

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

**Université Mentouri, Constantine**  
**Faculté de biologie**  
**Département de biologie végétale et écologie**

N° d'ordre : .....

N° de série : .....

## **MEMOIRE**

En vue d'obtention du diplôme de magistère  
( Ecole doctorale en biotechnologies végétales )

Thème

**Contribution à une étude cytogénétique de  
l'espèce *Centaurea nicaeensis* All**

Présenté par: **Nassar Meryem**

Soutenue le :    /    / 2009

### **Devant le jury**

Président: <b>Mr Bensari .</b>	Professeur à l'université Mentouri Constantine
Rapporteur: <b>Mme N. Khalfallah.</b>	Professeur à l'université Mentouri Constantine
Examineur: <b>Mr Khelifi.</b>	Professeur à l'université Mentouri Constantine
Examineur: <b>Mr Mergham</b>	Professeur à l'université Mentouri Constantin

## **Remerciements**

*Au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier vivement tous ceux qui, grâce à leur aide précieuse, ont permis la réalisation de ce travail.*

*Je dois remercier particulièrement:*

*Mme N. **khalfallah** directeur du laboratoire génétique, biochimie et biotechnologie végétale et Professeur à l'Université de Constantine , pour avoir accepté de diriger cette thèse et pour son appui ses conseils et ses orientations tout au long de ce travail. Je lui adresse mes vifs remerciements et ma reconnaissance.*

*Je dois exprimer ma profond gratitude :*

*Au président de jury, **Mr bensari** qui m'a fait l'honneur de présider ce jury. veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.*

*A mon examinateurs, **Mr khelifi** pour l'honneur que vous m'avez fait d'accepter de juger ce travail . veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.*

*A mon deuxième examinateurs, **Mr Mergham** pour l'honneur que vous m'avez fait d'accepter de examiner ce travail . veuillez agréer l'expression de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères.*

*A **M. Benamara**, pour son aide et ses encouragements au long de ce travail, soyez assurée de ma reconnaissance et de mes remerciements les plus sincères .*

*A **K. Baaziz** , pour ses conseils et ses encouragements .*

*Aux ingénieurs du laboratoire, **Mme Tourki** et **Mr Belbakri** pour leurs encouragements et leur aide.*

## Liste des figures

**Fig 1** : Répartition géographique de l'espèce étudiée

**Fig2** : Photo de l'espèce *Centaurea nicaeensis*

**Fig 3** : Caryotype de l'espèce *Centaurea nicaeensis*

**Fig4** : Coloration différentielle par Giemsa de l'espèce *Centaurea nicaeensis*

**Fig5** : Plaque métaphasique colorée par Fluorochrome banding à chromomycine A3.

**Fig 6:** Nucléoles révélés par Coloration au nitrate d'argent.

**Fig 7:** NOR révélé par N- banding

## Liste des tableaux

**Tableau 1:** Les types de pollen qui caractérisent les genres de la Sous tribu *Centaurianae* .

**Tableau 2 :** Caractères morphométriques des chromosomes de l'espèce *Centaurea nicaeensis*.

**Tableau 3:** Nombre de nucléoles détectés dans 50 cellules.

**Tableau 4:** Tableau n°4 : comparaison entre les chromosomes des deux espèces du genre *Centaurea* .

**Tableau 5:** comparaison entre les idiogrammes de deux espèces du genre *Centaurea*.

# SOMMAIRE

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

## Chapitre 1: SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1- Présentation du genre <i>Centaurea</i></b> .....	3
1-1 Classification du genre <i>Centaurea</i> .....	3
A- groupe <i>Acrocentron</i> .....	5
B- groupe <i>Jacea</i> .....	7
C- groupe <i>pesphullus</i> .....	8
D- groupe <i>Cyanus</i> .....	9
E- groupe <i>Centaurea</i> sensu stricto .....	10
1-2- Description générale du genre <i>Centaurea</i> .....	11
1-3- Richesse en métabolites secondaires et usage médicinale du genre <i>Centaurea</i> .....	12
<b>2-Présentation de l'espèce étudiée</b>	
2-1-Description botanique de l'espèce <i>Centaurea nicaeensis</i> SSp <i>nicaeensis</i> .....	14
2-2- Répartition géographique .....	15
2-3- Classification de l'espèce .....	16
<b>3 -Aspect cytogénétique</b> .....	17
3-1 Le nucléole .....	17
3-2 Gènes ribosomiques .....	18
3-3 Les chromosomes B .....	18

3-4 L'hétérochromatine .....	19
3-4-1 L'hétérochromatine constitutive .....	19

## **Chapitre II: MATERIEL ET METHODES**

<b>1- Matériel végétale .....</b>	<b>21</b>
<b>2-Méthodes .....</b>	<b>21</b>
<b>2-1 Méthodes appliquées sur les méristèmes racinaires .....</b>	<b>21</b>
- La coloration a l' Acéto-orceine .....	21
<b>2-2- Méthodes d'analyses de l'hétérochromatine.....</b>	<b>22</b>
<b>A- Le C banding .....</b>	<b>22</b>
<b>B- Le N banding.....</b>	<b>23</b>
<b>B- La coloration au nitrate d'argent .....</b>	<b>24</b>
<b>2-3- Coloration à la chromomycine A<sub>3</sub>.....</b>	<b>25</b>
<b>a- Préparation des protoplastes.....</b>	<b>25</b>
<b>b- Fluorochrome banding .....</b>	<b>25</b>

## **Chapitre III : Résultats et Discussion**

1- Etude caryologique .....	27
2- C banding .....	32
3- Fluorochrome banding .....	37
4- Nitrate d'argent .....	38
5-Le N banding.....	40
<b>Conclusion .....</b>	<b>42</b>
<b>Perspectives .....</b>	<b>44</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>45</b>
<b>Annexe</b>	

# **Introduction**

## Introduction

La dégradation de la diversité biologique, la disparition de certaines variétés cultivées et l'érosion génétique chez beaucoup d'espèces cultivées, ont connu un rythme très accéléré ces dernières décennies. Cela est induite par les changements climatiques, les pressions exercées par le développement des activités humaines et les transformations socio-économiques. Tout cela a amené les biologistes et les généticiens de changer leur centre d'intérêt vers les plantes sauvages qui présentent une grande variabilité génétique, afin de trouver de nouveaux caractères pour l'amélioration des plantes.

*Centaurea* est l'un des genres les plus connus de la famille des Astéracées, sa distribution s'étend de l'Asie jusqu'au bassin méditerranéen, il renferme actuellement des milliers de formes ( espèces ,sous-espèces, variétés) regroupées en 600 espèces, certaines sont très répandues et d'autres sont très localisées (Bremer, 1994).

Cette grande diversité est liée à l'apparition, depuis quelques milliers ou dizaines de milliers d'années, de nombreux vicariants micro-endémiques, c'est-à-dire des taxons morphologiquement bien différenciés bien que pouvant encore s'hybrider.

Ces micro-endémiques forment, avec les espèces répandues dont ils sont issus, des complexes d'espèces très intéressants (Hellwing, 1996).

Grâce à cette diversité morphologique et génétique extensive aussi les espèces du genre *Centaurea* font l'objet de nombreuses études morphologiques, génétiques, taxonomiques, biochimiques et phytochimiques.



Dans le cadre d'un projet de recherche développé au laboratoire de génétique, biochimie et biotechnologies végétales, nous nous sommes intéressés à l'étude cytogénétique de l'espèce *Centaurea nicaeensis* .

Cette étude vise une meilleur connaissance du génome de cette espèce . Ainsi notre contribution porte sur l'établissement du caryotype , nous avons appliqué de nombreuses techniques cytogénétiques (coloration à l'aceto-orceine, coloration différentielle au Giemsa, coloration au nitrate d'argent et fluorochrome banding à la chromomycine A<sub>3</sub> ).

Notre travail est divisé en trois chapitres principaux:

Chapitre 1: Synthèse bibliographique.

Chapitre 2: Matériel et méthodes.

Chapitre 3: Résultats et discussion.

# **Synthèse Bibliographique**

## 1- Présentation du genre *Centaurea*

### 1-1 Classification du genre *Centaurea*

Le genre *Centaurea* comprend entre 400 et 700 espèces ( Dittrich, 1977 ; Bremer, 1994 ; Wagenitz et Hellwig, 1996), la délimitation du genre est parmi les problèmes taxonomiques les plus compliqués de la famille des *Astéracées*. En effet la morphologie des espèces le nombre important et la diversité pollinique et caryologique ( Bremer , 1994; Gabrielyan ,1995 ; Susanna *et al.*, 1995 ; Wagenitz et Hellwig, 1996 ) font que ce genre pose des problèmes de classification.

D'après Wagenitz (1955 ) huit types de pollen ont été trouvés dans les espèces de la sous tribu *Centaurienae* et la sous tribu *Cardinae* ,sept parmi les huit types ont été trouvés dans les espèces du genre *Centaurea*.

- Le type *Serratula* se trouve dans les groupes de base de la sous tribu *Centaureainae* (Dittrich, 1977 ).
- Le type *Centaurea centaurium* se rencontre chez les espèces qui caractérisent le groupe *Centaurea sensu stricto* et le genre *Stizolophus*.
- Le type *Dealbata* fréquent chez les espèces du groupe *Psephullus* et le groupe *Centaurea sensu stricto*.
- Les types *Cyanus* et *Montana* se trouvent dans les espèces du groupe *Cyanus*.
- Le type *Centaurea scabiosa* caractérise les espèces du groupe *Acrocentron*.
- Le type *Jacea* est le plus fréquent chez les espèces du genre *Centaurea* il présente 61% par rapport aux autres types polliniques (Wagenitz et Hellwig, 1996).

**Tableau 1: les types de pollen qui caractérisent les genres de la Sous tribu *Centaurianae* (Garcia-Jacas et al., 2001).**

Type pollinique et nombre de base	Genres
Type <i>Serratula</i> x=13,14,15,16.	<i>Acroptilon</i> , <i>Amberboa</i> , <i>Callicephalus</i> , <i>Centaurea</i> , <i>Plectocephalus</i> , <i>Centaurothammus</i> , <i>Cheirolophus</i> , <i>Leuzea</i> , <i>Maniacal</i> , <i>Serraluta</i> , <i>Volutaria</i> .
Type <i>Centaurea centaurium</i> x=15	groupe <i>Centaurea sensu- stricto</i> , <i>Stizolophus</i> .
Type <i>Cyanus</i> x=12,9,8	<i>Centaurea</i> , groupe <i>Cyanus</i>
Type <i>Centaurea scabiosa</i> x=11,10	<i>Centaurea</i> , groupe <i>Acrocentron</i>
Type <i>Crupina</i> x=14,15	<i>Crupina</i>
Type <i>Dealbata</i> x=15.	<i>Centaurea</i> , groupe <i>Peepholes</i> , <i>Aetheopappus</i>
Type <i>Montana</i> x=10,11	<i>Centaurea</i> , groupe <i>Cyanus</i>
Type <i>Centaurea jacea</i> x=15,14,12,11,10,9,8,7.	<i>Centaurea</i> , groupe <i>Jacea</i> , <i>Cnicus</i> .

En ce qui concerne le problème caryologique, le genre *Centaurea* montre des séries de dysploïdies chromosomiques complexes avec un nombre de base varie de  $x=7$  à  $x=16$  (Susanna et al., 1995 ; Garcia- Jacas et al., 1996).

La corrélation entre les séries de dysploïdie chromosomique et la phylogénie est définie par le type de pollen et les séquences ITS (Garcia-jacas et al., 1996 ).

Les groupes primitifs ont un nombre de base supérieur à  $x=12$  avec les types de pollen suivants: *Dealbata*, *Centaurea centaurium*, par contre les groupes actuels et leurs dérivés ont un nombre de base inférieur ou égale à  $x=12$  avec les types de pollen suivants: *Cyanus*, *Montana*, *Jacea*, *Centaurea scabiosa* (Susanna et al., 1995 ; Wagenitz et Hellwig, 1996 ).

Les études effectuées sur la base du type pollinique (Wagnitz ,1955 ) , les caractères morphologiques (Wagenitz et Hellwig, 1996 ), les analyses de séquences d'ADN ( Susanna et al., 1995 ; Garcia-jacas et al., 2001; Vilatersana et al., 2000 ), la caryologie (Garcia-jacas et al., 1998) ont montré que le genre *Centaurea* est divisé en 5 groupes: le groupe *Acrocentron*, *Centaurea sensu stricto*, *Jacea* , *Cyanus* et *Pesphellus*.

#### **A- Le groupe *Acrocentron***

Est parmi les plus large des groupes du genre *Centaurea* , il renferme environ 100 espèces dont un grand nombre est endémique (Gardou, 1975 ; Waginitez, 1975), son inclusion dans le genre *Centaurea* est basé sur les caractères de l'akène, la morphologie de l'involucre de la bractée ainsi que le type de pollen *Centaurea scabiosa* caractérise le genre (Wagenitz, 1955).

La distribution géographique du groupe *Acrocentron* est très vaste, elle s'étend de l'Euro-Sibérien jusqu' au Nord d'Afrique (Dostal, 1976), ce qui a permis de diviser son centre de diversité en deux parties importantes:

**a- l'Est méditerranéen** qui regroupe l'Anatolie avec l'espèce *C. lydia* , et l'Aegen avec les espèces endémiques (*C. euboica*, *C. ebenoides*, et *C. aetolica*).

**b- l'Ouest méditerranéen** qui regroupe la Sicile avec l'espèce *C. tauromenitana*, et le Nord de l'Afrique avec 24 espèces dont 22 sont endémiques, les plus rencontrées: l'espèce *C. clementi* Boiss et *C. carolipauana* Fern, le Sud de l'Espagne avec *C. clementi*.

D'après Wagenitz et Hellwig (1996) le groupe *Acrocentron* est constitué de 5 sections: la section *Chammaecyanus*, section *Acrocentron*, la section *Stephanochilus*, la section *Aegialophila*, la section *Crocodyluim*.

Récemment, les deux dernières sections citées ont été exclues du groupe par Garcia-jacas et al. (2000), cette exclusion a été confirmée par les travaux de Font et al.( 2002).

La relation entre la section *Chammaecyanus* et *Acrocentron* est très étroite. Des hybrides fertiles peuvent se former entre leurs espèces, et la seule différence qui existe entre les espèces des deux sections est la taille réduite du pappus que représentent les espèces de la section *Chammaecyanus*.

**La section *Stephanochilus*** est une section monophylétique qui caractérise le Nord de l'Afrique, parmi ses espèces *Centaurea omphalodes*, strictement saharienne se rencontre dans le centre de l'Algérie (Jahandiz et Maire, 1934) in Garcia-jacas et al. (2001).

## **B- Le groupe *Jacea***

Toutes les espèces qui appartiennent à ce groupe possèdent le même type de pollen *Jacea* d'où vient son nom. Constituant ainsi, un groupe monophylétique divisé en trois sous groupes majeurs d'après les résultats obtenus par Garcia-jacas et al. (2000):

### **a- Le premier sous groupe**

Il représente les espèces qui ont une large distribution, il est constitué de trois sections importantes, dans chaque section on cite les espèces les plus répandues (Dittrich, 1969 ; Wagenitz et Hellwig, 1996):

- **La section *Jacea*** comporte les espèces *C. linifolia* L, *C. nigra* L *C. trichocephala* s'étendant de l'Iran jusqu' à l'Espagne et le Nord de l'Afrique.

- **La section *Phalopepis*** avec l'espèce *C. alba*, que l'on rencontre dans toute la région méditerranéenne.

- **La section *Ammacyanus*** est représentée par l'espèce *C. patula* qui pousse dans l'Est méditerranéen.

### **b- Le deuxième sous groupe**

Représente les espèces de l'Ouest méditerranéen. La majorité des sections existantes au sein de ce sous groupe présentent des épines (Wagenitz et Hellwig, 1996). Parmi les sections les plus importantes:

- **La section *Hymoncentron*** avec l'espèce *C. diluta*.

- **La section *Seridia*** avec les espèces *C. aspera* et *C. polyacantha*

- **La section *Melonloma*** avec l'espèce *C. involucrata*.

La relation entre les deux dernières sections est très étroite, il peut y avoir des hybrides fertiles.

### **c- Le troisième sous groupe**

Il représente les espèces de l'Est méditerranéen, il regroupe les sections des espèces endémiques avec une prédominance des espèces ayant des fleurs jaunes (Wagenitz et Hellwig, 1996). Parmi les sections les plus importantes:

- **La section *Calcitraba***: avec l'espèce *C. calcitraba*.

- **La section *Tetramorphea***: avec l'espèce *C. bruguierana*.

Les espèces des deux sections sont très reliées, elles présentent le même nombre de base  $x=10$ , ainsi que la présence des chromosomes **B** dans leurs génomes.

### **C- Le groupe *Pesphellus*:**

Il regroupe environ 80 espèces qui se rencontrent dans le centre de l'Anatolie, la Caucasic et le Nord Ouest de l'Iran. Les espèces de ce groupe se caractérisent par des fleurs roses pourpres ou jaunes pâles, des akènes larges et des pappus plus ou moins longs, le type pollinique est *Centaurea dealbata*.

D'après (Wagenitz et Hellwig, 1996 ), le groupe *Pesphellus* est constitué de 11 sections parmi les plus importantes:

- **La section *Psephelloideae*** incluant 16 espèces dont 12 se rencontrent dans le Sud Est de l'Anatolie, 3 en Iran et une en Transcaucasie.

- **La section *Pesphellus*** regroupent 30 espèces décrites dans Flora SSSR area par (Sosnovesky, 1963 ) in Wagenitz et al., 2000 se rencontre



principalement dans le centre du Caucase, l'Est de l'Anatolie et le Nord de l'Iran.

- **La section *Hyalinella*** inclut 7 espèces qui se trouvent dans le Nord Est de l'Anatolie et dans la Transcaucasie, parmi ses espèces *C. bella* , *C. pecho*.

- **La section *Amblyopogon*** inclut 5 espèces présente dans l'Est de l'Anatolie et l'Ouest d'Iran. parmi ses espèces: *C. integrifolia*, *C. meyeranus*, *C. congesta* .

- **La section *Heterolophus*** (d'après Kolokov ( 1963) in Waginitz et al., (2000) ) regroupe 6 espèces qui se rencontrent en Bulgarie, l'Ukraine, et le Sud de la Russie, l' Ouest de la Sibérie et le centre de l'Asie, les plus répandues sont *C. sibirica* et *C. carschalliana*.

#### **D- Le groupe *Cyanus***

Les espèces incluses dans ce groupe se caractérisent par des fleurs bleues ou bleues- pourpres et des bractées épineuses , la majorité des fleurs qui possèdent la forme d'une ventouse sont stériles et sont sans étamines (Garcia-jacas et al., 2001)

Deux sections se trouvent au sein du groupe

-**La section *Cyanus*** renferme toutes les espèces annuelles caractérisées par le type de pollen *Cyanus* et possédant un nombre de base variant de  $x= 8,9,12$ .

-**La section *Pérennes*** renferme toutes les espèces pérennes caractérisées par le type de pollen *Montana*, et qui ont un nombre de base  $x=10$  ou  $x= 11$ .

### **E- Le groupe *Centaurea sensu stricto***

C'est un groupe très isolé avec un nombre d'espèces très réduit, ses espèces présentent une morphologie particulière par rapport aux espèces du genre *Centaurea*, elles se caractérisent par des involucre des bractées primaires, un nombre de base  $x=15$  et *Centaurea centaurium* comme type de pollen (Garcia-Jacas et al., 2001).

## **1-2- Description générale du genre *Centaurea*:**

Les Centaurées sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces, à feuilles alternées. Comme pour toutes les composées, les fleurs, ou fleurons, sont disposées en capitule, entourées d'un involucre de bractées.

Dans le cas des centaurées, les fleurs sont toutes tubulées, celles de la périphérie (souvent stériles) s'ouvrant largement en cinq lobes.

Leur couleur varie le plus souvent entre le rose, le pourpre et le violet, mais il existe aussi quelques espèces à fleurs jaunes.

L'involucre est composé de bractées inégales sur plusieurs rangs, à la manière des artichauts. Ces bractées peuvent être ciliées (cas le plus fréquent) ou épineuses. Leur observation est essentielle pour déterminer les espèces. Les fruits sont des akènes portant une aigrette assez courte, notamment pour les fruits du centre (anonyme a ).

La production d'akènes a lieu 3 à 4 semaines après la pollinisation qui est assurée dans la plupart du temps par les insectes.

L'akène est constitué par le pappus qui assure la dispersion des graines par le vent, il joue le rôle d'un éventail.

Les Centaurées sont des plantes à résine ou à essence sans latex , ils se multiplient par touffes ou par semis, généralement au printemps.

Elles se rencontrent sur différents types d'habitats (Hellwing, 2004 ) tel que, les déserts et les semi-déserts , les pentes raides , les hautes montagnes, les terres arables, les zones à inondations périodiques, les zones sèches et partiellement exposées au soleil.

### **1-3- Richesse en métabolites secondaires et usage médicinale des espèces du genre *Centaurea*.**

Le genre *Centaurea* est connu depuis longtemps dans la médecine populaire par sa richesse en substances naturelles curatives, utilisées contre plusieurs maladies tels que le diabète, la malaria ainsi que les maladies de la peau et du foie.

Récemment plusieurs espèces du genre *Centaurea* font le sujet d'une large investigation phytochimique en raison de leur richesse en métabolites secondaires connues pour leurs diverses activités biologiques, on cite à titre d'exemples: les flavonoïdes, les lignanes, l'acétylène, les sesquiterpènes lactones. Ces derniers sont les substances les plus fréquentes chez les espèces du genre *Centaurea*, caractérisées par des activités biologiques très importantes: anti tumeur, cytotoxique, antimicrobienne, hypothermique (Lee et al., 1977; Giordano et al., 1992 ; Akbar et al., 1995). Parmi les espèces les plus connues par leurs richesse en métabolites secondaires et leurs usages médicinales sont les suivantes:

#### **a- *Centaurea helenioides* Boiss**

C'est une espèce endémique de la Turquie ses fleurs représentent une teneur importante en cynaropicrin et la  $8\alpha$  acétyl-grosheimin, deux types de sesquiterpènes très actifs connues par leurs activités anti-Inflammatoire, Cardiotonique, Neurocytotoxique (Yayli et al., 2004).

### **b- *Centaurea solstitialis***

C'est une espèce très connue en raison de sa très grande distribution géographique dans les pays du monde, et ses propriétés médicinales contre les troubles digestifs, la malaria, l'ulcère (Yesilada et al., 2004 ; Fujita et al., 1995 ; Honda et al., 1996).

Les feuilles et les fleurs sont riches en chlorojanerin, 13-acétylsolstitialin A et solstitialin A. Ces trois composants sont des sesquiterpènes lactone de type Guaianline actif grâce à la présence des groupes carbonyle  $\alpha$  et  $\beta$  insaturés (Yesilada et al., 2004), ils représentent une activité Anti ulcérogénique et une activité Cytotoxique.

### **c- *Centaurea cyanus***

Les espèces endémiques de l'Iran, de l'Iraq, de Pakistan, de l'Italie et de la Turquie, ont des graines très riches en lignanes de types:

Epoxylygnanes, Berchemol et Lariciresinol 4-O- $\beta$ -D-Glucopyranoside (Shoeb et al., 2004). Elle présente des propriétés Anti-diarrhéique, Antipyrétique et Cardiotonique (Asadipour et al., 2005).

### **d- *Centaurea grisebachii* :**

C'est une espèce endémique de la Grèce est très riche en métabolites secondaires. L'étude phytochimique de Djeddi et al. (2007) a montré l'existence de: 2 types de lignanes, 5 types de flavonoïdes et 10 types de sesquiterpènes, parmi les types de sesquiterpènes trouvés.

Le type cnicine de germacranolide confère à la plante plusieurs activités antifongique, digestive et apéritive, le même type de sesquiterpènes a été trouvé avec une teneur différentes dans les espèces suivantes (Tesevic V et al., 2007):

*Centaurea diffusa* 0,81 % ,  
*Centaurea squarosa* 0.80 %  
*Centaurea affinis* 0.46 %,  
*Centaurea stoeble* 0.45 %,  
*Centaurea nicaeensis* 0.19 % .

## **2- Présentation de l'espèce *Centaurea nicaeensis nicaeensis***

### **2-1-Description botanique selon Quezel et Santa 1962:**

C'est une espèce non endémique, qui pousse sur notre territoire sur des altitude de 1100 à 1200 m, elle est caractérisée par des bractées à appendice dont l'épine médiane est très marquée et de couleur claire, accompagnées de courtes épines en nombre variable. Fleurs jaunâtres, tige presque nulle et se terminant par un capitule sous lequel naissent des rameaux plus ou moins longs. Feuilles non décurrentes sur la tige les inférieures lyrées. Capitules est de 1,5 cm de diamètre involucre par les feuilles supérieures.

Elle est divisée en quatre sous espèces qui sont (anonyme b) :

***Cetaurea nicaeensis ssp kroumiriensis.***

***Centaurea nicaeensis ssp nicaeensis.***

***Centaurea nicaeensis ssp waliana.***

***Centaurea nicaeensis var Barbara.***

## 2-2- Répartition géographique de l'espèce *Centaurea nicaeensis*:

C'est une espèce très répandue qui se rencontre dans le Nord de l'Afrique ( l'Algérie et la Tunisie) , l'Afrique du centre ( Ethiopie ) et presque dans toute l'Europe: la Corse de l'Italie, Malta, la Sardaigne, la Sicile, l'Espagne, la France (anonyme c).



■ *Centaurea nicaeensis*

Figure 1: répartition géographique de l'espèce étudiée

**2-3- Classification de l'espèce *Centaurea nicaeensis*:**

**Règne :** *Plantae*.

**Ordre :** *Astrales*.

**Famille :** *Asteraceae*.

**Tribu :** *Cardeae*.

**Sous tribu:** *Centaurienae*.

**Genre :** *Centaurea*.

**Espèce :** *Centaurea nicaeensis*.

**Sous espèce :** *Centaurea nicaeensis nicaeensis*.



**Figure 2:** photo de l'espèce *Centaurea nicaeensis*



### **3 - Aspect cytogénétique**

#### **3 -1- Le nucléole**

Il est connu depuis les années 1960 comme étant le centre de synthèse des ARN ribosomiques et d'assemblage des sous unités ribosomiques, il contient des gènes codant pour les ARNr ainsi que des particules contenant les ARNr 18S et 28S à différents stades de maturation et d'assemblage avec les protéines ribosomiques (D. Hernandez et E. Louvet , 2004).

Les ribosomes sont constitués de deux sous-unités, une petite de 40S et une grande de 60S qui sont produites dans le nucléole et transportées séparément dans le cytoplasme. La sous-unité de 40S est constituée de l'ARNr 18S auquel sont associées 33 protéines ribosomiques. La sous-unité de 60S est formée par les ARNr 28S, 5,8S et 5S auxquels sont associées 49 protéines ribosomiques .

Les ARNr 28S, 18S et 5,8S sont synthétisés, maturés et assemblés avec les protéines ribosomiques dans le nucléole à partir de transcrits primaires issus de la transcription des gènes ribosomiques par l'ARN polymérase I (Pol I). Les étapes les plus tardives sont réalisées au cours du transport des sous-unités ribosomiques dans le nucléoplasme ou même dans le cytoplasme. L'ARNr 5S est associé à la sous-unité ribosomique 60S dans le nucléole après avoir été synthétisé dans le nucléoplasme par l'ARN polymérase III ref (D. Hernandez et E. Louvet , 2004)

La quantité de ribosomes produite dépend de l'efficacité de ces machineries nucléolaires mais aussi du nombre de gènes ribosomiques activés (D. Hernandez et E. Louvet , 2004)

### **3-2 Gènes ribosomiques**

Ce sont des gènes répétés en tandem regroupés dans des régions chromosomiques appelées régions organisatrices du nucléole ou NOR (régions organisateurs nucleolaires), certaines copies de gènes pourraient être sous forme hétérochromatique.

Le nucléole s'organise autour du NOR , dans certaines espèces comme chez l'homme, il y a coopération entre plusieurs NOR pour former un nucléole. Le nombre de gènes ribosomiques varie de 100 à plusieurs centaines chez les mammifères. Cependant, toutes les copies ne sont pas actives: même lorsqu'une forte production de ribosomes est nécessaire, on estime que seulement 60% des gènes ribosomiques sont actifs dans les cellules de mammifères en phase exponentielle de croissance. (D.Hernandez et E.Louvet, 2004.)

### **3-3 Les chromosomes B:**

Les chromosomes B sont des chromosomes surnuméraires décrits pour la première fois par (Pantulu ,1960) in R. Lespinasse et al .(1993 ) , ils peuvent se trouver chez certaines espèces végétales et animales , mais pas Chez tous les individus d'une espèce (Jones et Rees ,1982). Ils sont souvent maintenus grâce à un biais favorable à leur transmission.

Les auteurs cités ont montré que la présence de chromosomes B covarie fortement et positivement avec la taille totale du génome. Ils sont pratiquement absents chez les espèces à petit génome ainsi que avec le degré d'allo-fécondation (un paramètre qui est également associé positivement à la présence de chromosomes B) ( R. Trivers et al., 2003) .

Selon Lespinasse et al. (1993 ) Les chromosomes **B** sont:

- De nature heterochromatique.
- Non indispensable a l'espece qui les possède.
- Ne présentent pas d'homologie avec les chromosomes A.
- Montrent une variabilité intra et interindividuelle.
- Se transmettent avec des mécanismes d'accumulation et d'élimination modifiant la distribution mendélienne.

Lorsque le nombre des chromosomes B atteint un seuil critique les chromosomes B forment un multivalent en étoile et sont éliminés de la cellule a la télophase I de la méiose ce mécanisme de régulation est très utile pour la plante car il permet le déroulement régulier de la télophase II (Yakovlev, 1992).

### **3-4 L'hétérochromatine**

Emil Heitz 1928 a défini l'hétérochromatine (HC) comme les segments de chromosome qui apparaissent très condensés et très colorés dans le noyau interphasique, elle est considérée comme une partie du génome qui bouge beaucoup: amplification rapide, siège d'insertion de transposon, zones renfermant les pointes de cassures. Sa structure peut être conservée identique pendant des millions d'années comme elle peut évoluer rapidement (Lespinasse et al., 1993).

Elle se trouve sous deux formes facultatives et constitutives.

#### **3-4-1 L'hétérochromatine constitutive**

L'HC constitutive contient un ADN tout à fait particulier, appelé ADN satellite et constitué de séquences courtes et répétées en tandem un

très grand nombre de fois : ADN alpha-satellite, ADN satellite I, II et III. Ces séquences d'ADN satellite peuvent se replier sur elles mêmes et pourraient jouer un rôle important dans la structure très compacte que présente l'HC constitutive.

L'HC constitutive est stable et garde ses propriétés d'hétérochromatine à toutes les étapes du développement et dans tous les tissus.

L'HC constitutive est très polymorphe probablement du fait de l'instabilité de l'ADN satellite. Ce polymorphisme peut concerner aussi bien la taille, que la localisation de l'hétérochromatine et n'entraîne apparemment aucun effet phénotypique.

L'HC constitutive est fortement colorée par la technique des bandes C, ce qui pourrait résulter de la renaturation très rapide de l'ADN satellite.

# **Matériel et méthodes**

## **II - Matériel et méthodes**

### **II-1 Matériel**

Le matériel étudié est constitué de graines de l'espèce *Centaurea nicaeensis*, les plantes ont été collectées dans la willaya de Batna exactement dans la région du Rhoufi à une altitude de 1100 à 1200 m .

### **II-2 Méthodes:**

#### **2-1- Méthodes appliquées sur les méristèmes racinaires:**

##### **- La coloration a l' Acyto-orceine**

###### **a- Germination :**

Après avoir désinfecté les graines de l'espèce étudiée dans l'eau de javel diluée à l'eau distillée 50/50 pendant 10 minutes, les graines sont mises à germer dans des boîtes de Pétri tapissée de papier absorbant et imbibées d'eau distillée à une température ambiante.

Lorsque les racicules atteignent une longueur de 0.5 à 1 cm nous passons à l'étape suivante :

###### **b- Le prétraitement :**

Les racicules sont prétraitées à la 8 hydroxy quinone pendant 3heures dans une température constante à 16c°.

###### **c- Fixation**

Le fixateur utilisé est le 3v-1v (3volume d'éthanol-1 volume d'acide acétique), son rôle est de détruire toute vie cellulaire.

###### **d- La conservation**

La conservation des pointes racinaires est faite dans l'éthanol à 70% pendant quelques mois.

### **e- Hydrolyse**

C'est une étape de macération très critique où la température et la normalité de l'HCl 1 fois N à 60c° pendant 10 min.

### **f- La coloration**

Les radicules sont colorées avec l'acéto-orceine pendant 20 mn, elle permet de distinguer les zones méristématiques.

### **g- Montages des lames**

L'observation des meilleures plaques métaphasiques s'effectue sous l'objectif x40, et la prise des photos se fait avec l'objectif x100 avec un photo microscope type Zeiss.

## **2-2- Méthodes d'analyses de l'hétérochromatine:**

### **A- Le C banding**

A fin de mettre en évidence les différents types de l'hétérochromatine de l'espèce *Centaurea nicaeensis* nous avons appliqué la technique adoptée par Marks (1975)

#### **a- Délamellation**

Le décollement des lames se fait à l'azote liquide à -196c° .

#### **b- Dénaturation**

La dénaturation se fait dans l'hydroxyde de barium ( Baryte) 11,68g/200ml chauffé jusqu' à 80 c° et puis refroidie rapidement jusqu' à 45c° pendant 5 minutes .

#### **c- Rinçage**

Les lames sont rincées à l'eau de robinet pendant 45mn ensuite avec l'eau distillée pendant 10 minutes , un dernier rinçage avec l'éthanol pendant 5mn jusqu' à clarification des lames.

#### **d- Renaturation**

Les lames sont transférées dans une solution fraîche de tampon (Sorensen) 2XSSC à pH= 7 et une température de 60c° dans un bain Marie pendant 30 mn.

#### **e- La coloration**

Les lames sont plongées dans une solution de tampon phosphate à pH=6,8 et 4% de Giemsa pendant 13 mn .

#### **f- Montage**

La préparation sera montée définitivement entre lame et lamelle dans un liquide spécial appelé EUPARAL.

#### **g- La photographie**

Les meilleures plaques obtenues sont prises au microscope photo Zeiss au grossissement x100.

### **B- le N banding**

Nous avons suivie le protocole de Gill ( 1988) pour réaliser la technique du N- banding dans le but de détecter les régions organisateurs nucléolaires et marquer l'hétérochromatine.

#### **a- La coloration**

Les pointes sont plongées dans le carma acétique à 1% pendant 1h afin de rendre les parois ramollies , les écrasements sont effectués entre lame et lamelle dans une goutte d' acide acétique à 45% .

Les préparations sont soumises aux étapes suivantes

#### **b- Délamelation**

Le décollement des lames se fait à l'azote liquide – 196c°.

#### **c- L'hydrolyse**

Les lames sont traitées dans l'acide acétique à 45% chaud à 60 c° pendant 10 mn et puis les laisser sécher une nuit.



#### **d-Dénaturation - Renaturation**

les lames sont mises dans une solution de 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 92 C° pendant 2mn à pH= 4,2 par la suite les lames sont rincées à l'eau distillée pendant 2 min .

#### **e- Coloration**

Se fait dans la solution 0,1 M Sorensen phosphate Buffer à pH=6,8 et 4 % de Giemsa pendant 30 à 45 min.

#### **f- observation et photographie**

l'observation et la prise des photos s'effectuent sous l'objectif X100 d'un photo microscopique type **Zeiss**

### **C- La coloration au nitrate d'argent**

Cette technique a été décrite par Howwell et Black (1980) ,elle permet de mettre en évidence les régions organisatrices du nucléole (NOR), pour révéler ces régions particulières, 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:

- 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 (10M ,1:1) 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.

### **2-3- Coloration à la chromomycine A3**

#### **A- Préparation des protoplastes**

- Les méristèmes racinaires sont plongés dans un tampon citrate à 0.01 M pendant 10 mn.
- Puis ils sont transférés dans un verre de montre contenant une solution enzymatique .
- Le verre de montre est placé dans une boîte de Pétri contenant du papier absorbant imbibé d'eau.
- La boîte de Pétri est mise dans une étuve réglée à température de 37 c° pendant 45mn.
- Après avoir rincé les pointes avec l'eau distillée pendant 10 mn ou plus. Les pointes racinaires ont été triturées complètement dans une goutte de l'acéto-orceine à l'aide de deux aiguilles et sous loup binoculaire.
- La préparation est montée entre lame et lamelle pour observer les chromosomes.

#### **B- Fluorochrome banding**

- Incuber des lames dans le tampon Mc Ilvain pH=7 contenant 20 mM de MgCl<sub>2</sub> pendant 15 mn. Il est recommandé de bien secouer les lames pour se débarrasser de l'excès du tampon.

- Rajouter une grosse goutte de chromomycine A3 pendant 10 mn à l'obscurité . Rincer avec le tampon Mc Ilvain à pH=7.
- une Contre colorer au vert de méthyle à 0.01% dans le tampon Mc Ilvain à pH=5,5 à l'obscurité .
- Bien Sécher les lames.
- Monter les lames dans une goutte de glycérol 1:1 avec le tampon Mc Ilvain +20 mM MgCl à pH=7.
- Observer au microscope à épifluorescence avec un filtre permettant une longueur d'onde d'excitation de 450 nm et d'émission de 560nm.

# **Résultats et discussion**

### III- Résultats et discussion

Notre travail a contribué à une étude cytogénétique de l'espèce *Centaurea nicaeensis* collectée dans la région du Rhoufi située dans la wilaya de Batna. Jusqu'à nos jours aucune étude cytogénétique n'a été réalisée sur cette espèce.

#### 1-Etude caryologique

La description de la morphologie des chromosomes se base sur différents paramètres: la taille, la position du centromère, la présence des satellites ou des constructions secondaires.

Pour établir le caryotype d'autres caractères sont également utilisés: la longueur totale (LT), la taille relative des chromosomes (TR), le rapport du bras long sur le bras court et l'asymétrie du caryotype.

Le caryotype de l'espèce étudiée ( figure 3 ) est constitué de 10 paires chromosomiques, cinq sont de type métacentrique, il s'agit des paires suivantes : 3, 4, 5, 6, 9.

Quatre paires sont de type submétacentriques : 1, 2, 7, 8, dont trois sont munies de satellites portés sur leurs bras courts (1,2,7).

Une paire est subtélocentrique il s'agit de la paire 10.

Ces données nous ont permis de déduire que l'espèce est diploïde dont le nombre de base est  $x=10$  et la formule chromosomique est la suivante:

$$2n = 2x = 20 = 10 m + 8 sm (6 sat) + 2 st.$$

Favarger et Siljak-Yakovlev (1986) suggèrent que le nombre  $x=10$  chez le genre *Centaurea* est dérivé du nombre de base  $x=11$  par dysploidie chromosomique. Signalons que le même nombre chromosomique  $2n = 20$  de l'espèce *Centaurea nicaeensis* a été trouvé par G. Blanca (1980) dans une population espagnole.

Les données numériques concernant la garniture chromosomique de l'espèce étudiée sont présentées dans le **tableau 2**.

La longueur totale des chromosomes varie entre 1,45  $\mu\text{m}$  et 2,85 $\mu\text{m}$ , le rapport entre la longueur des bras longs et celle des bras courts varie entre 10,3  $\mu\text{m}$  et 4,8  $\mu\text{m}$ . La longueur relative moyenne varie de 6,35 % à 12,5 %.

Un caryotype symétrique présente des chromosomes de taille voisine ayant des centromères médians ou sub- médians ( chromosomes de type méta ou sub-métacentrique ce qui lui donne un aspect homogène (stebbins 1971) . Dans notre étude tous les chromosomes sont de type méta et sub-métacentrique , l'indice d'asymétrie est de 62,11% ce qui indique que le caryotype est **symétrique**.

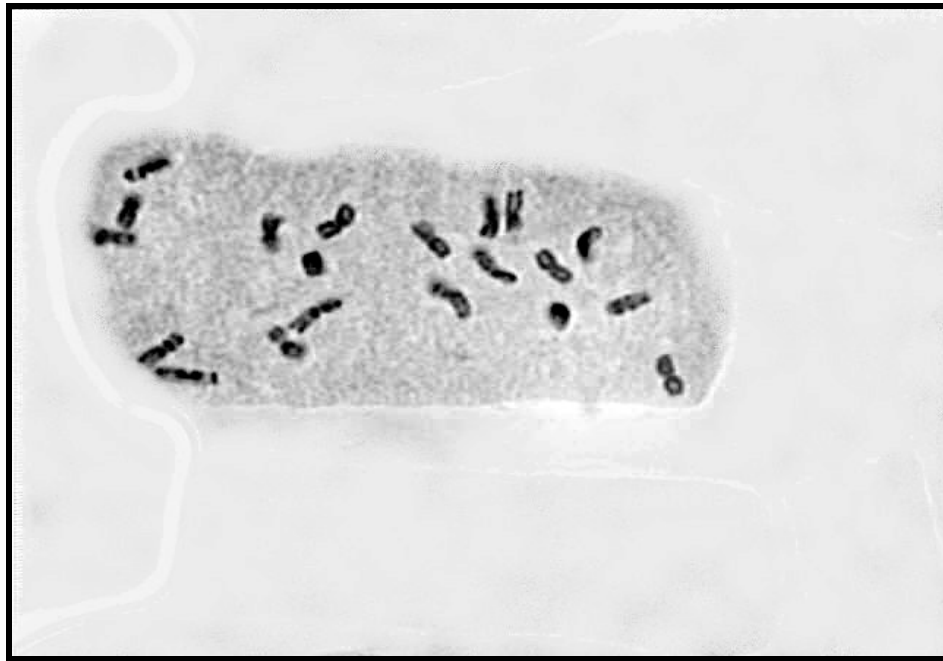
En comparant nos résultats sur *Centaurea nicaeensis* avec ceux obtenus par **Yakovlev ( 1986)** sur l'espèce diploïde *Centaurea salonitana* (  $2n = 2x = 20$  ) qui appartient à la section *Acrocentron* , on a remarqué une certaine ressemblance caryologique surtout en ce qui concerne le nombre de paires satellifères (3 paires), le nombre de paires métacentriques ( 5 paires) et l'indice d'asymétrie 61,55 % qui est très proche de l'I.a.s de notre espèce 62,11%.

Cependant l'emplacement des paires métacentriques et submétacentriques ainsi que la position des satellites entre les deux espèces diploïdes sont différents.

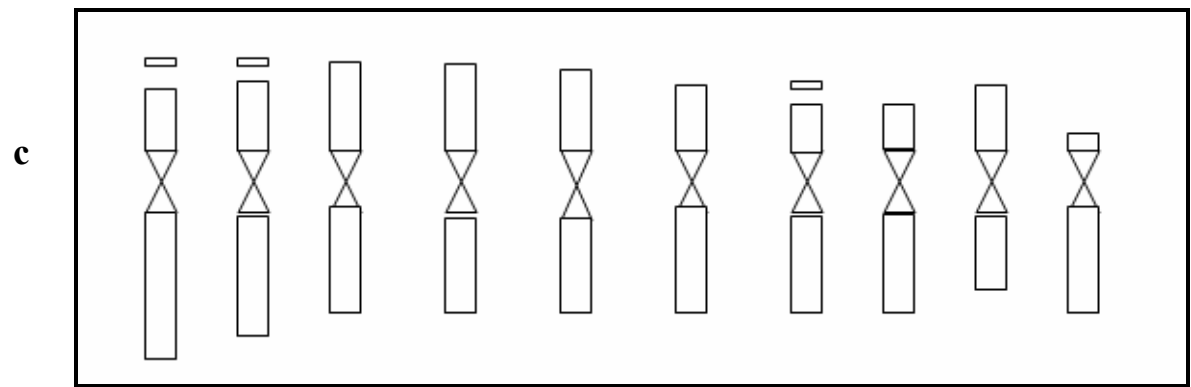
L'existence de l' ADN satellifère est considérée comme marqueur génétique qui peut jouer un rôle dans l'appariement chromosomique au cours de la méiose et protéger les gènes terminaux contre les processus de gains et de pertes chromosomiques (Handerson et Kipling ,1995 ). Jones (2004) a défini l'ADN satellifère comme étant un ADN répétitif accumulé par la transposition et la rétrotransposition de certains éléments ou par les erreurs parvenues au moment de la réplication.

**Tableau 2:** Caractères morphométriques des chromosomes de l'espèce *Centaurea nicaeensis*.

Paire	BC	BL	LT	LR	BL/ BC	INC	T-C
<b>1</b>	0,84 (0,12)	2,01 (0,26)	2,85	12,5	2,39	29,47	<b>Sm-st</b>
<b>2</b>	0,96 (0,03)	1,65 (0,08)	2,78	12,19	1,71	34,53	<b>Sm-st</b>
<b>3</b>	1,22 (0,19)	1,46 (0,38)	2,68	11,75	1,19	45,52	<b>m</b>
<b>4</b>	1,2 (0,26)	1,24 (0,10)	2,44	10,70	1,03	49,18	<b>m</b>
<b>5</b>	1,1 (0,03)	1,29 (0,26)	2,39	10,48	1,17	46,02	<b>m</b>
<b>6</b>	0,89 (0,11)	1,45 (0,27)	2,34	10,26	1,62	38,03	<b>m</b>
<b>7</b>	0,66 (0,36)	1,33 (0,45)	1,99	8,72	2,01	33,16	<b>Sm-st</b>
<b>8</b>	0,61 (0,13)	1,35 (0,49)	1,96	8,59	2,21	31,12	<b>sm</b>
<b>9</b>	0,90 (0,69)	1,01 (0,43)	1,92	8,42	1,12	46,8	<b>m</b>
<b>10</b>	0,25 (0,26)	1,20 (0,56)	1,45	6,35	4,8	17,24	<b>st</b>
<b>ΣLT</b>	8,63	14,17	22,8				























1μm



**Figure 3:** Caryotype de l'espèce *Centaurea nicaeensis*  
**a:** Plaqué métaphasique **b :** Caryogramme **c :** Idiogramme



**Tableau 4:** Tableau n°4 : comparaison entre les chromosomes des deux espèces du genre *Centaurea*

<b>Caryogramme</b>		
Espèces Paires	<i>Centaurea nicaeensis</i>	<i>Centaurea salonitana</i>
1	 Sm-sat	 m
2	 Sm-sat	 m
3	 m	 m
4	 m	 Sm
5	 m	 m
6	 m	 Sm- sat
7	 Sm-sat	 Sm-sat
8	 Sm	 Sm
9	 m	 m
10	 St	 Sm-sat

## 2- Le C- Banding

Afin de mettre en évidence les différents types d'hétérochromatine constitutive et caractériser la structure chromosomique de l'espèce étudiée nous avons appliqué une deuxième analyse cytogénétique: la coloration différentielle par Giemsa adopté par Marks (1975) in Yakovlev 1986 .

Les résultats obtenus ont permis de distinguer la présence de deux types d'hétérochromatine, télomérique et centromérique et l'absence de l'hétérochromatine intercalaire ( figure 4 ).

Nous avons constaté tout d'abord que les bandes centromériques sont distribuées sur toutes les paires chromosomiques en quantité assez importante , et que les bandes télomériques se situent sur les bras longs des paires 1, 2, 3, 7, et sur les bras courts des paires 4, 5, 6, 10 en faible quantité. La présence de l'hétérochromatine dans les satellites des paires 1,7, qui se distinguent par leur richesse en hétérochromatine constitutive, à l'inverse des paires 9, 10 qui sont les plus pauvres par rapport aux autres.

En rapprochant nos résultats à ceux donnés par Yakovlev (1986 ) sur l'espèce *Centaurea ragusina* ( espèce diploïde  $2n = 2x = 20$  de la Yougoslavie ) on a remarqué une grande similarité entre la structure chromosomique des deux espèces notamment en ce qui concerne le type de bandes d'hétérochromatine existantes d'une part et la quantité d'hétérochromatine télomérique et centromérique d'une autre part. Les deux espèces présentent deux types de bandes, centromériques qui se repartissent sur toutes les paires chromosomiques, et quelques bandes télomériques en quantité faible.

L'intensité des bandes centromériques est très forte sur toutes les paires chromosomiques de l'espèce *Centaurea nicaeensis* par rapport à ceux donnée par *Centaurea ragusina*

Cependant, la distribution des bandes télomériques sur les chromosomes des deux taxons est différente, chez *Centaurea nicaeensis* on les trouve dans les bras longs des paires 1, 2, 3, 7 et les bras courts des paires 4, 5, 6, 10. En revanche, chez *Centaurea ragusina* les bandes télomériques se trouvent sur les bras longs des paires 2, 3, 9.

Le rôle que peut jouer l'hétérochromatine au sein du génome reste encore confus elle est définie comme étant une région comportant peu ou pas de gènes actifs et dans laquelle on trouve des séquences d'ADN répétées.

Selon Yakovlev (1986) la présence d'hétérochromatine télomérique semble jouer un rôle dans l'appariement et le maintien des bivalents au cours de la méiose chez les espèces du genre *Crepis*.

Moryis (1990) suggère que les bandes télomériques sont indispensables pour le maintien de la structure et le fonctionnement des chromosomes que se soit pour l'homme, les plantes ou la drosophile.

Les études effectuées par ( Ambros et Sumner 1987; Collins et al., 1996) in Macoura Gadji (2005) ont montré que les régions d'hétérochromatines télomériques présentent un profil particulier par rapport aux autres régions, ce profil se caractérise par une fréquence en bases GC très élevée, un fort taux de recombinaison.

## **Les chromosomes B**

Outre l'hétérochromatine constitutive, la coloration différentielle au Giemsa a révélé la présence de deux chromosomes **B** de nature hétérochromatique. La présence de ces éléments a été remarquée chez

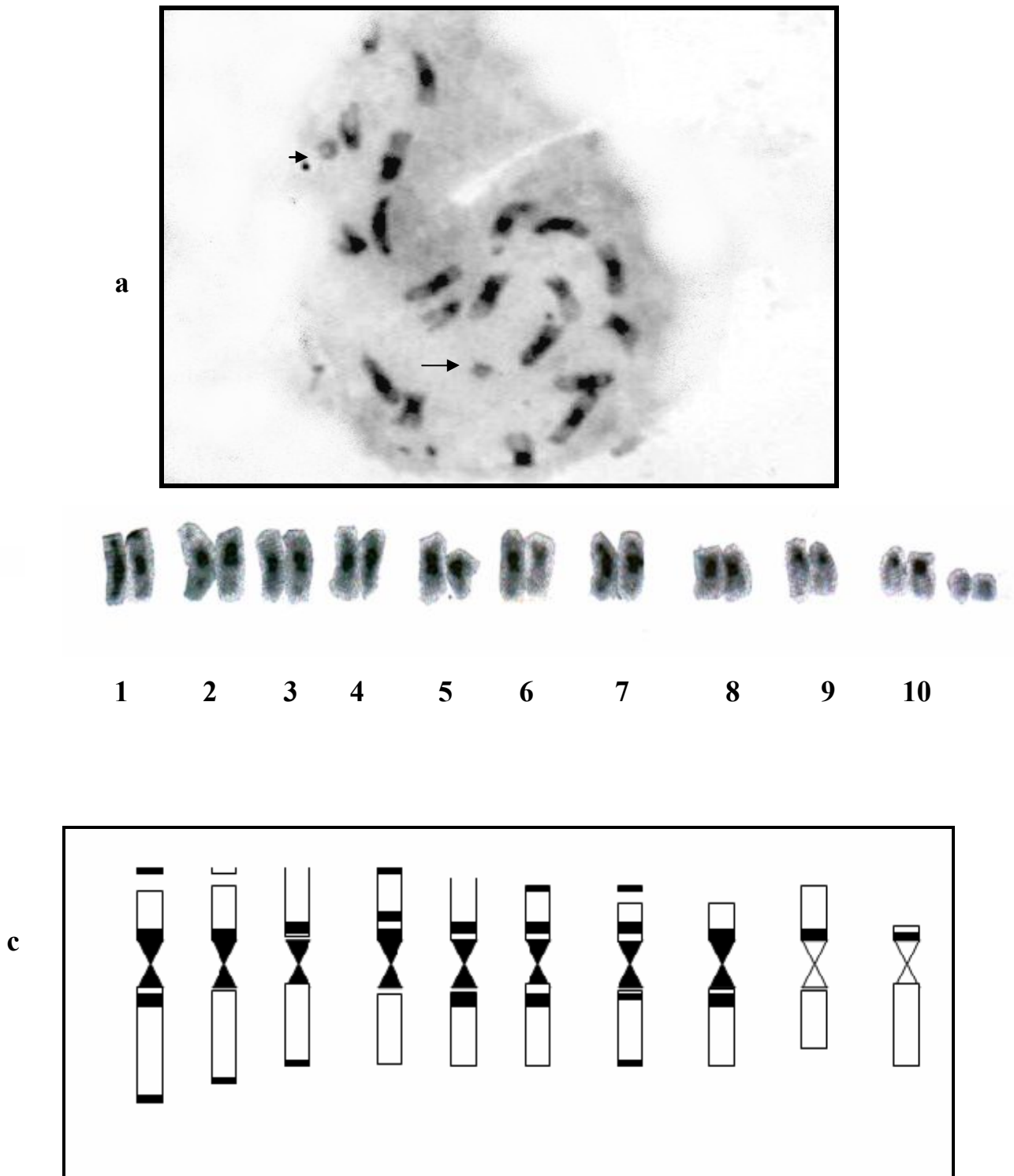
plusieurs espèces du genre *Centaurea* on cite à titre d'exemple : *Centaurea jacea*  $2n = 44 + 1B$  et *Centaurea monticola*  $2n = 18 + 1B$  ( G. Blanca ,1980).

La plupart des chromosomes B sont de nature hétérochromatique constitués de séquences d'ADN répétées et sont génétiquement inertes (Cuadrado et Jouve ,1994). Certains montrent une activité transcriptionnelle due à la présence de gènes ribosomiques (Green, 1988).

Le rôle des chromosomes B reste encore mal compris, certains auteurs supposent que leur existence dans le génome permet une meilleure adaptation des populations à un nouvel environnement (Lespinasse, 1980 ) in Siljak- Yakovelev (1986 ).

Ruiz –Rejon et al. (1980) , Oliver et al. (1982) ont pu montrer qu'il existe une corrélation entre l'expression de certains gènes localisés sur les chromosomes A et la présence des chromosomes B, donc ces derniers jouent un rôle important dans la régulation de l'expression du génome tout entier.

Les études effectuées par ( Ambros et Sumner 1987; Collins et al., 1996) in Macoura Gadji (2005) ont montré que les régions d'hétérochromatines télomériques présentent un profil particulier par rapport aux autres régions , ce profil se caractérise par une fréquence en bases GC très élevée, un fort taux de recombinaison.



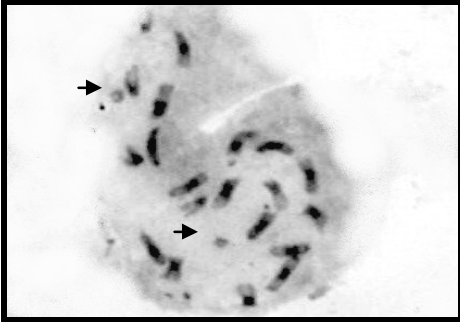
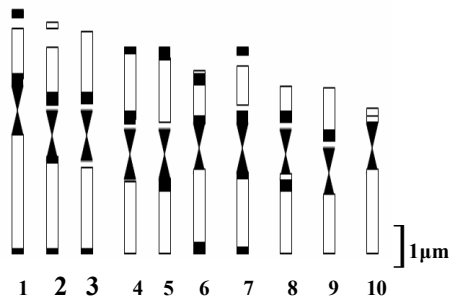
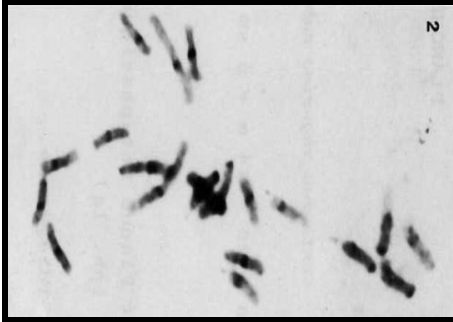
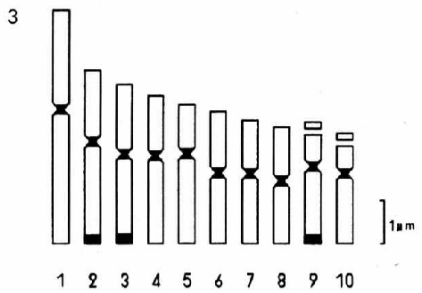
**Figure 4:** Coloration différentielle par Giemsa de l'espèce *Centaurea nicaeensis*

**a :** plaque metaphasique

**b :** Caryogramme

**c :** Idiogramme

**Tableau n°5: comparaison entre les idiogrammes de deux espèces du genre *Centaurea***

<b>Technique : C banding</b>		
<b>Espèce</b>	<i>Centaurea nicaeensis</i>	<i>Centaurea ragusina</i>
	 	 

### 3- Fluorochrome banding

Le fluorochrome banding à la Chromomycine A3 ( figure 5 ) a permis de détecter l'existence de 29 bandes d'hétérochromatine riches en séquences GC dispersées sur les chromosomes de la manière suivante:

13 chromosomes présentent une seule bande télomérique riche en GC située soit sur le bras court soit le bras long des chromosomes. Alors que 7 chromosomes sont marqués par deux bandes situées sur leurs deux extrémités. Deux chromosomes présentent une bande centromérique située sur leur bras long. Et un chromosome présente une bande centromérique située sur son bras court.

Yakovlev et Cartier (1986) suggèrent que l'abondance de l'hétérochromatine riche en séquences GC dans les télomères protège les extrémités des chromosomes .

La co-localisation des sites d'ADNr (18S-5.8S- 26S) avec certaines bandes de chromomycine riches en séquences GC situées dans les satellites ou les télomères a été détectée chez de nombreuses espèces végétales, on cite à titre d'exemple les genres : *Artemisia* ( Torrell et al., 2003), *Chrysanthemum* (Abd el Tawab et Kondo, 2006 ), *Vicia* ( Raina et al., 2001 ), *Linum* (Muravenko et al., 2004), ainsi que plusieurs espèces de poissons (Rossi et Cornug 2005 ), les bryophytes et les vers de terre (Sone et al.,2003 ; Vitturi et al., 2002 ).

Cependant une étude cytogénétique réalisée sur six espèces du genre *Artemisia* ( famille des Astéracées ) a montré que tout les sites des deux groupes majeurs de l'ADNr (5S et 18S) sont co-localisés avec les bandes de chromomycine riches en séquences GC à l'exception de 3 loci chez l'espèce *A.argillosa* et un locus chez l'espèce *A. rigida* (S.Garcia et al.,2007).

Cette coïncidence de co-localisation indique que les NORs sont associés à l'hétérochromatine riche en séquences GC et que les gènes ribosomiques sont riches en séquences GC (Schmjd et Guttenbach ,1988 ; Siljak-Yakovlev et al., 2002).

#### **4- Coloration au nitrate d'argent**

Cette technique permet de mettre en évidence les nucléoles et détecter les sites transcriptionnels actifs ( Howell et Black, 1980).

L'analyse des lames métaphasiques par la coloration au nitrate d'argent a permis d'obtenir les résultats cités dans le tableau ci-dessous .

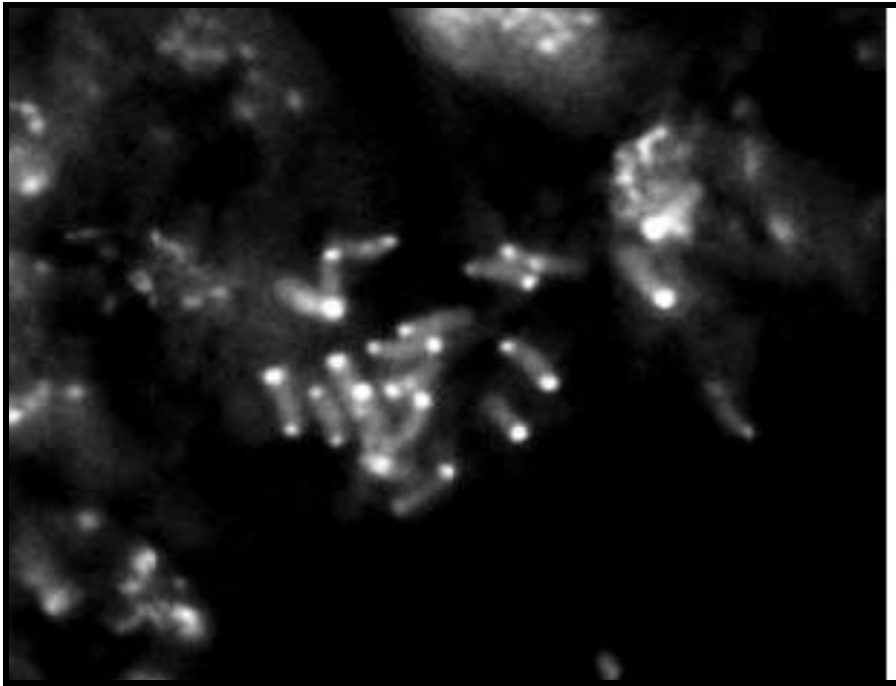
**Tableau 3:** Nombre de nucléoles détectés dans 50 cellules

<b>Nombre de nucléoles</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>moyenne</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>25</b>	<b>8</b>	<b>7</b>

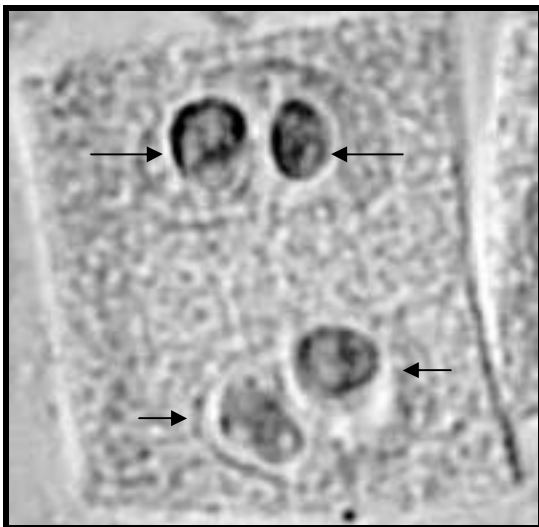
Les résultats obtenus montrent que le nombre de nucléoles varie de 1 à 5, mais le plus fréquent est de 3 nucléoles par noyau, cela se traduit selon Yakovlev et al (2002) par le fusionnement de certains, signalons que la taille des nucléoles est très variable certains sont très petits et d'autres sont assez grands (figure 6).

Les nucléoles sont définis comme étant des régions quasi-circulaires plus claires que le reste du noyau en raison de leur instauration en chromatine (Angulo J et Serra J, 2000). Leur formation a lieu toujours autour des gènes ribosomiques qui ont une forte expression génétique (Leitch 2000).





**Figure 5:** Plaqué métaphasique colorée au Fluorochrome banding (Chromomycine A3).



**Figure 6:** Nucléoles révélés par coloration au nitrate d'argent.



**Figure 7:** NOR révélé par N banding.

Le niveau de l'activité transcriptionnelle des NORs est lié à leur taille d'une part et au nombre de gènes ribosomiques d'une autre part ( Golczyk H et al., 2005). Lorsque le nombre de copies de l'ADNr est faible les nucléoles ne peuvent pas se développer, la présence d'un grand nombre de nucléoles au niveau des noyaux indique une forte activité transcriptionnelle des NORs et une richesse en gènes ribosomiques (Zurita et al., 1998 ; Taketa et al., 1999).

Les modifications dans la structure des NORs sont souvent issues du crossing-over ou à l'insertion de certains éléments transposables, mais dans la majorité des cas ces changements n'influent pas sur le niveau de l'activité transcriptionnelle des NORs ( Gallettirj et al., 1995; Castro et al., 1998).

## **5- Le N banding**

A côté des techniques cytogénétiques réalisées sur l'espèce étudiée et citées précédemment, nous avons réalisé la technique du N banding adopté par Gill ( 1988) .

Les résultats obtenus ont permis de détecter les différentes bandes N ainsi que les organisateurs nucléolaires (NOR) (figure7 ).

Parmi les 12 chromosomes trouvés

Cinq sont riches en bandes N , ces derniers sont localisés principalement sur leur bras courts .

deux chromosomes sont dépourvus en bandes N.

Deux chromosomes présentent de fines bandes N télomériques situées sur leurs deux extrémités.

Deux autres chromosomes se caractérisent par de fines bandes centromériques et intercalaires situées sur leur bras courts.

Et un seul chromosome métacentrique se caractérise par la présence d'un organisateur nucléolaire (NOR) située sur son bras court proche du centromère ( construction primaire) .

D'après Schlegel et Gill (1984) les bandes N correspondent à une hétérochromatine spécifique contenant des séquences d'ADN polypyrimidiques ( GAA)<sub>n</sub> et ( GAG)<sub>n</sub>.

Une étude réalisée sur l'espèce *Xenopus laevis* a montré que les bandes N coïncident avec la localisation des gènes ribosomiques codant pour ARN 18s et 28s , cette colocalisation des bandes N avec les gènes ribosomiques a été détectée chez plusieurs espèces animales et végétales ( Matsui., 1974).

L'analyse cytogénétique de l'espèce *Centaurea nicaeensis* , effectuée par le C banding , le fluorochrome banding indique que l'espèce est riche en hétérochromatine , deux classes ont été distinguées. La localisation de chaque classe d'hétérochromatine sur l'ensemble des chromosomes est différente de l'autre .

L'hétérochromatine constitutive révélée par le C banding se trouve en grande quantité sur les centromères de tous les chromosomes.

Cependant l'hétérochromatine riche en bases GC révélée par le fluorochrome banding se localise en forte intensité sur les télomères de tous les chromosomes .

Cette différence de comportement entre les deux classes nous a permis de déduire que l'hétérochromatine constitutive est pauvre en bases GC.

# **Conclusion et Perspectives**

## Conclusion

Au cours de ce travail nous avons pu avoir une connaissance cytogénétique assez importante sur le génome de l'espèce *Centaurea nicaeensis*, en appliquant des techniques cytogénétiques conventionnelles ( coloration à l' aceto-orceine ,C banding, coloration au nitrate d'argent , coloration à chromomycine A<sub>3</sub> ).

Au niveau chromosomique et grâce à la coloration par l'acéto-orcéine on a réussi à identifier les points suivants:

- le nombre chromosomique de l'espèce  $2n= 2x=20$
  - le niveau de ploïdie: espèce diploïde avec un nombre de base  $x=10$ .
- ainsi que le type du caryotype qui est symétrique. Ce dernier est constitué de 10 paires chromosomiques : 5 sont de type métacentrique ,4 de type submétacentrique dont 3 portent des satellites sur leurs bras courts , et une paire subtélocentrique.

La coloration différentielle au Giemsa nous a permis d'avoir une idée sur la structure chromosomique de l'espèce étudiée ainsi d'identifier le type d'hétérochromatine constitutive existante, elle est principalement centromérique localisée dans toutes les paires chromosomiques et télomérique présentée dans quelques paires seulement. L'existence de deux chromosomes B a été détectée par cette technique.

La technique du fluorochrome banding à la chromomycine A<sub>3</sub> a révélé la richesse de notre espèce *Centaurea nicaeensis* en hétérochromatine riche en base GC, sa localisation est toujours télomérique.

Selon la littérature, l'hétérochromatine riche en base GC se trouve en juxtaposition avec les NORs au niveau des gènes ribosomiques.

La coloration au nitrate d'argent nous a permis de mettre en évidence le nombre de nucléoles et par conséquent d'évaluer l'activité des NORs.

A partir de toutes ces données on peut considérer que l'espèce *Centaurea nicaeensis* est riche en hétérochromatine tout en se basant sur la présence des chromosomes B qui sont une surcharge en hétérochromatine, la présence de l'hétérochromatine centromérique dans toutes les paires de l'espèce et la présence de l'hétérochromatine riche en bases GC dans tous les télomères des chromosomes.

Malheureusement nous n'avons pas pu obtenir des résultats avec l'hybridation *in situ* ce qui nous a amené à se poser la question: Est-ce que toutes les bandes de l'hétérochromatine riches en séquences GC détectés dans notre étude sont en co-localisation avec les gènes ribosomiques?

## **Perspectives**

Ce travail a pu fournir des données de base sur le génome de l'espèce étudiée, mais il serait mieux d'enrichir cette étude en utilisant des techniques cytogénétiques modernes tel que l'hybridation *in situ*, afin de localiser les gènes ribosomiques pour conférer une caractérisation complète et précise au génome.

Nous espérons aussi utiliser des techniques de biologie moléculaires qui permettent d'attribuer une fonction précise à certains éléments qui se présentent au sein du génome tel que les chromosomes B et l'hétérochromatine.

# **Références bibliographiques**



## Références bibliographiques

- Abed el Tawab M. H., Kondo K., 2006.** FISH physical mapping of 5S ,45S and *Arabidopsis* type telomere sequence repeats in *Chrysanthemum zawadeskii* showing intra-chromosomal variation and complexity in nature chromosome. Bot. **1**: 1-5.
- Akbar S., Fries D.S., Malone M.H., 1995.** Effect of various pretreatment on the hypothermic activity of repin in naive rats. Journal of Ethno pharmacology. **49**: 91- 99.
- Angulo J., Serra J., 2000.** Nucléoles. Fantainebleau. Pp: 1-38.
- Anonyme a:** [http//www. Wikipédia- Centaurea .mht](http://www.Wikipédia-Centaurea.mht)
- Anonyme b:** [http//www. Wild Plants of Malta & Gozo - Plant Centaurea nicaeensis .mht](http://www.WildPlantsofMalta&Gozo-PlantCentaureanicaeensis.mht)
- Anonyme c :** [http// www. GBIF Portal.mht](http://www.GBIFPortal.mht)
- Asadipour A., Mehrabani M., Larinajafi M., 2005.** Volatile oil composition of *Centaurea aucheri*. DARU. **13**: 160-164.
- Blanca G., L., 1980.** Numeros cromosomaticos de plantas occidentales. Departamento de Botanica Facultad de Ciencias. Cranada. 234- 238.
- Bernard M., 1992.** Développement et application des technique de coloration différentielle des chromosomes identification des espèces et relations phylétique. Société Française de génétique **8** (3) X II.
- Bremer K., 1994.** ( Asteraceae): Cladistics and classification. Portland.
- Castro J., Sanchez L., Martinez P., 1998.** Analysis of the inheritance of NOR size variants in Brown Trout (*Salmo trutta*). J. Heredity. **89**: 264-266 .
- Cuadrado A., Jouve N., 1994.** Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed fluorescent in situ hybridization. Genome. **37**: 709-712.

- Dittrich M., 1969.** Anatomische Untersuchungen an den fruchten von *Carthmus* L. und *Carduncellus* Adans ( Compositae ). Candoolea. **24**: 263-277.
- Dittrich M., 1977.** *Cynareae*- Systematic review. In : Heywood V.H., Harborne J.B., Turner B.L., The Biology and Chemistry of (Compositae). Oriole New York. Pp: 999-1015.
- Dostal ., 1976.** *Centaurea*. In Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A ., Valentine D.H., Walters S.M., Webb D.A., Flora Europaea 4 Cambridge Pp: 254- 301.
- Favarger C., Siljak-Yakovlev S., 1986.** La classification des taxons endémiques basée sur la cytotaxonomie et la cytogénétique. Colloque international de botanique pyrénéenne. Université de Paris-sud. Orsay Cédex. Pp: 287- 301.
- Font M ., Garnatje T., Susanna A., Garcia-Jacas N., 2002.** Delineation and phylogeny of *Centaurea* Sect *Acrocentron* based in DNA sequences: a restoration of the genus *Crocodylium* and indirect evidence of introgression. Plant Syst. Evol. **234**: 15- 26.
- Fujita T., Sezik E., Tabata M., Yesilada E., Honda G., Takeda Y., Takaushi Y., Tanaka T., 1995.** Traditional medicine in Turkey VII. Folk medicine in middle and west black Sea Regions. Economic Botany. **49**: 406- 422.
- Galettijr P. M., Mestriner C. A., Monaco P. J., Rach E. M., 1995.** Post-zygotic modifications and intra- and Inter-individual nucleolar organizing region variations in fish: report of case involving *Leporinus frederici*. Chromosome. Res. **3**: 285-290.
- Garcia-Jacas N., Susanna A., Ilarslan R., 1996.** Aneuploidy in *Centaureinae* ( Compositae ) : is  $n=7$  the end of the series ?. Taxon. **45**: 39 - 42.

- Garcia-Jacas N., 1998.** *Centaurea kunkelii* Asteraceae (Cardueae ) a new hybridogenic endecaploid species of sect *Acrocentron* from Spain . bot. funnici **35** : 159 -167.
- Garcia-Jacas N., Susanna A., Vlatersana R., Guara M., 1998.** New chromosome counts in the subtribe *Centaureinae* ( Asteraceae , Cardueae ) from West Asia. II. Bot. J. Linn. Soc. **128**: 403- 412
- Garcia-Jacas N., Susanna A., Mowaffarian V., Ilarslan R., 2000.** The natural delimitation of *Centaurea* ( Asteraceae : Cardueae ): ITS sequence analysis of the *Centaurea jacea* group. Plant Syst. Evol. **223**: 185-199.
- Garcia-Jacas N., Susanna A., Garnatje T., Vilatersana R., 2001.** Generic Delimitation and phylogeny of the Subtribe *Centaureinae* ( Asteraceae ) A Combined Nuclear and DNA Analysis. Annals of Botany. **87**: 503-515.
- Garcia S., Garnatje T., Hidalgo O., Mcartur E. D., Siljak-yakovlev S., Valles J., 2007.** Extensive ribosomal rDNA( 18S-5,8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes subgenus (*Tridentatae* *Artemisia* Asteraceae ) revealed by FISH.P1. Syst. Evol. **267**: 79- 92.
- Gardou C., 1975.** Quelques vues synthétiques sur les Centaurées de la section *Acrocentron* ( Cass.) .Coll. Int. CNRS. **35**: 537- 546.
- Gill B. S., 1988.** Chromosomes banding methods standard chromosomes and nomenclature and application in cytogenetic analysis. Wheat and wheat improvement 2<sup>nd</sup> Ed. American society of Agronomy Monograph USA. 13 : 243-254.
- Giordano O.S., Pestchanker M.J., Guerreiro E., Saad J.R., Enriz R.D., Rodriguez A.M., Jauregui E.A., Guzman J., Maria O. M. A., Wendel G.H., 1992.** Structure activity relationship in the gastric

cytoprotective effect of several sesquiterpenes lactones Journal of Medicinal Chemistry. **35**: 2452- 2458.

**Golczyk H., Hasterok R., Joachimiak A. J., 2005.** FISH-aimed karyotyping and characterization of Renner complexes in permanent heterozygote *Rhoeo spathacea*. Genome **48**: 145-153.

**Green D. M., 1988.** Cytogenetics of the endemics new Zealand frog , *Leiopelma hochstetteri* : extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. Chromosoma. **97** : 55 - 70.

**Hellwig, F. H., 1996.** Evolution of characters and phylogeny of the *Centaureinae* pp: 491-510.

**Hellwig F. H., 2004.** *Centaureinae* (Asteraceae) in the Mediterranean history of ecogeographical radiation. Plant Syst. Evol. **246**: 137-162.

**Henderson, E., 1995.** Telomere DNA structure. In : Blackburn, E.H., Greider, C.W. (Eds.), Telomeres. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Pp. 11-34.

**Hernandez-Verdun D., Louvet E ., 2004.** Le nucléole: structure, fonctions et maladies associées. Médecine sciences. **20**: 37- 44.

**Honda G Yesilada E., Tabata M Sezik E Fujita E Takeda Y Takaushi Y Tanaka T., 1996.** Traditional medicine in Turkey VI. Folk medicine in West Anatolia : Afyon, Kutahya, Denizli, Mugla, Aydin provinces. Journal of Ethno pharmacology. **53**: 75- 87.

**Howell W. M., Black D. A., 1980.** Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a one-step method. Experientia. **36**: 1014-1015.

**Jones R. N., Rees H. B., 1982.** Chromosomes Academic press.

**Jones R. N., 2004.** B chromosomes in plants. New phytologist **131**: 411-434.

**Kipling, D., 1995.** The Telomere. Oxford University Press, Oxford.

- Lee K.H., Ibuka T., Wu R.Y., Geissman T. A., 1977.** Structure antimicrobial activity relationship among the sesquiterpenes lactones and related compounds. *Phytochemistry*. **16**: 1177.
- Leitch, A.R., 2000.** Higher levels of chromatin in the interphase nucleus of cycling and differentiated cells. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 138-152.
- Lespinasse R., Martel E., Peigne M. T., Sarr A., 1993.** Hétérochromatine, chromosomes B : Implication des formes sauvages du mil sur l'utilisation des ressources génétiques Université Paris-Sud. 91405 Orsay Cedex.
- Macoura G., 2005.** Caractérisation de deux anneaux dérivés du chromosomes 22 découverts en période prénatale a l'aide de techniques de cytogénétique et de génétique moléculaire . Thèse de doctorat Université de Laval Québec. Pp:13.
- Marks G. E., 1975.** The Giemsa staining. Centromers of *Nigella damascene*. *J. Cell. Sg.***18**: 19-25
- Matsui S., 1974.** Structural proteins associated with ribosomal cistrons in *Xenopus laevis* chromosomes. *Exp. Cell Res.* **88**: 88-94
- Moyzis R., 1991.** Le télomère humain. *la Science.* **168** : 82-89.
- Muravenko O. V., Amosova A.V., Samatadez T.E., Semenova O. ,2004.** Chromosome localization of 5S and 45S ribosomal DNA in the genome of *Linum* L species of the section *linum* ( syn *Protolinum* and *Adenolinum* ) *Russian J. Genet* **40**: 193- 196
- Oliver G.L., Posse F., Martinez-zapater J.M., Enrtquez A.M., Ruiz-Rejon M., 1982.** B chromosomes and El isozyme activity in mosaic bulbs or *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosoma* **85** : 399-403.
- Quezel P., Santa S., 1962.** Nouvelle Flore de l'Algérie des régions désertiques méridionales. CNRS. Tome II. Pp: 1027-1028.

- Raina S.N., Mukai Y., Goel S., Jain A., 2001.** Physical mapping of 18s 5,8s 26s ribosomal RNA gene families in three important vetches ( *Vicia* species) and their allied taxa constituting three species complex .Theor. Appl. Genet. **103**: 839-845.
- Rossi A.R., Gornung E., 2005.** Cytogenetic analysis of three Italian populations *Coregonus lavaretus* (Pisces, Salmoniformes) with chromosmmals localization of major and minor ribosomal genes and telomeric repeats. Hereditas **142**: 15-21.
- Ruiz-rejon M., Posse F., Oliver J. L., 1980.** The B chromosome system of *Scillia autumnalis* ( Liliaceae ): effect at the isozyme level. chromosoma. **79**: 341-348.
- Schlegel R., Gill B. S., 1984.** N banding analysis of rye chromosomes and the relationship between N banded and C banded heterochromatin Can . J. Genet . Cytol . **22**: 765-769
- Schmid M., Guttenbach M., 1988.** Evolutionary diversity of reverse ( R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. Chromosoma. **97**: 101-114.
- Shoeb M., Jaspars M., MacManus M.S., Runner R.T., Satyajit D.S., 2004.** Epoxy lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* ( Asteraceae ). Biochemical Systematics and Ecology. **32**: 1201-1204.
- Siljak-Yakovlev S., 1986.** Etude cytogénétique et palynologique de *Compositae* endémiques ou relique de la flore yougoslave .Thèse de doctorat d'état .Université de paris Sud. Pp: 85-90-176.
- Siljak-Yakovelev S., Cartier D., 1986.** Heterochromatine patterns in some taxa of *crepis pramoresa* complex Caryologia. **39**: 27- 32.
- Siljak-yakovlev S., Cerbah M., Coulaud J., Stoian V., Brown S.C., Jelenic S., Papes D., 2002.** Nuclear DNA content , base composition heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. Theor. Appl. Genet. **104**: 505- 512.

- Sone T., Fujisawa M., Takenaka S., Yamaoka S., Sakaida M., Nishiyama R., Yamato K.T., Ohmido N., Fukui K., Fukuzawa H., Ohyama K., 1999.** Bryophytes 5S rDNA repeat units after divergence from higher plants. *Pl. Molec. Biol.* **41**: 679-685.
- Stebbins., 1971.** Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold. London. P: 216.
- Susanna A., Garcia-Jacas N., Soltis D.E., Soltis P. S., 1995.** Phylogeny of *Cheirolophus* ( Asteraceae : Cardueae-Centaureinae ) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Syst. Evol.* **214**: 147-160.
- Taketa, S., Harrison, G. E., Heslop-Harrison, J. S., 1999.** Comparative physical mapping of the 5S and 18S-25S rDNA in nine wild *Hordeum* species and cytotypes. *Theor. Appl. Genet.* **98**: 1-9.
- Tesevic V., 2007.** Quantitative analysis of sesquiterpene lactone cnicin in seven *Centaurea* species wild-growing in Serbia and Montenegro using <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Serb. Chem. Soc.* **72**: 1275-1280.
- Torrell M., Cerbah M., Siljak-Ykovelev S., Valles J., 2003.** Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* L (Asteraceae Anthemideae ): fluorochrome binding and fluorescent in situ hybridization. I. subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Pl. Syst. Evol.* **1239**: 141-153.
- Trivers R., Burt A., Palestis B. G., 2004.** B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome.* **47**: 1.
- Vilatersana R., Susanna A., Garcia-Jacas N., Garnatje T., 2000.** Generic delimitation and phylogeny of the *Carduncellus-Carthamus* complex ( Astraceae ) based on ITS sequences. *Plant Systematics and Evolution.* **221**: 89- 101.
- Viturii R., Colomba M.S., Pirrone A.M., Mandrioli M., 2002.** rDNA (18S- 28S and 5S) colocalisation and linkage between ribosomal genes and TTAGGG telomeric sequences in the earthworm *Octodrilus*

*complanatus* revealed by single and double-color FISH . J. Heridity. **93**: 279 -282.

**Yayli N., Baltaci C., Gok Y, Aydin O., 2004.** Sesquiterpène lactones from *Centaurea helenioides* Boiss . TUBITAK : 229- 233.

**Yesilada E., Gurbuz I., Bedir E., Tateli I., Khan I. A., 2004.** Isolation of anti-ulcerogenic sesquiterpenes lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *Solstitialis* through bioassay-guided fractionation procedures in rats. Journal of Ethnopharmacology. **95**: 213-219.

**Wagenitz, G., 1955.** Pollen morphology und Systematik in der Gattung *Centaurea* L. Flora **142**: 213-279.

**Wagenitz, G., 1975.** *Centaurea* L. Pp: 465-585.

**Wagenitz, G. H., Hellwig F.H., 1996.** Evolution of characteres and phylogeny of the *Centaureinae*. In : **Hind D.J.N., Beentje H. G., 1994.** Compositae : Systematics. Proceedings of the international Compositae Conference , Kew, Royal Botanical Gardens Kew pp. 491- 510. **voir sa**

**Wagenitz, G. H., Hellwig F.H., 2000.** The genus *Psephellus* Cass. (Compositae, Cardueae) revisited with abroadened concept. **30**: 29-44.

**Zurita, F., Jimenez, R., Burgos, M., Diaz 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. J. Cell Sci. **111**: 1433



# Annexe

## Annexe

### Préparations des tampon et des solutions utilisées

#### 1-Tampon citrate 0,01 M

Solution mère: 30 ml tri-sodium citrate (0,8823g dans H<sub>2</sub>O distillée ) + 20ml d'acide citrique (0,42028g dans d'H<sub>2</sub>O) .

Prendre 5 ml compléter à 50 ml d'H<sub>2</sub>O.

#### 2-Solution enzymatique 2%

Dans le tampon citrate 0,05 M	pH= 4,5	10ml
Cellulase R10	.....	0,4
Pectolyase Y23	.....	0,1ml
Hémicellulase sigma	.....	0,4g

#### 3-Préparation du tampon Mc Ilvain

Solution mère : 0,21g acide acétique dans 10 g H<sub>2</sub>O ..... (A)

178 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , 2H<sub>2</sub>O ..... (B)

Pour une solution Mc Ilvain pH= 7 : 43,6 ml de B + 65ml de A +H<sub>2</sub>O distillé = 100 ml au total .

#### 4-Préparation de la chromomycine A<sub>3</sub>

- La chromomycine est une poudre jaune très toxique a préparer 1 jours à l'avance dans du tampon Mc Ilvain pH= 7 + 10mM de MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O

- On prépare 2mg de CM<sub>3</sub> pour 10ml de solution .

#### 5-Préparation de la baryte oxyde de barium Ba(OH)<sub>2</sub>

11,68g de Oxyde de barium dans 200ml d'eau distillée

### **6-Tampon phosphate**

Pour une solution de 200ml à pH=6,8

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,34g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1,38g
Giemsa .....	8ml

### **7- Tampon ( Sorensen) 2xSSC**

Pour une solution de 1litre à pH=7

NaCl .....	17,5 g
Trisodium citrate.....	8,83g

### **8- L'acéto-orceine**

#### **- Solution mère d'orceine (solution de coloration )**

Dissoudre par ébullition ménagée 2,2g d'orceine (GURR) dans 100 ml d'acide acétique glaciale . laisser refroidir , agiter et filtrer

#### **- solution standard à 1%**

la dilution se fait au moment de l'emploi , 4,5ml de solution mère , 55ml d'eau distillée.

### **9- 8hydroxy quinoline**

0,03g / 100ml pendant 4h à 16 c° , au toute la nuit au frigo

## الملخص

في هذه الدراسة التي اعتمدت أساسا على إظهار خصائص الصبغيات لـ *Centaurea nicaeensis* كذلك معرفة تنظيمته الوراثة تمكنا من الحصول على معلومات أساسية وذلك باستعمال عدة طرق في التلوين .

طريقة التلوين بالسيثو اورسيين (céto-orceine) مكنتنا من معرفة المجموعة الصبغية لـ *Centaurea nicaeensis* كذلك إنشاء النمط النووي الذي يشتمل على ثلاثة أنواع من الصبغيات : 5 أزواج métacentrique , 4 أزواج submétacentrique من بينها 3 أزواج تحمل قسيم تابع و زوج subtélocentrique .

طريقة التلوين بالقيمزا اثبت وجود نوعين من الكروماتين غير المتجانس التركيبي , نوع يوجد في مراكز الصبغيات ونوع يوجد في المناطق النهائية لصبغيات , كذلك بين هذا التلوين وجود صبغيين زائدين (B) .

التلوين بالكروموميسين ( chromomycine A<sub>3</sub> ) سمح لنا بالكشف عن وجود الكروماتين الغير متجانس الغني بالقواعد GC في جميع صبغيات الصنف المدروس والمتمركز بصفة خاصة في نهايات الصبغيات .

التلوين بنترات الفضة سمح لنا بإظهار عدد النوويات والذي يتغير ما بين 3 إلى 5 في كل نواة .

## الكلمات المفتاحية :

الكروماتين الغير متجانس , المعضونات النووية , الجينات الريبوزومية , التلوين بنترات الفضة , الكروماتين الغير متجانس الغني بالقواعد GC , الفليوروكروم (fluorochrome banding) , *Centaurea nicaeensis* .

## Summary

In this study which was mainly based on the characterization of mitotic chromosomes of the species *Centaurea nicaeensis* we have obtained basic information on the genome organization of the species through many cytogenetic techniques

Cytoorceine staining has permitted to identify the ploidy level of the species. Also to establish the karyotype which is characterized by the presence of three kinds of chromosomes : 5 metacentric pairs , 4 submetacentric pairs which three pairs posses satellites and one subtelomeric pair.

C binding staining has shown the presence of two kinds of heterochromatin, one kind confined to the centromeric areas and the other is associated with the satellites and telomeric areas . Also the presence of two B chromosomes has been detected by this technique .

The chromomycine A<sub>3</sub> staining has revealed the presence of heterochromatin rich in GC sequences in all the chromosomes of the species especially in telomeric areas .

Silver staining has permitted to detect a number of nucleous varied between 3 and 5 witch is more frequent

### **Key words :**

*Centaurea nicaeensis*, heterochromatin, cytoorceine chromomycine A<sub>3</sub> , genome , genes ribosomal, nucleolar organizer region, nucleolus .

## **Résumé:**

Dans cette étude qui procède à la caractérisation des chromosomes mitotiques de l'espèce *Centaurea nicaeensis*, nous avons pu avoir des données de base concernant l'organisation génomique de l'espèce par le biais de nombreuses techniques cytogénétiques.

La coloration par l'acéto-orceine nous a permis tout d'abord d'identifier le niveau de ploïdie de l'espèce étudiée. Ensuite d'établir le caryotype qui se caractérise par la présence de 3 types chromosomiques: 5 paires métacentriques, 4 paires submétacentriques dont 3 portent des satellites et une paire subtélocentrique.

La coloration différentielle au Giemsa a démontré l'existence de deux types d'hétérochromatine constitutive, un type est confiné aux régions centromérique et l'autre est associé aux satellites et aux télomères, aussi de détecter l'existence de deux chromosomes B.

La coloration à la chromomycine a révélé la présence d'hétérochromatine riche en bases GC dans tous les chromosomes de l'espèce, elle est localisée principalement dans les télomères.

La coloration au nitrate d'argent a permis de détecter un nombre de nucléoles variant de 1 à 5, 3 nucléoles par noyau étant le plus fréquent.

## **Mots clés :**

*Centaurea nicaeensis*, génome, hétérochromatine, chromosomes B, Coloration au nitrate d'argent, régions des organisateurs nucléolaires (NORs), hétérochromatine riche en séquences GC, nucléole.

Nom: **Nassar**

Prénom: **Meryem**

**Titre:** **Contribution à une étude cytogénétique de l'espèce  
*Centaurea nicaeensis* ALL**

**Diplôme:** Magistère ( Ecole doctorale biotechnologies végétales )

**Résumé :**

Dans cette étude qui procède à la caractérisation des chromosomes mitotiques de l'espèce *Centaurea nicaeensis*, nous avons pu avoir des données de base concernant l'organisation génomique de l'espèce par le biais de nombreuses techniques cytogénétiques.

La coloration par l'acéto-orceine nous a permis tout d'abord d' identifier le niveau de ploïdie de l'espèce étudiée. Ensuite d'établir le caryotype qui se caractérise par la présence de 3 types chromosomiques: 5 paires métacentriques, 4 paires submétacentriques dont 3 portent des satellites et une paire subtélocentrique.

La coloration différentielle au Giemsa a démontré l'existence de deux types d'hétérochromatine constitutive, un type est confié au régions centromérique et l'autre est associé aux satellites et aux télomères, aussi de détecter l'existence de deux chromosomes B.

La coloration à la chromomycine a révélé la présence d l'hétérochromatine riche en bases GC dans tous les chromosomes de l'espèce, elle est localisée principalement dans les télomères.

La coloration au nitrate d'argent a permis de détecter un nombre de nucléoles variant de 1 à 5, 3 nucléoles par noyau étant le plus fréquent.

**Mots clés :** *Centaurea nicaeensis*, génome, hétérochromatine, chromosomes B, Coloration au nitrate d'argent, régions organisateurs nucléolaires (NORs), hétérochromatine riche en séquences GC.

**Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales**  
**Département de biologie végétale et écologie**

Directeur de recherche Mme: **Nadra Khalfallah** professeur à l'université de Mentouri

**Membre du jury:**

**Mr. M. Bensari** (président) professeur à Université Mentouri Constantine.

**Mr. D. Khelifi** (examineur) professeur à Université Mentouri Constantine.

**Mr Mergham** (examineur) professeur à Université Mentouri Constantine.

