



République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université de Larbi Tébessi –Tébessa-



Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

فakولتة العلوم والعلوم الطبيعية والحيوية  
FACULTÉ DES SCIENCES EXACTES ET DE LA NATURE ET DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

Département : Biologie des êtres vivants

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

Domaine : Sciences de la nature et de la vie (SNV)

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biotechnologie des plantes médicinales

## Thème

Etude du polymorphisme biochimique  
du Genêt à balais.

Présenté par

**BENBOUCHAMA Amina**

**TATAR Soumia**

Devant le jury

Dr.MAALEM Souhail	M.C.A	Université de Tébessa	Président
Mr.FATMI Hindel	M.A.A	Université de Tébessa	Promoteur
Mme.MEHALAINE Souad	M.A.A	Université de Tébessa	Examinatrice

Date de soutenance : 31 Mai 2017

Note : .....

Mention : .....

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

# Remerciements

A travers ce mémoire on remercie DIEU qui nous a donné la volonté, la force et le courage pour réaliser ce modeste travail.

Nos profonds remerciements à notre encadrant monsieur **Fatmi Hindel MAA** pour l'aide qu'il nous a apporté, pour sa patience et son encouragement durant toute cette année.

Un grand merci aux membres de jury : **Madame Mehalaine Souad MAA** à l'université de Laarbi Tebessi-Tébessa- et **Docteur Maalem Souhail MCA** à l'université de Laarbi Tebessi-Tébessa- pour avoir accepté d'examiner et juger notre travail.

Nos remerciements vont également à :

\* Tous les enseignants de Biotechnologie des plantes médicinales qui ont participé à notre formation.

\* L'ensemble de personnels de la Bibliothèque de notre faculté pour l'aide qu'ils nous ont fournie.

# ***Dédicace***

## DÉDICACE

Après avoir remercie le tout puissant

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donnée la vie, qui à éclairé mon chemin, qui m'a soutenue dans mes études et qui s'est sacrifiée pour ma joie et ma réussite à ma mère « Sihem ».

Je tiens à honorer mon cher père « Lazhar » école de mon enfance qui a toujours été à mes coté pour m'aider, m'encourager et surtout me protéger.

Aucune dédicace ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond amour que je vous porte. Que Dieu vous préserve et vous prête longue vie de joie.

A

Mes chers frères Ghani et Hachouma.

A

Ma chère sœur Maroua.

A

Mes cher(e)s ami(e)s.

A

Toute ma famille.

A

Tous mes collègues de promotion : Master BTM 2016 / 2017.

Je remercie tous qui m'ont aidé de près et de loin à réussir ce travail.

En fin à tous mes enseignants et particulièrement mon encadreur Mr Fatmi Hindel que je remercie infiniment pour son temps, ses conseils et la confiance qu'il m'a témoignée.

**Amina**

## *DEDICACES*

*C'est avec un très grand honneur que je dédie ce modeste travail aux deux personnes qui se sont sacrifiées pour que je grandisse avec un savoir faire et qui m'ont appris a ne jamais Baisser les bras , et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui, sans lesquels je n'y serais jamais parvenue et qui je ne remerciais jamais assez.*

***\*\*\*A mon cher père HAFNAOUI \*\*\****

*pour ces conseils ses encouragements aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai toujours eu pour toi, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être*

*Ce travail et le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

***\*\*\*A ma très chère mère MOUNI\*\*\****

*honorée, aimable, tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du développement qui n'a pas lésé de m'encourager et de prier pour moi*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites, je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour*

*Puisse dieu, tout puissant vous préserver et vous accorder la santé, la longue vie et le bonheur.*

*Je dédie aussi cette Modeste réalisation à : .*

*À toute ma famille*

*A tous mes amis*

*A Tous mes collègues de promotion : Master BTPM 2016 / 2017*

**Soumia**

## Résumé

Les critères morpho physiologiques du genêt à balais ne suffisent plus pour l'identification variétale. C'est la raison pour la quelle la préservation et l'évaluation de la diversité génétique est une étape indispensable en amélioration des plantes. Elle peut être appréciée à l'aide de marqueurs biochimiques.

Cette étude à pour objectif l'analyse préliminaire de la variabilité génétique de 15 variétés de genet au moyen de l'électrophorèse des protéines totales.

Le diagramme type variétal et les electrophorégrammes présentent des nettes différences à la fois qualitatives et quantitatives.

Le polymorphisme de ses protéines est utilisé comme empreinte génétique pour évaluer la diversité de cette collection.

**Mots clés :** Genêt à balais, SDS-PAGE, polymorphisme, protéines et empreinte génétique.

## **Abstract**

The Analysis of morphophysiological characteristics of Broom is not a sufficient method for varieties identification. That's way, the preservation and the evaluation of the genetic diversity is an essential step of plants amelioration. It can be appreciated with the help of biochemical markers.

This study aimed a preliminary analysis of the genetic variability of 15 varieties of Broom by the means of polyacrylamide gel electrophoresis of total proteins.

The Varietal type diagrams and electrophoregramms showed a clear qualitative and quantitative differences. The polymorphism of these proteins is used as a genetic fingerprint to evaluated the diversity of this collection.

**Key-Words :** Broom type, SDS-PAGE, Polymorphism, proteins, genetic fingerprint.

## المخلص

إن الصفات المرفوفيزيولوجية لنبات الوزال لم تعد كافية للتمييز بين الأصناف التابعة لهذا النوع، لهذا الغرض فإن المحافظة و تقييم التنوع الوراثي يعتبر مرحلة مهمة في تحسين النباتات و يمكن تقييمها عن طريق المؤشرات البيوكيميائية. تهدف هذه الدراسة الى القيام بتحليل أولي للتنوع الوراثي ل 15 صنف من الوزال، و هذا بإستعمال تقنية الهجرة الكهربائية للبروتينات الكلية .

إن كل من النظام المظهري والإكتروفرغرام أعطيا إختلافات كبيرة من حيث الكمية والنوعية.

يستعمل هذا التعدد الشكلي و هذا التباين كبصمة وراثية لتقييم التنوع لهذه المجموعة من العينات.

**الكلمات المفتاحية:** الوزال، هجرة كهربائية، التعدد الشكلي، بروتينات، بصمة وراثية.

## Liste des tableaux

<b>Tableau N°</b>	<b>Titre</b>	<b>page</b>
<b>01</b>	variétés de Genêt à balai étudiées.	<b>29</b>
<b>02</b>	Clé de détermination des variétés de Genêt à balais représentées dans la figure (09)	<b>32</b>
<b>03</b>	Indices de ressemblances entre les diagrammes électrophoretiques des protéines totales en %.	<b>34</b>

## Liste des Figures

<b>Figures N°</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>01</b>	Carte de répartition de la famille des Fabacées.	07
<b>02</b>	Genêt à balais.	13
<b>03</b>	Fleur du Genêt à balais sous différents angles.	14
<b>04</b>		14
<b>05</b>		14
<b>06</b>	Fruit mature (gousse fermée) du Genêt à balais.	15
<b>07</b>	Fruit mature (gousse ouverte) du genêt à balais.	15
<b>08</b>	Profil électrophoretique des protéines totales des variétés de genêt à balais.	22
<b>09</b>	Dendrogramme de similarités des protéines totales.	28
<b>10</b>	Extraction des protéines totales selon la technique de <b>(Laemmli, 1970)</b> .	35

# Liste des abréviations

**APS:** Ammonium persulfate.

**HMW :** High molecular weight.

**INRA :** Institut National de la recherche agronomique (Algérie).

**IRS:** Indice relatif de similarité.

**IAS :** indice absolu de référence.

**KDa:** Kilo Dalton.

**Kcal:** kilo calorie.

**Mbr :** Mobilité, mesurée au mm près, de la bande de référence.

**Mr:** Mobilité relative.

**Ph:** pression d'hydrogène.

**P/V :** Poids sur volume.

**QTL :** Quantitative trait loci.

**RAPD:** Random Amplification of Polymorphic DNA.

**RFLP:** Restriction fragment length polymorphism.

**SDS-PAGE:** Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide-Gel-Electrophoresis.

**TCA :** Acide trichloracétique.

**TEMED :** Tetraméthyl-éthylène diamine.

# Sommaire

<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>Remerciement</b>	
<b>Dédicace</b>	
<b>Résumé</b>	
<b>Abstract</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des figures</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Introduction</b>	01
<b>1.Généralité</b>	04
<b>2.Historique</b>	04
<b>3. les légumineuses</b>	05
<b>3.1.Classification botanique des légumineuses</b>	05
<b>3.2.Description botanique des légumineuses</b>	06
<b>3.3. Répartition géographique des Fabacées</b>	07
<b>3.4 Rôle des légumineuses spontanées en Méditerranée</b>	08
<b>4.L'utilisation des légumineuses</b>	08
<b>4.1.L'alimentation humaine</b>	08
<b>4.2.L'alimentation animale : Fourrages et granulés</b>	08
<b>4.3.L'utilisation économique et importance</b>	09
<b>4.4.L'utilisation thérapeutique des légumineuses</b>	09
<b>Chapitre II : Genêt à balais</b>	10
<b>1.Historique</b>	11
<b>2. Genêt à balais</b>	11
<b>3. Description botanique</b>	13
<b>4. Répartition géographique</b>	16
<b>5.Composition chimique du genêt à balais</b>	16
<b>6. Propriétés thérapeutiques et médicinales du Genêt à balais</b>	16
<b>6.1. Bienfaits du Genêt à balai sur la santé</b>	17
<b>6. 2. Contre-indications du Genêt à balai sur la santé</b>	17
<b>6.3. D'autres utilisations</b>	17
<b>Chapitre III : Matériels et méthodes</b>	18
<b>1. Matériel végétal</b>	19
<b>2.Méthode d'étude</b>	19
<b>2.1. Préparations des échantillons</b>	19
<b>2.2. Extraction des protéines totales</b>	19
<b>3. Technique d'électrophorèse</b>	21
<b>3.1. Principe de l'électrophorèse</b>	21
<b>3.2. Préparation des gels</b>	22
<b>a. Le gel de séparation (running gel) à Ph 8,8</b>	22
<b>b. Le gel de concentration (stacking gel) à pH 6,8</b>	22
<b>3.2.1 Tampon d'électrophorèse</b>	23
<b>3.2.2 Conditions de migration</b>	23

# Sommaire

<b>3.2.3 Fixation, coloration et décoloration</b>	23
<b>3.2.3 Fixation, coloration et décoloration</b>	23
<b>4. Lecture des diagrammes</b>	23
<b>5. Etude statistique</b>	23
<b>Chapitre IV : Résultats et discussions</b>	24
<b>1. Etude de la diversité des protéines totales</b>	25
<b>2. Choix de la région de lecture</b>	28
<b>3. Etablissement du diagramme type variétal</b>	29
<b>3.1 Diagramme observé chez les variétés étudiées</b>	31
<b>3.2 Calcul de l'indice de Similarité (IRS)</b>	31
<b>4. Exploitation des résultats</b>	33
<b>Conclusion</b>	36
<b>Les annexes</b>	38
<b>Références bibliographiques</b>	45

# ***Introduction***

# Introduction

Dès les débuts de la domestication, l'homme s'est intéressé à la variabilité des végétaux.

La conservation de la diversité génétique passe par son évaluation et par les méthodes qui vont la traduire le plus fidèlement possible. Parmi ces outils : les marqueurs moléculaires qui sont devenus les indicateurs de variabilité les plus utilisés depuis deux décennies.

Le genre *Genista* fait partie de la famille des Fabacées, riche en protéines, comme toutes les légumineuses, il présente des intérêts importants notamment en alimentation animale et comme régénérateur du sol (fixateur d'azote).

Les variétés du genêt sont nombreuses, et la collecte des résultats est souvent coûteuse et demande beaucoup de temps. Les critères morpho physiologiques ne suffisent plus pour la caractérisation et l'identification variétale c'est la raison pour laquelle il est impératif d'utiliser les techniques biochimiques (L'électrophorèse).

Ce travail concerne le genêt à balais, ou nous avons étudié l'évaluation et l'identification d'une collection de 15 variétés.

Nous nous sommes intéressés, dans cette étude, à l'analyse du polymorphisme protéique dans le but de mieux estimer la variabilité génétique inter variétal.

Pour ces analyses, nous avons utilisé la technique d'électrophorèse mono dimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-page), cette technique est de plus en plus utilisée pour identifier des variétés et résoudre certains problèmes taxonomiques.

L'objectif de ce travail est d'analyser chez 15 variétés de genêt les profils protéiques (protéines totales) et d'évaluer leur variabilité au sein des variétés.

Les données bibliographiques sont présentées dans le premier chapitre de ce mémoire avec une présentation générale du genêt à balais, ses différentes caractéristiques ainsi que ses intérêts, tout en mettant l'accent sur l'utilisation du polymorphisme des protéines comme empreinte génétique et son importance dans l'identification variétale.

Le deuxième chapitre donne les résultats expérimentaux obtenus, leur description, exploitation et discussion.

Une conclusion générale et quelque perspective sont enfin données.

# ***Les légumineuses***

## 1. Généralité

La famille des Légumineuses est une des plus importantes parmi les dicotylédones. C'est la famille végétale qui fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales.

Cette famille des légumineuses est sur le plan agricole importante et est spontanée ou cultivée dans le monde entier à des fins diverses, notamment la production de nourriture et de fourrage, comme les engrais verts, ou l'assurance du sol pour réduire l'érosion. (**Cronk et al, 2006**).

Les Légumineuses, avec quelque 13 500 espèces réparties en 650 genres environ, sont, après les Composées et les Orchidées, une des plus grandes familles d'Angiospermes. La plupart sont des plantes ligneuses des régions tropicales (acacias, flamboyants) ou méditerranéennes (caroubiers, « mimosas ») ; dans les régions tempérées, prédominent les Légumineuses herbacées à valeur alimentaire (pois, haricots, fèves) ou fourragère (luzerne, trèfles). De l'ordre des Fabales du clade des Fabidées puis des Rosidées.

Elles peuvent être herbacées, arbustives, arborescentes et même lianoïdes.

## 2. Historique

L'origine de l'agriculture date de plus de 10 000 ans. L'alimentation des populations néolithiques reposait principalement sur la culture des céréales et des légumineuses (**Albala K B, 2007**). En Amérique du sud et en Amérique centrale, l'alimentation des civilisations précolombiennes mayas, incas et aztèques était à base de maïs et de haricots secs. En Amérique du Nord, le maïs, les courges et les haricots secs constituaient l'alimentation de base des Amérindiens. Séchées et adéquatement entreposées, les légumineuses devenaient une sécurité en période de pénurie alimentaire. Elles possédaient aussi l'avantage de se cultiver facilement.

Bien que les légumineuses soient appréciées par plusieurs peuples, elles demeurent historiquement associées à la pauvreté. Dans le passé, lorsque les protéines de source animale étaient disponibles aux mieux nantis, les légumineuses étaient reléguées aux paysans. Les légumineuses étaient considérées comme des aliments bon marché et une manière plutôt facile de satisfaire ses besoins nutritionnels. Encore maintenant, dans les pays dont la population est dense comme la Chine, l'Inde ou le Mexique, les légumineuses occupent une place de choix dans l'alimentation. À l'inverse, dans les pays industrialisés on a attribué le nom dépréciatif de « viande des pauvres » aux légumineuses et leur consommation est

nettement inférieure à celle des pays où la population est dense. Malgré cela, les légumineuses tendent à augmenter leur popularité depuis qu'on leur reconnaît des avantages sur la santé (Geil et Anderson, 1994).

### 3. Les légumineuses

Les légumineuses sont des végétaux supérieurs qui appartiennent à la famille des Leguminosae (ou Fabaceae), de l'ordre des Fabales. Elles forment l'une des plus grandes familles de plantes (Broughton, 1983) et se divisent en trois sous-familles: les Papilionacées, les Mimosacées et les Césalpiniacées. Les espèces de la sous-famille Papilionacées sont présentes dans le monde entier (Rachie, 1979) alors que les deux autres sous-familles sont principalement constituées d'espèces ligneuses de régions tropicales ou subtropicales. La famille des légumineuses est très diversifiée dans les différentes régions du globe, avec des sites spécifiques pour certaines espèces, C'est une grande famille constituée de plantes ligneuses (zones tropicales) et herbacées (zones tempérées) avec quelques arbres et arbustes qui regroupent environ 12 000 espèces réparties en 400 à 500 genres (Bhattacharyya et Johri, 1998).

En Algérie, les fabacées ligneuses occupent une place importante et jouent un rôle important dans l'équilibre du milieu naturel et la lutte contre la désertification (Djabeur K H et al, 2007).

#### 3.1 Classification botanique des légumineuses

La famille des Fabacées est formée de 3 sous-familles et leurs genres (Spichiger, 2004) :

- **Césalpinioïdées (fleur en pseudo-papillon)** : Afzelia, Bauhinia, Caesalpinia, Cassia, Ceratonia, Cercis, Delonix, Gleditsia, Parkinsonia, Senna.

- **Mimosoïdées (fleur régulière)** : Acacia, Albizia, Anadenanthera, Entada, Inga, Mimosa, Paraserianthes, Pithecellobium.

- **Faboïdées ou Papilionoïdées (fleur typique en papillon)** : Abrus, Amorpha, Anagyris, Anthyllis, Apios, Arachis, Argyrolobium, Astracantha, Astragalus, Biserrula, Bituminaria, Calicotome, Caragana, Chamaecytisus, Cicer, Colutea, Coronilla, Cullen, Cytisophyllum, Cytisus, Dorycnopsis, Dorycnium, Echinospartum, Erinacea, Galega, Genista, Glycine, Glycyrrhiza, Hedysarum, Hippocrepis, Hosackia, Hymenocarpus, Indigofera, Laburnum, Lathyrus, Lens, Lespedeza, Lotus, Lupinus, Medicago, Melilotus, Onobrychis, Ononis,

Ornithopus, Oxytropis, Phaseolus, Pisum, Retama, Robinia, Scorpiurus, Securigera, Sesbania, Sophora, Spartium, Trifolium, Trigonella, Tripodion, Ulex, Vicia, Vigna, Wisteria.

## 3.2 Description botanique des légumineuses

La famille des fabacées est une famille des plantes dicotylédones, elles possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun, sont des plantes herbacées, arbustes, arbres ou plantes grimpantes à lianes volubiles ou à vrilles, à métabolisme azoté élevé et acides aminés inhabituels, souvent nodules racinaires contenant des bactéries fixatrices d'azote (rhizobium) (Judd et al, 2002).

Les Légumineuses sont définies par des caractères essentiels :

**Le réceptacle :** (extrémité du pédoncule floral) est élargi en forme de cône, de plateau, de cupule, d'urne.

**Le gynécée :** (pistil), libre et supère, est, sauf exceptions, réduit à un seul carpelle dont les bords sont suturés dorsalement.

Ce caractère suffit à conférer à :

**La fleur** présente une symétrie bilatérale (zygomorphie) ; chez la plupart des Légumineuses, cette zygomorphie est étendue à l'ensemble de la fleur (calice, corolle, androcée) suivant des modalités facilement reconnaissables, propres à la famille.

**La graine**, contient l'albumen qui est extrêmement réduit ou même, très généralement, fait défaut

**Les racines :** portent des galles noduleuses produites par une bactérie (Rhizobium) utilisant l'azote libre de l'air pour la synthèse d'acides aminés et pour qu'elles puissent vivre et se multiplier.

D'autres caractères, sans être aussi constants, sont extrêmement répandus dans la famille et contribuent à lui donner sa physionomie.

**Le fruit :** est une gousse (ou légume), c'est-à-dire un fruit sec s'ouvrant par deux fentes opposées, dont l'une correspond à la suture dorsale et l'autre à la ligne médiane du carpelle unique ; dans quelques genres, la gousse, sèche, ligneuse, ou charnue, ne s'ouvre pas.

**Les feuilles :** sont généralement composées pennées ou bipennées ; dans quelques genres, la feuille est simple et entière par avortement des folioles latérales (seules subsistent la foliole terminale ou deux folioles terminales concrescentes ou par avortement des pennes et du rachis (phyllodie). à la base des pétioles et sont le plus souvent composées.

En pratique, reconnaître qu'une plante est une Légumineuse est toujours facile : même si l'un des caractères essentiels ou subsidiaires fait défaut, les autres caractères suffisent pleinement à l'identification. (Mangenot G, ?)

### 3.3.Répartition géographique des Fabacées :

Les Fabacées constituent la troisième famille des angiospermes de par le nombre de ses représentants. Elles ont une distribution quasi cosmopolite et se trouvent dans les zones tropicales, subtropicales ou tempérées (figure 1). Cette famille s'accommode d'une très large gamme d'habitats, et inclut autant de plantes herbacées, aquatiques ou xérophytes, que des arbustes, des arbres ou des plantes grimpantes à lianes volubile vrilles (Heywood V H, 1996).



**Figure 01 :** Carte de répartition géographique de la famille des Fabacées  
(Heywood V H, 1996)

### 3.4. Rôle des légumineuses spontanées en Méditerranée

Les plantes de la famille des légumineuses sont une composante principale de tous les habitats du bassin méditerranéen. C'est là en effet où il y a la plus grande concentration en nombre d'espèces de légumineuses. On compte 91 genres et 1956 espèces. Ainsi, la Méditerranée est le centre de diversité pour les espèces de légumineuses (**Maxted et Bennett, 2001a**), Les légumineuses spontanées jouent plusieurs rôles (**Lemordant et al, 1977 ; Boulos, 1983 ; Le Floch, 1983 ; Boukef, 1986 ; Wickens et al, 1996**). Elles jouent un rôle dans les usages médicinaux traditionnels des populations rurales (*Ceratonia siliqua*), dans l'alimentation humaine (*Ceratonia siliqua, Lathyrus ochrus, Vicia sativa, etc.*). Leur rôle majeur est dans le fourrage. Cependant certaines de ces espèces peuvent présenter une toxicité reconnue ou présumée (*Anthyllis henoniana, Cystisus villosus, etc.*) du moins durant une période de leur cycle de développement (**Maxted et Bennett 2001b**), présentent dans leur revue sur les légumineuses en Méditerranée, une liste des espèces ayant une importance économique (fourragère ou alimentaire pour l'homme) (**Lemordant et al, 1977**).

## 4. L'utilisation des légumineuses

### 4.1. L'alimentation humaine

Les légumineuses présentent plusieurs atouts, en tant que source de protéines végétales pour l'alimentation humaine avec l'évolution des régimes alimentaires incorporant, la plupart des légumineuses à graine sont destinées presque exclusivement à la consommation humaine, sont utilisées dans la préparation de quelque recette de cuisine et la fabrication de produits de boulangerie ou de nourriture pour bébés (**Voisin A.S. et al, 2013**).

Ces plantes se cultivent facilement et donnent des graines qui sont conservent bien en hiver lorsqu'elles sont sèches. Mais dans la plupart des pays européens, la consommation de ces légumineuses a beaucoup chuté (**Jean duval, 2008**).

### 4.2. L'alimentation animale ( Fourrages et granulés)

Dans les prairies, on trouve de l'herbe mais aussi des plantes riches en protéines comme les trèfles, le sainfoin, la vesce. Toutes ces plantes sont très importantes pour l'alimentation animale mais elles ne sont pas suffisantes pour les élevages actuels.

Les légumineuses étaient principalement cultivées pour la production de fourrages riches en protéines. Ces cultures étaient insérées dans les systèmes de polyculture-élevage en raison de leur rôle agronomique vis-à-vis de l'azote dans la rotation, la surface de cultures pures des légumineuses fourragères est le résultat de la révolution fourragère (**Voisin A.S. et al, 2013**).

### 4.3. L'utilisation économiques et importance

La vaste sous famille des fabacées regroupe de nombreuses plantes utiles recevant des applications industrielles, alimentaires ou encore ornementales (**Mitaine O et al, 2003**)

L'intérêt industriel résulte du fait que beaucoup d'espèces de cette famille fournissent des produits industriels tels que le *Soja* qui est utilisé à grande échelle dans l'élevage industriel, les *Derris* et les *Lonchocarpus* qui donnent les roténoïdes insecticides, utilisés contre les parasites des animaux domestiques, des habitations et des végétaux (**Linuma M et al, 1993**).

D'autres espèces produisent des substances colorantes, et d'autres sont utilisées en parfumerie comme *Pterocarpus santalinus*. Certaines espèces sont ornementales tels que le Robinier, faux Acacia, Cytise, Glycine, ... etc (**Antonio G et al, 1997**)

### 4.4. L'utilisation thérapeutique des légumineuses

L'intérêt pharmaceutique des fabacées est à son tour très important vu le nombre élevé d'espèces figurant dans les pharmacopées et donnant de nombreux produits utilisables en thérapeutique . Beaucoup d'espèces de fabacées ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en, médecine traditionnelle, ce sont des espèces de très grande importance alimentaire et ayant de leurs propriétés antidiurétiques, stimulantes, diététiques et action antihémorragique au niveau des capillaires (**Mekkiou R, 2005**).

Des études épidémiologiques examinées la relation entre la consommation de légumineuses (haricots Pinto, haricots rouges, doliques à œil noir, arachides et beurre d'arachides) et la diminution des facteurs de risque nutritionnels des maladies cardiovasculaires, Toutefois, les mécanismes biologiques exacts expliquant l'influence des fibres alimentaires sur la santé cardiovasculaire ne sont pas entièrement compris (**King DE, 2005**).

**Chapitre *II***  
***Genêt à balais***

## 1. Historique

Genêt de grande taille, le genêt à balais (*Cytisus scoparius* Link ou *Sarothamnus scoparius* Wimmer ; légumineuses), que la classification botanique actuelle associe aux cytises, doit figurer parmi les remèdes diurétiques de base de la pharmacopée indigène. Inconnu des Anciens (il ne croît pas en Grèce et manque dans la plus grande partie de la région méditerranéenne), longtemps confondu avec d'autres « genêts », il figure cependant chez quelques auteurs de la Renaissance avec l'essentiel de ses indications actuelles. (**Rambert Dodoens 1552**), par exemple, conseille l'infusion de ses jeunes rameaux « pour faire passer les eaux et les urines des hydropiques ». En 1701, le maréchal de Saxe fut débarrassé d'une hydropisie rebelle à tout traitement en prenant le vin de cendres de genêt que M<sup>me</sup> Fouquet, mère du surintendant des Finances de Louis XIV, avait formulé en 1678 dans son *Recueil de remèdes faciles et domestiques*. Depuis 1852, année où furent découverts ses deux principes actifs les plus importants, le genêt à balais a été l'objet de nombreuses analyses et expérimentations. (**Lieutaghi, ?**)

## 2. Genêt à balais

### -Ethymologie:

Sarothamus : ce mot est d'origine grecque, « saros » (balai) et « thamos » « buisson ».

### - Noms communs :

Genêt à balais, cytise à balais, genettier, grand genêt, juniesse, sarothamne, spartier à balais, sparte, genêt commun, genêt d'or. (**Anonyme2**)

### - Nom scientifique :

*Cytisus scoparius* (L.) (*Sarothamnus scoparius* L.) (**Wilhelm, 2013**)

### - Nom anglais :

Broom. . (**Anonyme2**)

### - Nom arabe :

الوزال

**- Famille :**

Fabacées (légumineuses, fabaceae). . (Anonyme2)

**- Cycle :**

Plante vivace qui peut vivre 12 ans. (Anonyme 1)

**-Toxicité :**

Toxique à forte dose. (Anonyme 1)

**- Mode de multiplication :**

Semis au printemps, il est aléatoire, les graines peuvent mettre plusieurs années avant de germer.

Bouturage en juin, il est principalement par bouture. (Anonyme 3)

**- Exposition :**

Ensoleillée. (Anonyme 3)

**- Qualité du sol :**

Profond, peu fertile, peu humifère, sec, sablonneux, frais mais drainé. Le genêt tolère les sols calcaires et aussi les sols chargés en sels et apprécie les sols acides. (Anonyme 3)

**- Culinaire:**

Les bourgeons confits dans du vinaigre et du sel aiguisent l'appétit, on les appelle câpres allemands. Les fleurs décorent et relèvent les salades. (Anonyme 1)

**Classification :**

Règne	Plantae
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Rosidae
Ordre	Fabales
Famille	Fabaceae
Genre	Cytisus

Nom binominal : *Cytisus scoparius*  
(L. Link, 1822)

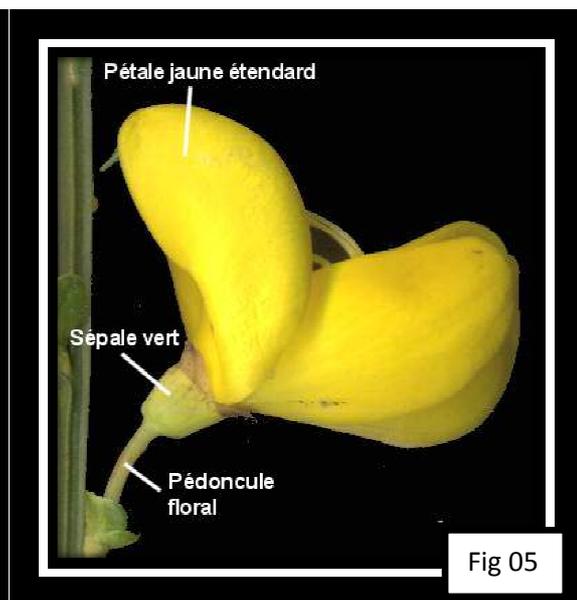
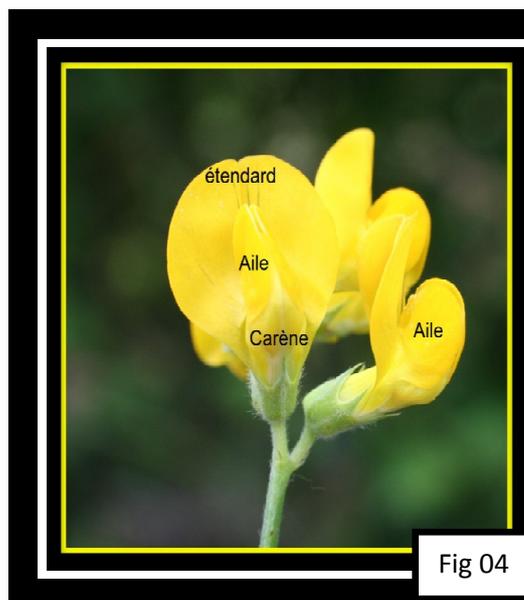
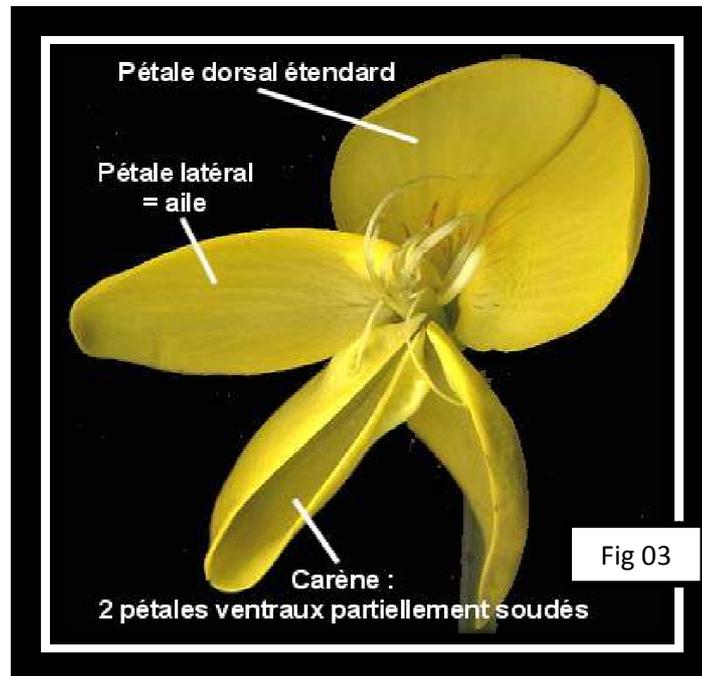
**3. Description botanique**

Arbrisseau (atteint 3m). Très rameux. Tiges vertes. Les plus jeunes souples à 5 angles ou peu aillées. Rameaux longs : feuilles alternes, à pétiole bref, lancéolées (jusqu'à 7mm) ; celles des rameaux courts en rosettes ; à la base ; sont semblable à celles des trèfles (3 folioles) ; jusqu'à 20 mm ; entièrement velues.



**Figure 02 : Genêt à balais. (Venette ,2015)**

Floraison : mai - juin ; Fleur jaune vif, hermaphrodites (jusqu'à 2,5 mm), par 1-2 sur rameaux courts. Entomogamie (pollinisation surtout par le bourdon).



Figures 03,04 ,05 : Fleur du Genêt à balais sous différents angles.

(Venette ,2015)

Fruit en Aout \_ Septembre : gousses (jusqu'à 5cm), ciliées, plates, noires a maturité.



**Figure06** : Fruit mature (gousse fermée) du Genêt à balais. (Venette ,2015)



**Figures 07** : Fruit mature (gousse ouverte) du Genêt à balais. (Venette ,2015)

Rameaux jadis, employés pour faire des balais .Graines récoltées et dispersées par des fourmis, car elles ont un appendice huileux (élaiosome). (Wilhelm E, 2003)

#### 4. Répartition géographique

Le genêt à balais est originaire du nord-ouest de l'Europe, il a été largement introduit sur d'autres continents. Il est considéré comme une plante invasive dans l'ouest des États-Unis et du Canada, en Inde, en Afrique du sud et en Océanie. Il pousse très bien sur sol siliceux et dans les zones déboisées. Sa grande rusticité (il résiste à des températures de  $-25^{\circ}\text{C}$ ) explique pourquoi il est très répandu. (Anonyme1)

#### 5. Composition chimique du Genêt à balais

Un hétéroside, la scoparine (ou scoparoside), matière colorante jaune présente seulement dans les fleurs, plusieurs alcaloïdes, le plus important étant la spartéine (qu'on retrouve chez le spartier), et de l'huile essentielle en faible quantité sont à l'origine des propriétés multiples du genêt à balais. La spartéine est tonocardiaque ; elle exerce une action légèrement curarisante sur les terminaisons des nerfs moteurs et paralysante sur le système nerveux central. Elle stimule les centres respiratoires et atténue la sensibilité à la douleur, ce qui a permis de l'employer comme adjuvant dans l'anesthésie générale. Elle a comme la scoparine une action diurétique. On attribue à des amines le pouvoir hypertenseur et vasoconstricteur de la plante, analogue à celui de l'adrénaline. (Lieutaghi, ?)

#### 6. Propriétés thérapeutiques et médicinales du Genêt à balais

De nos jours, le genêt à balai n'intéresse pas que les balayeurs, car l'industrie pharmaceutique en retire divers alcaloïdes fort précieux, dont le principal est la spartéine, substance cardiotonique remarquable, modératrice, régulatrice et protectrice du cœur, présente dans les tiges et les feuilles, il est donc indiqué pour le traitement de l'érythisme cardiaque, insuffisance cardiaque, trouble du rythme, hypotension, rétention hydrique. En outre, de nombreux auteurs ont prouvé les incontestables propriétés diurétiques de la fleur de genêt.

Sous son action, le volume des urines s'accroît singulièrement, permettant une importante élimination des chlorures.

Il est très utile contre la goutte, les rhumatismes, la protéinurie et l'œdème généralisé.

La spartéine agit comme ocytocique en augmentant la vigueur des contractions de l'utérus.

On emploie donc parfois le genêt à balai pendant les accouchements. Il diminue également les saignements qui en résultent.

Le genêt est très apprécié pour son action contre les morsures de serpents, ce n'est pas par hasard si, dans le Sahara, on recouvre les morsures de vipère avec des tiges de genêt pilées et bouillies. D'autres recherches ont prouvés que le genêt neutralisait les venins, ainsi que l'ont prouvés des recherches sur les venins de vipère et de cobra, en partant de l'observation faite par les bergers que les moutons ayant ingéré du genêt survivaient aux morsures de ces serpents.

### **6.1. Bienfaits du Genêt à balai sur la santé**

Éréthisme cardiaque, insuffisance cardiaque, trouble du rythme, hypotension, rétention hydrique, augmente le volume des urines, élimination des chlorures, la goutte, les rhumatismes, la protéinurie et l'œdème généralisé, les accouchements, contre venin, vaso-constricteur, abcès.

### **6.2. Contre-indications du Genêt à balai sur la santé**

L'utilisation du genêt à balai est déconseillée au cours de la grossesse ou en cas d'hypertension.

La plante n'est pas dénuée de toxicité. **(Anonyme2)**.

### **6.3. D'autres utilisations**

Comme son nom l'indique, le genêt à balais était autrefois utilisé pour la fabrication de balais : les rameaux étaient séchés puis accrochés à un manche de bois. De plus, il était également employé en remplacement du chaume dans certaines montagnes pour couvrir les toits. L'écorce de l'arbuste était aussi exploitée pour la fabrication de cordage, ainsi que pour le tannage des cuirs. **(Anonyme1)**

# ***Matériel et méthodes***

## 1. Matériel végétal

La collecte des gousses à été faite de différentes régions des wilayas de Souk-Ahras et Guelma.

## 2. Méthode d'étude

### 2.1. Préparations des échantillons

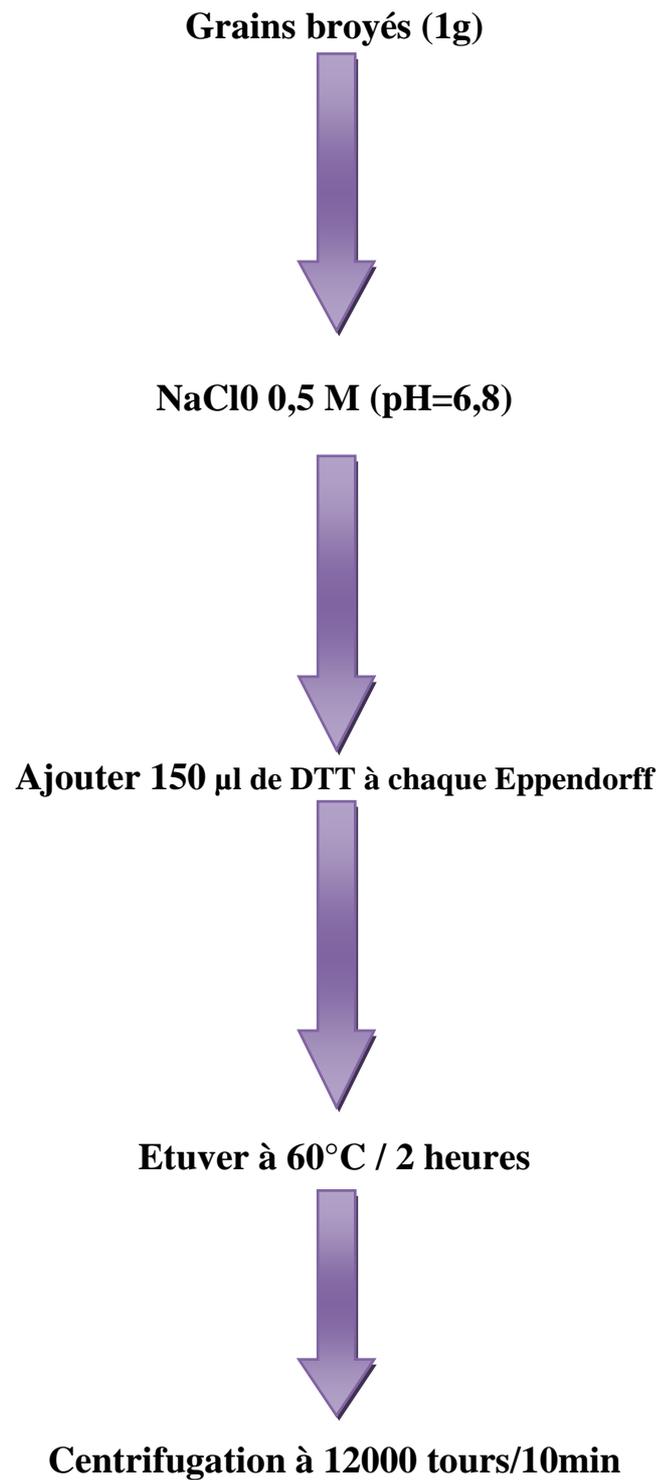
Les graines sont extraites des gousses et elles sont broyées au mortier et réduites en farine, puis mise dans une solution NaCl 0,5 M à pH 6,8 et en fin réparties dans des tubes eppendorf.

### 2.2. Extraction des protéines totales

Afin de procéder à l'extraction des différentes fractions protéiques, nous avons suivi la technique établie par (**Laemmli, 1970**).

L'extraction des protéines est réalisée à partir de la farine des graines, les étapes d'extraction sont effectuées comme suit :

- prendre 150  $\mu$ l de la solution d'extraction 1% DTT (0,1 g DTT dans 10 ml de la solution stock) et l'ajout à chaque tube Eppendorf contenant la farine.
- Mettre les Eppendorf dans l'étuve à 60 °C pendant 2h.
- Centrifuger les tubes à 12000 tours pendant 10 minutes et utiliser le surnageant pour l'électrophorèse.



**Figure 10:** Extraction des protéines totales selon la technique de (Laemmli, 1970).

### 3. Technique d'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique physicochimique qui sépare des constituants ionisés dans un champ électrique. Cette technique biochimique de séparation fondée sur le fait que des molécules portant des charges électriques différentes migrent à des vitesses différentes lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique. Si l'idée d'utiliser cette caractéristique pour séparer des molécules remonte à la fin du dix-neuvième siècle, c'est le biochimiste suédois Arne Tiselius (1902-1971), prix Nobel de chimie en 1948, qui réussit le premier à séparer par cette technique les protéines contenues dans des liquides biologiques complexes comme le sérum sanguin et le lait. Aujourd'hui, l'électrophorèse est devenue une technique de routine dans les laboratoires où on l'utilise pour séparer notamment les protéines et les acides nucléiques. L'électrophorèse des protéines peut être réalisée sur des supports variés, notamment sur gel de polyacrylamide ou sur gel d'agarose selon les informations recherchées. L'électrophorèse de protéines sur gel d'agarose est la technique la plus aisée et la moins coûteuse à mettre en œuvre dans un établissement d'enseignement avec un matériel limité. Elle nécessite simplement une cuve à électrophorèse et une alimentation continue.

#### 3.1. Principe de l'électrophorèse

L'électrophorèse est une technique qui permet de séparer des molécules, notamment des protéines, selon leur charge électrique. Quand elles se trouvent à un pH différent de leur pH isoélectrique, les protéines sont électriquement chargées. Placée sur un support, gel d'amidon ou d'acrylamide, et sous l'action d'un champ électrique pendant un temps déterminé, les protéines se dirigent vers l'électrode de charge opposée et parcourent une distance proportionnelle à leur charge électrique. Leur distance de migration dans le gel est fonction de l'intensité et de la durée du courant appliqué, du pH auquel s'effectue la séparation et de la résistance mécanique opposée par le gel (**Bourgoin-Greneche et al, 1993**).

Une autre technique d'électrophorèse (électrophorèse en présence de SDS) consiste à enrober les protéines avec des charges négatives et à les séparer suivant leur taille en choisissant comme support le gel d'acrylamide qui joue un rôle de tamis moléculaire. Les petites protéines migrent alors plus vite que les grosses

A la fin de la migration, les protéines sont mises en évidence par une réaction biochimique qui révèle chacune d'entre elles sous forme d'une bande colorée. L'ensemble des bandes observées constitue le diagramme protéique.

Deux types de protéines sont généralement étudiés :

- Les enzymes, protéines ayant des propriétés catalytiques, indispensables dans de nombreuses réactions biochimiques, permettant la transformation d'un substrat en un produit.

Elles sont mises en évidence de façon spécifique : au cours de la révélation le produit accumulé par l'enzyme est impliqué dans une seconde réaction qui conduit à la coloration visualisée sur le gel.

- Les protéines totales (protéines de réserve ou protéines de structure) sont mises en évidence de façon aspécifique : toutes les protéines en quantité suffisante pour être détectées sont révélées par la coloration.

La mobilité est fonction de :

- La charge électrostatique nette des protéines à un pH donné
- La dimension et la forme des protéines
- L'intensité du champ électrique (tension aux électrodes, conductibilité du support)
- La taille des mailles du support solide
- La force ionique tu tampon
- La température de l'électrolyte

### **3.2. Préparation des gels**

Les plaques de verre qui servent de moule pour la polymérisation des gels sont nettoyées à l'éthanol. Elles sont ensuite assemblées avec deux espaces d'une épaisseur de 1,5mm chacun.

#### **a. Le gel de séparation (running gel) à Ph 8,8**

Ce gel à T=12,8 % est constitué d'acrylamide à 35% (p/v), de N, N'méthylène bisacrylamide à 2% (p/v), de tris-HCl 1M à pH 8,8 de SDS à 10% (p/v). La réaction de polymérisation est catalysée par de l'ammonium persulfate (APS) à 1% ainsi que du Temed. Le gel est bien mélangé puis coulé entre les deux plaques. Ces dernières ne doivent pas être remplies complètement, afin qu'une couche de gel de concentration, d'une hauteur de 4cm puisse être coulée. Une fine couche de n-butanol est déposée sur le gel de séparation. Elle constitue une barrière entre le gel et l'air. Le gel polymérise à température ambiante pendant 45 minutes environ.

#### **b. Le gel de concentration (stacking gel) à pH 6,8**

Ce gel à T=2,8% a pour rôle de concentrer les protéines, de les mettre au même niveau et de retenir les impuretés. Il a la même composition que le gel de séparation, sauf que le tris-HCl est à pH 6,8. Après polymérisation du gel de séparation, le n-butanol est rincé et le gel de concentration est coulé de façon à remplir les moules. Des peignes à 15 puits sont rapidement insérés dans le gel de concentration. Ce dernier polymérise entre 90 et 180 minutes. Les peignes sont ensuite enlevées et les puits sont remplis avec du tampon avant le dépôt des échantillons.

### **3.2.1 Tampon d'électrophorèse**

Après dépôt des échantillons, la cuve d'électrophorèse est remplie avec un volume suffisant de tampon de migration, composé de glycine, de Tris et de SDS.

### **3.2.2 Conditions de migration**

La température de la cuve est maintenue aux environs de 10°C grâce à un système de refroidissement qui lui est raccordé. Pour une cuve de deux gels de 180 x 160 x 1,5mm de dimension chacun, la migration est menée à une intensité de courant de 80mA avec une tension maximale de 1200 V.

### **3.2.3 Fixation, coloration et décoloration**

Après la sortie du front de migration, le gel de concentration est éliminé, les gels sont démoulés et mis dans des bacs contenant une solution composée d'un agent fixateur des protéines, le TCA (acide trichloracétique) à 60%, ainsi qu'un produit colorant, le bleu de coomassie R-250. Les bacs sont mis en agitation pendant 24 heures. Les gels sont ensuite décolorés deux fois à l'eau.

## **4. Lecture des diagrammes**

Pour chaque diagramme électrophorétique, l'intensité des bandes polymorphes obtenues est appréciée sur le gel à l'œil nu et elle est estimée en 1 (présence) et 0 (absence).

## **5. Etude statistique**

L'ensemble des mobilités de toutes les bandes a été exploité par l'établissement d'un tableau dichotomique d'identification variétale ainsi que l'établissement de groupes de variétés et le calcul des indices de ressemblances.

Les traitements statistiques et graphiques de l'ensemble des résultats obtenus ont été réalisés avec le logiciel MINITAB.

# ***Résultats et discussions***

Dans notre travail nous avons utilisés les protéines totales du Genêt à balais pour l'identification variétale .L'étude électrophorétique à révélé que les protéines étudiées présentent un polymorphisme important.

### **1. Etude de la diversité des protéines totales**

Le diagramme électrophorétique des 15 échantillons de Genêt à balais analysés renferment, de 12 à 148 bandes décelables qui se répartissent sur les 4 zones, le diagramme est lu par zone.

On a identifié 394 bands de protéines totales de mobilités différentes. Tout échantillon confondu répartis comme suit :

En comparant les profils des 4 zones, nous pouvons relever les observations suivantes :

12 bandes pour zone A

88 bandes pour zone B

148 bandes pour zone C

146 bandes pour zone D

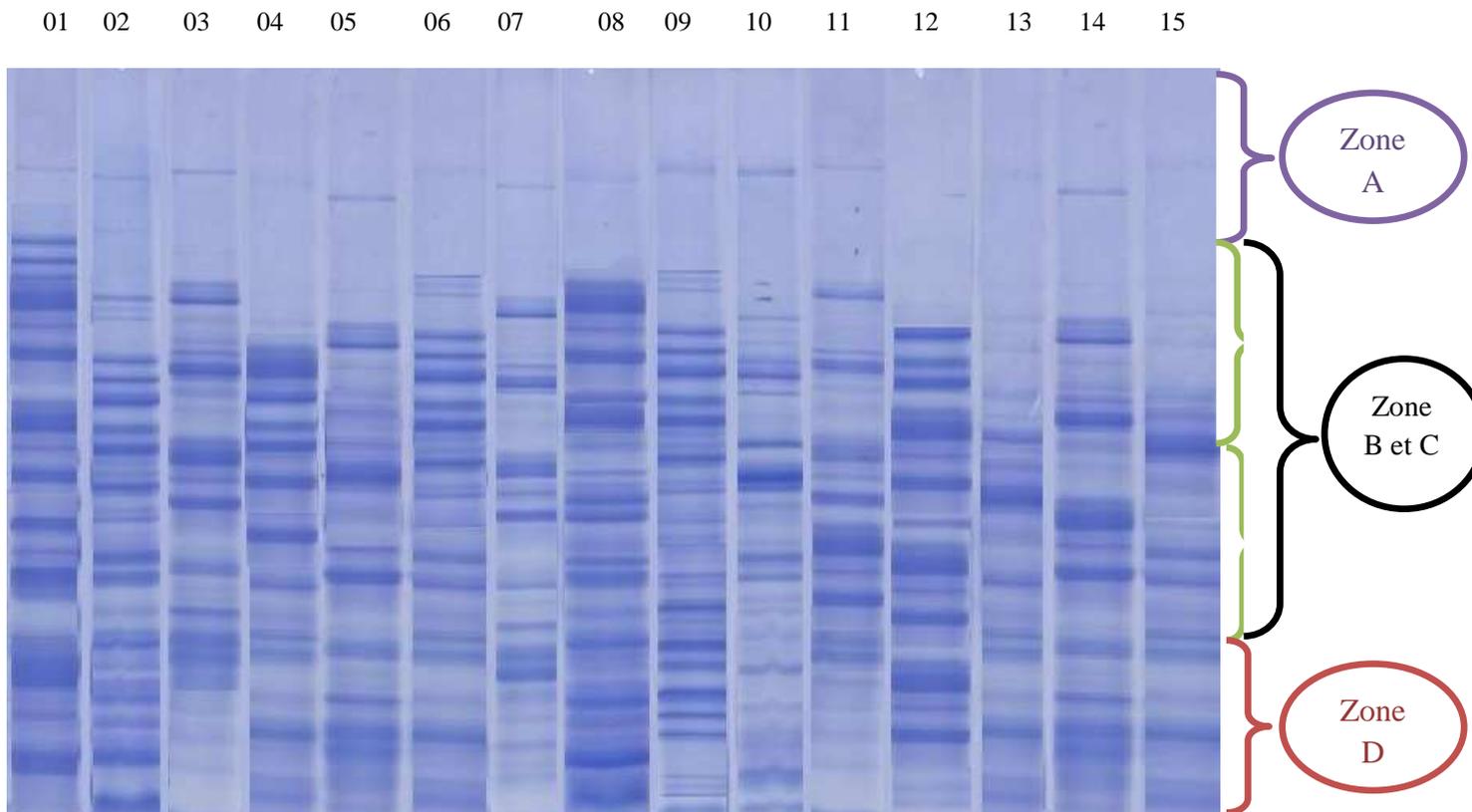
Ces quatre zones sont caractérisées par les gammes de mobilités suivantes :

13mm > zone A > 25 mm

26mm > Zone B > 50 mm

51mm > Zone C > 75 mm

76mm > Zones D > 99 mm



**Figure 09:** Profil électrophoretique des protéines totales des variétés de Genêt à balais.

La variabilité génétique à été détecté à partir de la technique d'électrophorèse. Le profil électrophoretique des protéines totales des variétés de Genêt à balais à indiquer qu'il y a 15 variétés différentes présentées dans le tableau suivant :

Tableau 01: variétés de Genêt à balai étudiés.

Variétés	Zone	Symbole
01	<b>Souk Ahras</b>	<b>TAG 1</b>
02	<b>Souk Ahras</b>	<b>TAG 2</b>
03	<b>Machrouha</b>	<b>VER 1</b>
04	<b>Machrouha</b>	<b>VER 2</b>
05	<b>Machrouha</b>	<b>VER3</b>
06	<b>Ain Seynour</b>	<b>AS 1</b>
07	<b>Ain Seynour</b>	<b>AS 2</b>
08	<b>Ain Seynour</b>	<b>AS 3</b>
09	<b>Ain Seynour</b>	<b>AS 4</b>
10	<b>Ain Seynour</b>	<b>AS 5</b>
11	<b>Guelma</b>	<b>CAL 1</b>
12	<b>Guelma</b>	<b>CAL 2</b>
13	<b>Guelma</b>	<b>CAL 3</b>
14	<b>Guelma</b>	<b>CAL 4</b>
15	<b>Guelma</b>	<b>CAL 5</b>

## 2. Choix de la région de lecture

Les résultats obtenus par le SDS PAGE montrent que les zones B et C sont les plus polymorphes.

### La zone A :

Elle est constituée de 12 bandes numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide, elles sont notées de A<sub>1</sub> à A<sub>12</sub>.

Les configurations fréquentes sont celles montrant une seule bande ayant pour mobilité 13mm qui apparaît chez 5 variétés qui sont : TAG 1, VER 1, AS4, AS5 et CAL 1.

### Les Zones B et C :

Les bandes de la zone B et la zone C notées respectivement B<sub>1</sub> à B<sub>88</sub> et C<sub>1</sub> à C<sub>148</sub>. C'est la zone la plus polymorphe, elle renferme parfois des bandes de faibles résolutions qui ne sont pas décelables, ce qui donne une difficulté à la lecture.

Les configurations observées sont celles montrant une bande ayant une mobilité de 52mm qui apparaît chez 11 variétés, et celles montrant les bandes à mobilités de 53mm et 67mm qui apparaissent chez 10 variétés.

Les configurations fréquentes sont celles montrant une bande ayant une mobilité de 75mm observées chez 9 variétés, et celles désignant les bandes à mobilité de 38,5mm, 54mm et 68mm observées chez 8 variétés. Et enfin les configurations fréquentes qui montrent une bande ayant une mobilité de 44mm, 45mm, 47mm, 49mm, 50mm, 51mm et 60mm observées chez 7 variétés.

### La zone D :

Les bandes de la zone D, notées de D<sub>1</sub> à D<sub>146</sub>, comme les bandes des zones précédentes présentes un grand polymorphisme.

En effet, les configurations fréquentes sont celles désignant une bande ayant une mobilité de 76mm, 86mm, 87mm, 95mm et 96mm observées chez 8 variétés, ainsi que celles ayant une mobilité relative de 88mm observée chez 9 variétés.

Les configurations qui désignent une bande à mobilité de 77mm, 78mm, 94mm observées chez 10 variétés.

### **3. Etablissement du diagramme type variétal**

L'analyse du diagramme montre des différences variétales, on a établi un tableau dichotomique d'identification variétales qui est fondé sur un caractère qualitatif (absence ou présence d'une composent), qui aboutit à l'établissement des groupes de variétés ainsi que le calcul de ressemblance entre les variétés afin d'évaluer le polymorphisme génétique entre les variétés étudiées.

**Tableau 02:** Clé de détermination des variétés de Genêt à balais représentés dans la figure (09)

0 : absence    1 : présence

	TAG1	TAG2	VER1	VER2	VER3	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	CAL1	CAL2	CAL3	CAL4	CAL5
13 mm	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
14 mm	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 mm	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
16 mm	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
27 mm	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
29,5 mm	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 mm	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
33 mm	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
34,5 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
35mm	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
36 mm	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
38,5 mm	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
40 mm	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
41 mm	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
42 mm	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
43 mm	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
44 mm	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
45 mm	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
46 mm	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
47 mm	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
48 mm	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
49 mm	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
50 mm	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1

Ce tableau renferme les configurations réelles des protéines dans le gel, il permet de conserver une image réelle du gel. Il peut aussi servir comme base de données pour l'établissement d'un catalogue et ont de ce fait une application directe dans l'identification variétales.

### 3.1 Diagramme observé chez les variétés étudiées

Les diagrammes sont lus par zone, quatre zones ont été identifiées (figure 09), Le diagramme peut présenter des zones bien individuelles de bandes, pour chaque zone des types (groupes de bandes) sont définis un même groupe renferme des variétés qui ont le même profil électrophoretique et qui sont étroitement apparentés.

D'un autre côté les variétés n'appartenant pas au même groupe peuvent avoir des profils très proches. Le calcul des indices de ressemblances permet d'évaluer le degré de parenté entre les variétés.

### 3.2 Calcul de l'indice de Similarité (IRS)

L'indice de similarité a été calculé selon la méthode de (DEDIO et al ; 1969) en rapportant l'indice de similarité absolu (IAS) au nombre total (N) des bandes présentes dans l'un des diagrammes des variétés comparées.

L'IAS présente l'ensemble des bandes qui ne sont pas significativement différentes d'une autre lorsque 'elles sont de même mobilité

$$\text{IRS} = \text{IAS} / \text{N} \times 100$$

Les valeurs de l'IRS sont rassemblés dans le tableau sont considérés comme significativement élevées de 85 à 100%, et significativement faibles de 0 à 100%.

Le calcul de l'indice de similarité a permis les observations suivantes :

- Les valeurs de l'IRS varient entre 03% et 100%.

Des valeurs élevées signifient que les diagrammes sont très proches et les variétés sont très apparentées, nous avons remarqué qu'il n'y a pas de variétés qui sont très proches ce qui signifie qu'il ya un grand polymorphisme.

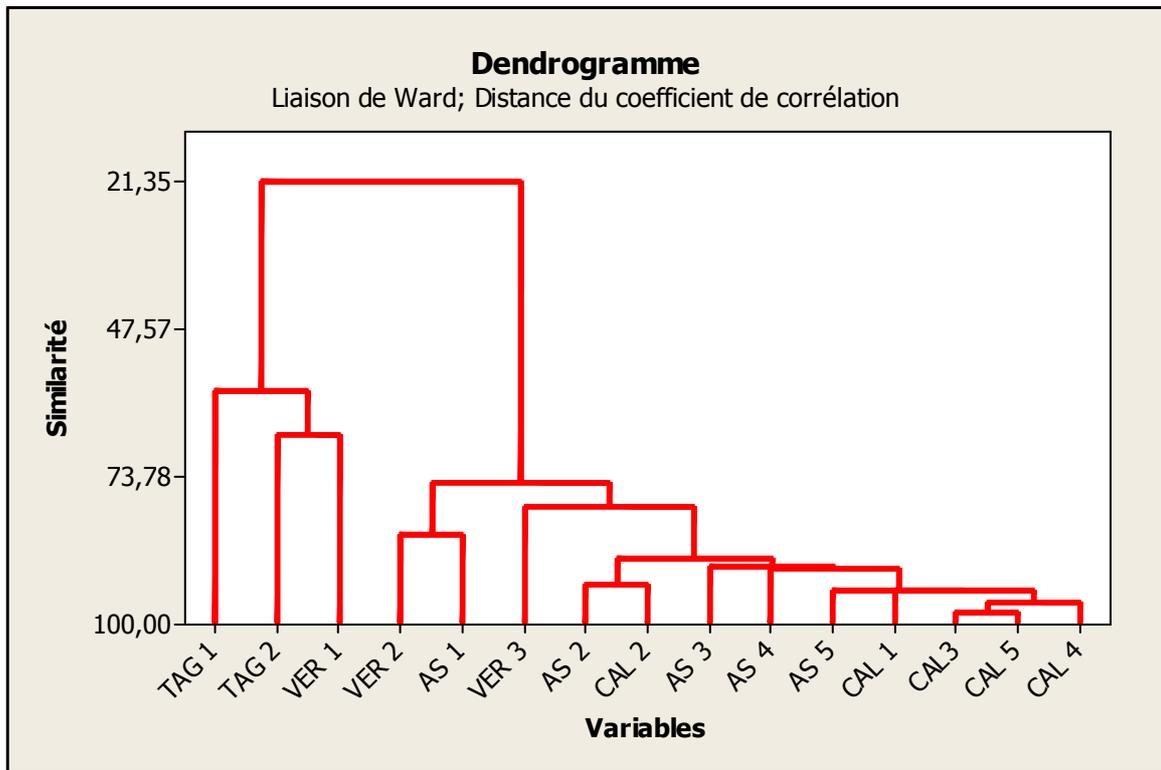
- les variétés ayant les IRS les plus bas (entre 0 et 10%). Les valeurs faibles signifient que les diagrammes présentent de grandes dissemblances.

**Tableau 03:** Indices de ressemblances entre les diagrammes électrophoretiques des protéines totales en %.

TAG 1	TAG 2	VER 1	VER2	VER 3	AS 1	AS 2	AS 3	AS 4	AS 5	CAL 1	CAL 2	CAL 3	CAL 4	CAL 5	variété
<b>100%</b>	26%	24%	15%	22%	16%	12%	29%	24%	17%	21%	26%	15%	20%	20%	TAG 1
	<b>100%</b>	23%	18%	22%	21%	13%	35%	26%	14%	17%	23%	19%	17%	26%	TAG 2
		<b>100%</b>	15%	17%	10%	5%	21%	22%	22%	29%	17%	21%	17%	23%	VER 1
			<b>100%</b>	21%	27%	5%	26%	20%	23%	16%	21%	31%	17%	29%	VER 2
				<b>100%</b>	21%	5%	29%	14%	12%	15%	18%	23%	10%	26%	VER 3
					<b>100%</b>	7%	24%	20%	11%	12%	27%	32%	17%	26%	AS 1
						<b>100%</b>	10%	8%	3%	3%	8%	6%	8%	0%	AS 2
							<b>100%</b>	28%	18%	12%	22%	24%	30%	29%	AS 3
								<b>100%</b>	20%	17%	24%	16%	16%	19%	AS 4
									<b>100%</b>	13%	13%	22%	12%	18%	AS 5
										<b>100%</b>	16%	17%	13%	17%	CAL 1
											<b>100%</b>	11%	17%	21%	CAL 2
												<b>100%</b>	23%	35%	CAL 3
													<b>100%</b>	24%	CAL 4
														<b>100%</b>	CAL 5

C'est le cas de Cal 5 avec AS2 (0%) AS 5 avec AS 2 (3%) , CAL 1 et AS 2 (3%) , et AS 2 avec VER 1 (5%) , AS 2 avec VER 2 (5%) , et AS 2 avec VER 3 ( 5%), le cas de CAL 3 avec AS 2 (6%) , AS 2 avec AS 1 (7%), CAL4 avec AS 2 (8%), aussi le cas de CAL 2 avec AS 2 (8%), et AS 4 avec AS 2 (8%), et enfin AS 3 avec AS 2 (10%) et CAL 4 avec VER 3 ( 10%).

#### 4. Exploitation des résultats



**Figure10:** Dendrogramme de similarités des protéines totales.

Le dendrogramme de similarité représenté dans la figure (10), montre une certaine dissimilarité entre les variétés étudiées.

En effet, on peut diviser notre dendrogramme en 03 groupes :

-le premier groupe constitué des variétés TAG 1, TAG 2, et VER 1, ou la similarité entre TAG 2 et VER1 est de 66,45 % et la variété TAG1 vient les rejoindre au seuil de similarité 58,66%.

-le deuxième groupe est composé des variétés VER 2 et AS 1 qui ont un seuil de similarité de 84,34%.

-le deuxième groupe est constitué de 03 sous-groupes :

\*le premier sous-groupe qui renferme AS 2 et CAL 2 qui présentent une similarité de 93,18%, la variété AS 4 vient de les rejoindre au seuil de similarité 88,52%.

\* le deuxième sous-groupe constitué par CAL 3 et CAL 5 qui ont une similarité de

98,38 %, la variété CAL 4 vient de les rejoindre au seuil de similarité 96,51%. Par ailleurs les variétés AS 5 et CAL 1 viennent rejoindre ce sous-groupe au seuil de 94,14% tandis que la variété AS 3 vient de rejoindre tout le sous-groupe au seuil de similarité 89,90%. En fin,

La variété VER 3 rejoint toutes les variétés du sous-groupe au seuil de similarité 79,53 %.

# ***Conclusion***

## Conclusion

Les marqueurs biochimiques et moléculaires ont de nombreuses applications en génétique des plantes. Ils permettent d'observer de façon plus ou moins fine, le polymorphisme de certaines protéines et donc de façon indirecte le polymorphisme des séquences d'ADN à partir desquelles elles sont traduites (**Givet et Noyer, 1999**).

L'étude de la diversité génétique du genet à balais entrepris dans ce travail à permis d'évaluer la diversité protéique et son utilisation comme empreinte génétique.

L'électrophorèse mono dimensionnelle sur gel de polyacrylamide en présence de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS-PAGE) donne une bonne résolution des protéines étudiées.

Le calcul des indices de ressemblances ainsi que l'établissement du dendrogramme de similarité ont été effectués en se basant sur le polymorphisme électrophorétique des protéines totales.

Les IRS ont permis l'estimation de degré de parenté des variétés, Ils ont des valeurs plus ou moins faibles ce qui indique une grande dissemblance entre les variétés étudiées.

Afin de mieux apprécier et d'évaluer cette variabilité génétique, ainsi que d'établir les relations phylogéniques entre les différentes espèces, il serait souhaitables de poursuivre ce travail en utilisant les techniques de biologie moléculaires telles que : les RFLP, les RAPD, les AFLP et les micro-satellites, qui constituent des moyens avantageux pour étudier les différents caractères génétiques des populations et l'évolution des espèces.

# ***Les annexes***

## Annexes

### Annexe 1 : solution utilisées pour la SDS-PAGE

#### Solution stock

Tris pH 6,8	6,25 ml
Eau distillée	12,05 ml
SDS	2 g
Bleu de bromophénol	10 mg
Glycérol	10 ml

#### Solution mère d'acrylamide à 35% (à préparer avec gants et masque)

Acrylamide	35 g
Eau distillée	100ml

#### Solution mère de bis acrylamide à 2% (à préparer avec gants et masque)

Bis acrylamide	2 g
Eau distillée	100 ml

#### Solution stock de SDS à 10%

Sodium Dodécyl Sulfate	10 g
Eau distillée	100 ml

#### Solution d'APS (Ammonium Presulfate) à 10% : à préparer ex temporairement

APS	0,1 g
Eau distillée	10 ml

#### Tampon Tris HCl pH 8,8 (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	60,57 g
Eau distillée	qsp 400 ml
Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant 8 à 10 ml	
Eau distillée	qsp 500 ml

## Annexe 1 : suite des solutions utilisées pour la SDS-PAGE

**Tampon Tris HCl pH 6,8** (à préparer sous la hotte, avec gants et masque)

Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	30,285 g
Eau distillée	qsp 200 ml
Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant	19,5 ml
Eau distillée	qsp 250 ml

### Tampon d'électrophorèse

Glycine	70,55 g
Tris (hydroxyméthyl amino Ethan)	15 g
SDS	5 g
Eau distillée qsp	5000 ml

### Solution de coloration (pour deux gels)

TCA 60%	100 ml
Solution mère de bleu de Coomassie R 250	25 ml
Eau distillée	qsp 500 ml

### Solution mère de bleu de Coomassie R 250

Bleu de Coomassie R 250	10 g
Eau distillée	qsp 1000 ml

L'éthanol doit être mis en agitation dans l'éprouvette, avec un barreau aimanté. Le bleu de coomassie est ensuite ajouté (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant). Laisser en agitation au moins deux heures, puis filtrer la solution.

## **Annexe 2 : préparation des gels pour électrophorèse des protéines totales**

(Quantités pour une cuve de deux gels)

### **Gel de séparation (running gel)**

Acrylamide à 35%	35 ml
Bis Acrylamide à 2%	6 ml
Eau distillée	16.6 ml
Tris-HCl pH 8,8	37,6 ml
SDS à 10%	1 ml
APS à 1%	2,5 ml
Temed	50 µl

### **Gel de concentration (stacking gel)**

Acrylamide à 35%	3,42 ml
Bis Acrylamide à 2%	0,86 ml
Eau distillée	30,4 ml
Tris-HCl pH 6,8	5 ml
SDS à 10%	0,4 ml
APS à 1%	2 ml
Temed	40 µl

### Annexe 3 : Clé de détermination des protéines totales.

	TAG1	TAG2	VER1	VER2	VER3	AS1	AS2	AS3	AS4	AS5	CAL1	CAL2	CAL3	CAL4	CAL5
13 mm	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
14 mm	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15 mm	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
16 mm	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
27 mm	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
29,5 mm	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 mm	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
33 mm	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
34,5 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
35mm	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
36 mm	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
38,5 mm	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0
40 mm	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
41 mm	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0
42 mm	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
43 mm	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
44 mm	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
45 mm	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1
46 mm	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1
47 mm	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0
48 mm	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
49 mm	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
50 mm	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
51 mm	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
52 mm	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
53 mm	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
54 mm	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
55 mm	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
56 mm	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0
57 mm	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0
58 mm	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0
59 mm	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0
60 mm	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0
61 mm	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0

62 mm	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
63 mm	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
64 mm	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
65 mm	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1
66 mm	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
67 mm	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
68 mm	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
69 mm	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0
70 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
71 mm	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0
72 mm	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1
73 mm	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
74 mm	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
75 mm	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1
76 mm	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0
77 mm	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1
78 mm	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1
79 mm	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0
80 mm	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
81 mm	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0
82 mm	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
83 mm	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
84 mm	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
85 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
86 mm	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1
87 mm	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
88 mm	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1
89 mm	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
90 mm	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
91 mm	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
92 mm	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
93 mm	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
94 mm	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1
95 mm	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
96 mm	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1
97 mm	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
98mm	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
99 mm	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0

**Annexe 04 : Analyse hiérarchique des variables : TAG1 ,TAG2, VER1 ,  
VER2 ,VER3, AS1 .....**

Analyse hiérarchique des variables : TAG 1; TAG 2; VER 1; VER 2;  
VER 3; ...

Distance du coefficient de corrélation, Liaison de Ward  
Etapas de fusion

ETAPE	NOMBRE DE GROUPES	Niveau de similarité	Niveau de distance	Groupes liés		Nouveau groupe	Nbre d'obs dans le nouveau groupe
1	14	98,3801	0,03240	13	15	13	2
2	13	96,5188	0,06962	13	14	13	3
3	12	94,3636	0,11273	11	13	11	4
4	11	94,1442	0,11712	10	11	10	5
5	10	93,1823	0,13635	7	12	7	2
6	9	90,4579	0,19084	9	10	9	6
7	8	89,9047	0,20191	8	9	8	7
8	7	88,5264	0,22947	7	8	7	9
9	6	84,3438	0,31312	4	6	4	2
10	5	79,5338	0,40932	5	7	5	10
11	4	75,2109	0,49578	4	5	4	12
12	3	66,4492	0,67102	2	3	2	2
13	2	58,6637	0,82673	1	2	1	3
14	1	21,3548	1,57290	1	4	1	15

# ***References***

## Références Bibliographiques

### A

**Albala, K.** Beans a history, New York, Berg, 2007, P16.

**Anonyme**, The Wealth of India (Revised), Publication & Information Directorate, CSIR, New Delhi, India, 1985, p 476-477

**Antonio, G. González, Eisa, M. Rodriguez, P.** Consuelo HernándezPadrôn and Jaime bermejo Barrera, Phytochemical Investigation of Canary Island lichens, Virtual activity, and Pharmacology, 1997, pp. 49-60.

**(Anonyme 1)**

[http://www.valleeduvar.fr/index.php?page=cytisus\\_scoparius.](http://www.valleeduvar.fr/index.php?page=cytisus_scoparius)

**(Anonyme 2)**

<https://www.complements-alimentaires.co/genet-a-balai/>

**(Anonyme 3)**

[http://www.homejardin.com/genet\\_a\\_balais/cytisus\\_scoparius.html](http://www.homejardin.com/genet_a_balais/cytisus_scoparius.html)

### B

**Bhattacharyya, B. Johri, B. M.** Flowering plants, taxonomy and phylogeny, Ed Springer-Verlag, Berlin, 1998, pp 253-256.

**Boukef, M. K.** Les plantes dans la médecine traditionnelle tunisienne, ACCT Paris, Médecine traditionnelle et Pharmacopée. 350 p."Medicinal Plants of the worlds", 1986, PP 286.

**Boulos, L.** Medicinal plants of North Africa., Ref. Publ. Inc. Michigan, 1983, P20.

**Broughton, W. J. Hernandez, G. Blair, M. Beebe, S. Gepts, P. Vanderleyden, J.** Beans (Phaseolus spp.), Model food legumes, Plant and Soil, 2003, PP 55–128

**Broughton, W. J.** Legumes. Nitrogen fixation, Oxford Universtity Press, 1983, PP 339.

**Bourgoin-Greneche, M. & Lallemand, J.** L'électrophorèse et son application à la description des variétés : présentation des techniques utilisées par le GEVES, 1993, P3.

## ***C***

**Cronk, Q. Ojeda, I. Pennington, R. T.** Legume comparative genomics, progress in phylogenetics and phylogenomics, *Current Opinion in Plant Biology* 2006, P 99-103.

## ***D***

**Dedio, W. Kaltsikes, P. j. & Larter, E. N.** Numerical chemo taxonomy in the genus *Secale*. *Canadian journal of botanic*, 1969, P1175-1180.

**Djabeur-Kaid-Harche, A. Taieb-Brabim-Bokhari, H. Selami, N. Sangare, M. Mahboubi, S.**  
Contribution à la connaissance de deux rétames , *Retama monosperma* et *R. reatam*, 2007, P 572-578.

## ***G***

**Geil, P. B. Anderson, J. W.** Nutrition and health implications of dry beans, a review, *J Am Coll Nutr*, 1994, P 549-58.

## ***H***

**Heywood, V. H.** *Flowering plants of the world*, 3<sup>rd</sup> edition, oxford university press, oxford, 1996, pp 141-145, 149-152.

## ***J***

**Judd, C. KELLOGG, S.** *Botanique systematique une perspective phylogénétique*, Deboeck Universite, 2002, pp 282-283

**Jean Duval**, agr. M.Sc. *La culture piège de luzerne dans la lutte à la punaise terne*, 2008, p 2-25.

## ***K***

**King, D. E.** Dietary fiber, inflammation, and cardiovascular disease, *Mol Nutr Food Res*, 2005, P594-600.

## **L**

**Laemmli, U. k.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature vol 2270, **1970, 5259**: 680-685p.

**Le Floch, E.** Contribution à une étude ethnobotanique de la flore tunisienne, Publications Scientifiques Tunisiennes, Programme Flore et Végétation Tunisiennes, Imprimerie officielle de la République Tunisienne, 1983, P402.

**Lemordant, D. BOUKEF, M. K.** and BEN SALEM, M. Plantes utiles et toxiques de Tunisie. Fitoterapia, 1977, P191-214.

**Linuma, M.** Constituents of *Vancouveria hexandra* heterocycles, 1993, P407.

**Lieutaighi, Pierre** ,Auteur de l'article (écrivain, lauréat de la Société botanique de France)

<http://www.universalis.fr/encyclopedie/genet-a-balais/>

## **M**

**Maxted, N. and BENNETT, S. J.** Conservation, diversity and use of Mediterranean legumes,

Plant Genetic Resources Of Legumes in the Mediterranean, Maxted N. and Bennett S. J. PO Box 17,3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academie Publ, 2001a, P 1-32.

**Maxted, N. and BENNETT, S. J.** Legume diversity in the Mediterranean region, Plant Genetic Resources Of Legumes in the Mediterranean. Maxted N, and Bennett S. J. POBox 17, 3300 AA Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academie Publ, 2001b, P 51-75.

**Mekkiou, R. Touahar, H. Dijoux-Franca, M. G. Mariotte, A. M. Benayache, S. and Benayache, F.** A new isoflavone from *Genista saharae* (Fabaceae), Biochemical Systematics and Ecology, 2005, P635-638.

**Mitaine-Offer, A. C. Tapondjou, L. A. Djoukeng, J. D. Bouda, H. and Lacaille- Dubois, M.**Biochemical Systematics and Ecology, 2003, PP227-228.

## **R**

**Rachie, O. K.** Tropicallegumes : ressources for the future, National Academy of Sciences. Washington, D.C. 1979.

## **S**

**Spichiger, R. E. Salvlaimen, V. Figeat, M. Jammonob, D.** Botanique systématique des plantes à fleurs .éd : press polytechnique et universitaire romande, 2004, P203-206.

## **V**

**Voisin, L. Liu, M. Hejazi, T. Tesfa, H. Li1, M. Huang, Y. Liu, and L. R. Leung.** One-way coupling of an integrated assessment model and a water resources model: evaluation and implications of future changes over the US Midwest, 2013, 555–4575.

**Venette**,auteur de l'article,06-09-2015.

<http://notesdeterrain.over-blog.com/2015/09/genet-a-balais.html>

## **W**

**Wickens, G. E. SEIF EL DIN, A. G. SITA, G. and NAHAL, I.** Rôle des acacias dans l'économie rurale des régions sèches d'Afrique et du Proche Orient. Cahier FAO Conservation, 1996, P152.

**Wilhelm,Eiserneich,Alfred Handel, Ute E Zimmer**,Guide de la faune et la flore,2003,P64.