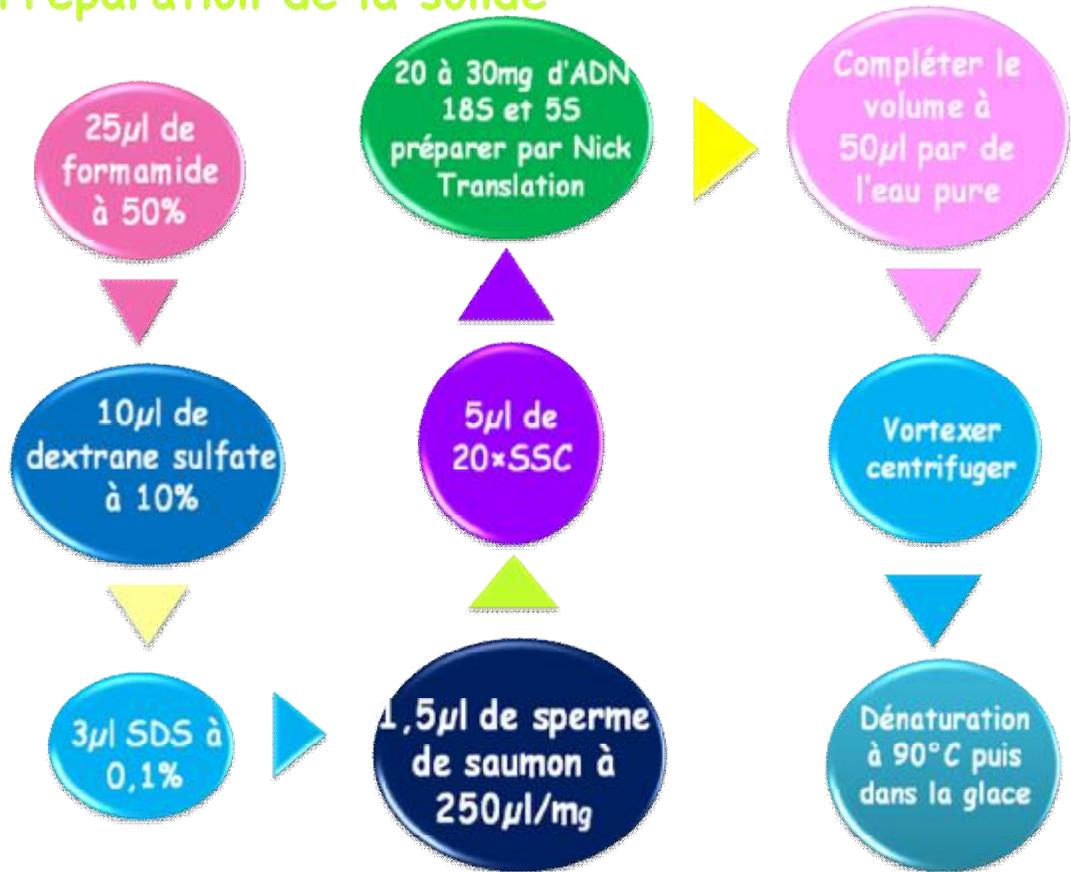
Rajout du citifluor, recouvrement de la lame avec une lamelle en verre de 24 \times 36mm et scotcher à l'aide de colle à rustine.

Observation après 24 heures au microscope à épifluorescence.

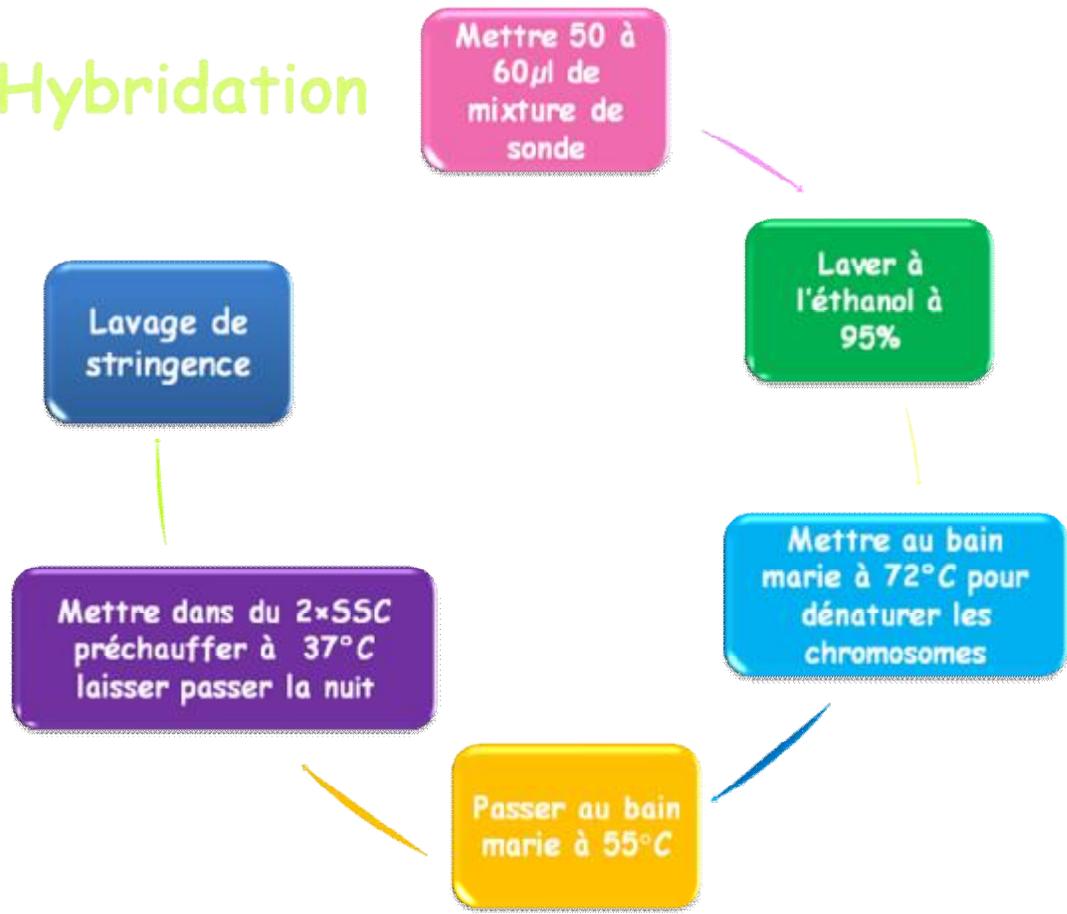
1-Purification



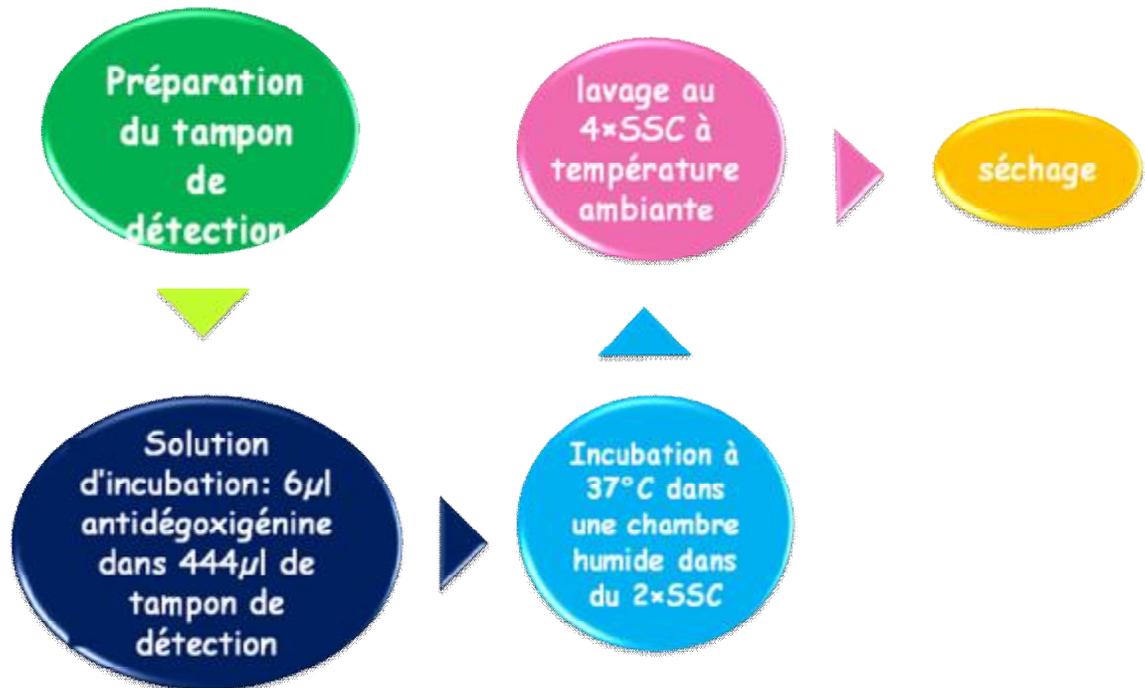
2-Préparation de la sonde

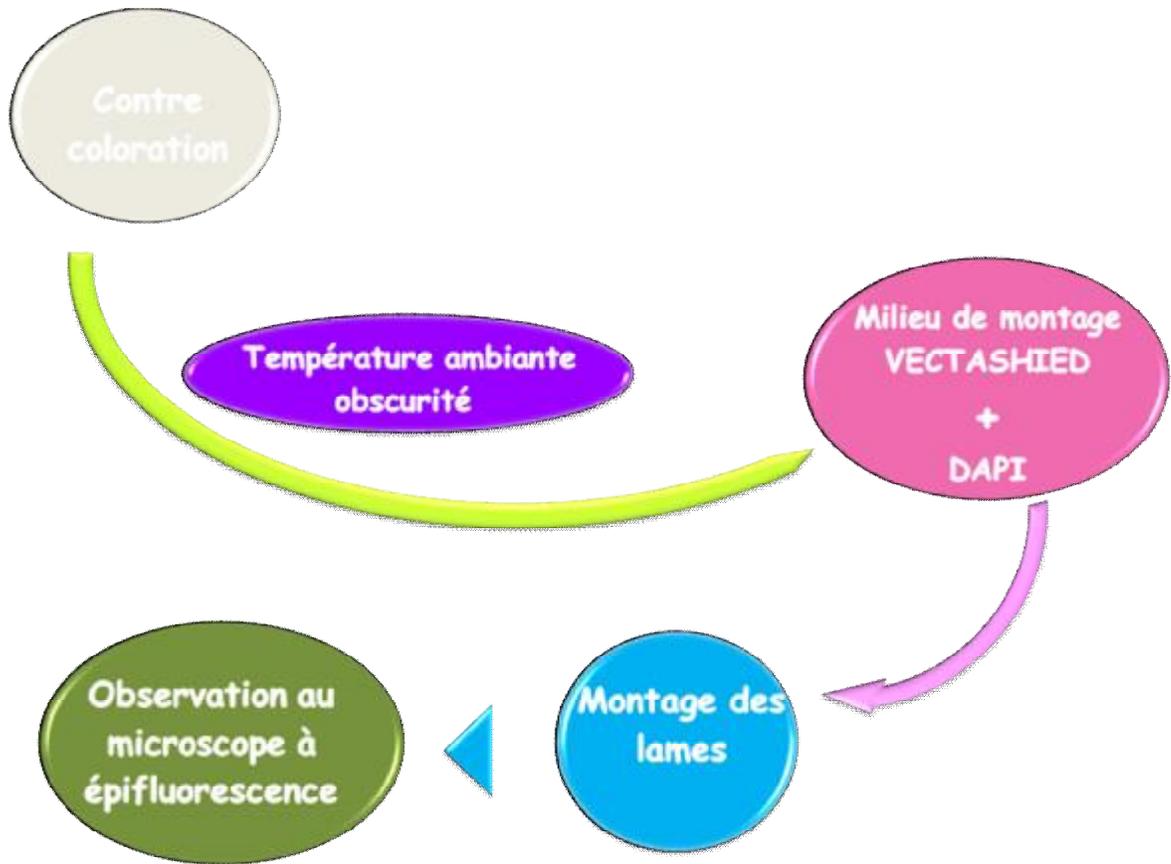


3-Hybridation



4-Détection





9. Coloration au DAPI :

- **Contre coloration :**

La contre coloration (destinée à colorer entièrement les chromosomes) est effectuée à la température ambiante et à l'obscurité, en utilisant le DAPI ou l'IP dans le milieu de montage VECTASHIELD. Une lamelle de verre est délicatement posée dessus en évitant la formation de bulbes. L'excédent de liquide est éliminé en pressant doucement la lame à travers le papier filtre ou le Kleenex 4 ou 5 fois de suite (une couche trop épaisse de milieu de montage rend la mise au point au microscope très difficile, surtout à l'objectif $\times 100$). Les lames sont ensuite scellées avec du Rubber Cement.

- **Observations :**

Elles sont effectuées sur un microscope à épi fluorescence Zeiss Axiophot équipé d'un coulisseau portant les filtres d'excitation adaptés aux fluorochromes utilisés. Les signaux d'hybridation sont analysés en utilisant une caméra CcD de haute sensibilité (Princeton) couplée à un logiciel d'acquisition et de traitement.



Figure 10 : Photographie d'un herbier de l'espèce *Bellevalia mauritanica* Pomel

