



République Algérienne Démocratique et Populaire
Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem Faculté
Des Sciences de La Nature et de La Vie Département de
Biologie



Mémoire

Présenté pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCE BIOLOGIQUE

Spécialité : Génétique Fondamentale et appliquée

Par

Azaizi Hadjira

& Bouziane Rabe

**Extraction de l'ADN du Blé et Analyse Bioinformatique du gène *HSP 70* en
vue d'augmenter la tolérance à la chaleur.**

Soutenu le 12 juin 2024 devant le jury composé de :

| | | | |
|---------------------|---------------------|------------|---------------------------------|
| Président | Gedouar.Y | MCA | Université de Mostaganem |
| Encadreur | Benyettou .A | MCB | Université de Mostaganem |
| Examineur | Ben Ali .S | MCB | Université de Mostaganem |
| Co-encadreur | Brahmi.N | MCA | Université de Mostaganem |

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciement

Je rends Grâce à dieu ; le clément ; le miséricordieux

Louanges au prophète Mohamed

*Ce présent travail est le fruit des longues années d'études. A cet effet nous tenons à remercier D'abord, nos enseignants qui nous ont formés, vivement notre encadreurs Mme **Benyettou Assia** Enseignante Chercheur à l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Mme **Brahmi Nabila** Professeur à l'université de Mostaganem qui nous a orienté et encadré et ménagé leurs temps pour juger et critiquer ce travail.*

*Mes respectueuses salutations vont aux membres du jury **Pr.Gedouar.Y** Et **Pr.BenAli.S** qui ont bien voulu m'honorer, pour avoir bien accepté de présider le jury de ce mémoire.*

Ensuite, J'adresse mes sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé mes réflexions et ont accepté de me rencontrer et de répondre à mes questions durant mes recherches.

Enfin, nous remercions tous ceux, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce modeste travail.

Hadjira L Rabeb

Dédicaces

Tout d'abord, je tiens à remercier DIEU

De m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je dédie ce projet :

A ma chère mère, Nadia.

A mon cher père, Larbi.

Qui n'ont jamais cessé, de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mes frères, Youcef et Ayoub, Islem.

A ma chère tante maternelle, Pour ses soutiens moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.

A ma cher binôme Rabeb

Pour sa entente et sa sympathie

Pour leurs indéfectibles soutiens et leurs patiences infinies.

A mes grands-mères, mes oncles et mes tantes. Que Dieu leur donneuse longue et joyeuse vie.

*A tous les cousins, les voisins et les amis que j'ai connu jusqu'à maintenant
Merci pour leurs amours et leurs encouragement.*

Hadjer

Dédicaces

“Chers tous,

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à chacun de vous pour le soutien et l’amour que vous m’avez apportés. Vous avez été un véritable pilier dans ma vie et avez grandement contribué à illuminer mes journées.

À mes chers parents, je vous remercie pour tout. Votre tendresse et votre soutien ont été la base de mon succès et de mon bonheur. Je ne peux pas exprimer la quantité d’amour que j’ai pour vous avec des mots.

À mes merveilleux frères et sœurs, vous êtes le pilier de ma vie et ma source de force. Je vous remercie pour chaque moment passé ensemble et pour votre soutien infini.

À mes chers amis, Fatima, Houda, Khadija, Fariha, Mamia, Aïcha, Tarchia et Hadjer, vous êtes de véritables amis dont je suis fier de connaître. Merci pour chaque rire et chaque moment spécial que nous avons partagé ensemble.

Je vous remercie encore une fois du fond du cœur et je vous souhaite à tous bonheur et succès continu.

Avec tout mon amour,

Rabeb

Résumé

L'utilisation du blé dans l'industrie alimentaire, notamment dans la production de pain et de pâtisseries, soutient les économies locales et crée des opportunités d'emploi dans les secteurs de l'agriculture et de l'industrie alimentaire.

L'objectif de ce travail est de comprendre l'impact de la température sur les feuilles et d'extraire l'ADN des feuilles de graines de blé. Un premier design d'ARNsg a été réalisé pour le gène *Hsp70* afin de cibler l'édition CRISPR Cas9 pour améliorer la tolérance à la chaleur.

Les résultats ont montré que l'effet de la température à 42°C affecte le tissu et la clarté des cellules. L'analyse a montré une quantité d'ADN extraite plus importante des graines que des feuilles. L'ARNsg est conçu pour avoir une bonne efficacité de ciblage de 50%, mais il y a une possibilité d'atteindre des sites hors cible.

La modification du gène *Hsp70* dans le blé pose des problèmes de sécurité alimentaire à l'échelle mondiale, et en Algérie en particulier. L'Algérie importe presque tout son blé. Le succès de cette étude pourrait conduire à un développement économique significatif.

Mots-clés : Extraction d'ADN, *Hsp70*, CRISPR cas9, Blé, Bioinformatique.

Abstract

The use of wheat in the food industry, particularly in the production of bread and pastries, supports local economies and creates employment opportunities in the agriculture and food industry sectors.

The objective of this work is to understand the impact of temperature on leaves and to extract DNA from wheat seed leaves. A first sgRNA design was carried out for the *Hsp70* gene to target CRISPR Cas9 editing to improve heat tolerance.

The results showed that the effect of temperature at 42°C affects the tissue and cell clarity. The analysis showed a greater quantity of DNA extracted from the seeds than from the leaves. sgRNA is designed to have a good targeting efficiency of 50%, but there is a possibility of reaching off-target sites.

Modification of the *Hsp70* gene in wheat poses food security problems on a global scale, and in Algeria in particular. Algeria imports almost all of its wheat. The success of this study could lead to significant economic development.

Keywords: DNA extraction, Hsp70, CRISPR cas9, Wheat ,Bioinformatic.

ملخص:

يعتبر القمح من زراعات الحبوب الأساسية على الصعيد العالمي، حيث يوفر مصدرًا حيويًا للتغذية للبشر والحيوانات استخدامه في صناعة التغذية، خاصة في إنتاج الخبز والمعجنات، يدعم الاقتصادات المحلية ويخلق فرص عمل في قطاعات الزراعة والصناعات الغذائية

الهدف من هذا العمل معرفة مدى تأثير درجة الحرارة على اوراق القمح, استخراج الحمض النووي من أوراق و بذور قمح. يهدف زيادة تحمل حرارة cas CRISP قصد توجيهه *hsp9* للجين *sgARN 70* تصميم أولي من خلال النتائج عند درجة الحرارة 42° تؤثر على بنية الخلايا والأنسجة. أظهر تحليل كمية مستخرجة من بذور أكثر من أوراق، ADN،

مصمم جيد بنسبة وصول لموقع مستهدف 50% لكن إحصائية لوصول لموقع خارج *sgARN* من متوقع ان هدف أكثر

أن تعديل جين *h* يزيد من قوة تحمل قمح ظروف إجهاد حراري يحل مشاكل أمن الغذائي في العالم بشكل عام والجزائر

يزيد من قوة تحمل قمح ظروف الإجهاد الحراري يحل مشاكل الأمن الغذائي في العالم *HSP* ان تعديل *70* في الجزائر بشكل خاص القضاء على استيراد وزيادة التنمية الاقتصادية

الكلمات. مفتاحية: القمح . استخراج حمض نووي

bioinformatique 70, Hsp 9, Cas CRISP

Liste des abréviations

Listes de abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

sgARN: ARN guide.

CRISPR-Cas9: Système d'édition de gènes utilisant la répétition palindromique courte groupée et régulièrement espacée avec l'endonucléase Cas 9.

C: Celsius (degrés Celsius). **UI**: Microlitre (unité de volume).

PAM: Motif associé aux protéines Cas.

Chop chop cas: Outil de modification de gènes utilisant les données relatives aux protéines associées à CRISPR.

Hsp70: Protéine choc thermique 70.

PEI: Le Polyétherimide.

G: Gramme.

SDS : Sodium dodecyl sulfate

Nm: Nanomètre.

Pb: Paire de base.

IDT: Technologie intégrées de l'ADN.

NCBI: Centre Nationale de l'information Biotechnologique.

Liste des figures

Liste des figures

| Figures | Pages |
|---|--------------|
| Figure1 : Origine géographique du Blé | 4 |
| Figure2 : Dégât du gel sur l'épi et les feuilles | 7 |
| Figure3 :l'effet du criocère sur la feuille | 8 |
| Figure4 : l'effet du puceron sur les Feuilles | 8 |
| Figure5 : Variation de la taille et de la forme des grains dans le blé tétraploïde | 10 |
| Figure6 : Blé en coupe longitudinale et vu de l'extérieur | 11 |
| Figure7 : Épi, épillet et fleur de Blé | 12 |
| Figure8 : QIAcube Connect | 21 |
| Figure9 : Classification de système de CRISPR/Cas9 | 24 |
| Figure10 : Structure montrant l'action de CRISPR cas9 ET sgARN | 24 |
| Figure11 : Matériaux dans l'étude de la température et des feuilles de Blé | 32 |
| Figure12 : Observation microscopique du feuille | 33 |
| Figure13 : Éléments utilisés dans l'extraction d'ADN | 34 |
| Figure 14 : Dosage d'ADN | 37 |
| Figure 15 : Interface du site ensembl.plant | 38 |
| Figure 16 : Fenêtre de Triticum aestivum | 39 |
| Figure17 : La séquence du gène <i>Hsp70</i> | 39 |
| Figure18 : Site NCBI | 40 |
| Figure19 : Nucléotides blast | 41 |
| Figure20 : Les séquences similaires au gène <i>Hsp70</i> | 41 |
| Figure21 : La séquences qui correspondre | 43 |
| Figure22 : Résultat du GenBank À 100 % | 44 |
| Figure23 : Site de NEBcutter | 45 |
| Figure24 : Tous les enzymes de restrictions | 46 |
| Figure25 : Site de VectorBuild | 47 |
| Figure26 : Complément de l'ADN | 47 |
| Figure27 : Site de chop chop | 48 |
| Figure28 : Évaluer l'activité sgARN conçue | 49 |
| Figure29 : La Méduses d'ADN des feuilles | 51 |
| Figure30 : La Méduses d'ADN de grain du Blé | 51 |
| Figure31 : Résultats de site chop chop | 53 |
| Figure32 : La séquence de l'ARN Guide choisie | 53 |



Liste des tableaux

Liste des tableaux

| Titres | Pages |
|---|--------------|
| Tableau 1: Principales maladies fongiques du Blé et des champignons responsables | 13 |
| Tableau 2: Les Principales stratégies de lutte contre les maladies du Blé | 16 |
| Tableau 3 : L'effet à groupe de feuilles dans laboratoire dans différentes température | 50 |
| Tableau 4 : Absorbance de l'ADN dans la longueur-d 'ondes à 260 et 280 nm | 52 |

Sommaire

| | |
|---|----|
| Remerciements | |
| Dédicace | |
| Résumé | |
| Abstract | |
| ملخص | |
| Liste des abréviations | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Introduction générale | 01 |
| Chapitre I : Revue bibliographique I. Généralités sur le Blé | 03 |
| I.1 Histoire de Blé | 03 |
| I.2 Origine de Blé | 03 |
| I.3 Origine géographique | 04 |
| I.4 Classification | 05 |
| I.5 Génome de blé | 05 |
| I.6 Les Différente type de blé | 06 |
| I.7 Biologie de blé | 06 |
| I.8 Les contraintes subis par le blé | 06 |
| I.8.1 Stress biotique | 07 |
| I.8.2 Stress thermique | 09 |
| I.8.3 Stress de froid | 09 |
| I.9 Caractéristique morphologique de la plante | 10 |
| I.10 Le grain de Blé | 10 |
| I.10.1 Origine de grain de Blé | 11 |
| I.10.2 Anatomie de Blé | 11 |

| | |
|---|----|
| I.10.3 Composition de grain de Blé | 12 |
| I.11 Principales maladies fongiques du Blé | 13 |
| I.12 Lutte contre les maladies génétiques de Blé | 16 |
| II. Génétique Moléculaire et Édition Génétique CRISPR-Cas9 | |
| II.1 Les protéines de choc thermique HSPs | 18 |
| II.2 Le gène HSP 70 | 19 |
| II.3 Extraction d'ADN à partir des végétaux | 19 |
| II.4 Différentes méthodes d'extraction de l'ADN chez les végétaux | 20 |
| II 4.1 Méthode CTAB (méthode au bromure de cetyltriméthylammonium | 20 |
| II 4.2 Méthode phénol-chloroforme | 20 |
| II 4.3 Méthode Dneasy Plant Mini Kit | 21 |
| II .5 La technique de CRISP Cas 9 | 22 |
| II 5.1 Histoire de la découverte de CRISPR cas9 | 22 |
| II 5.2 Classification de système CRISPR/Cas9 | 23 |
| II 5.3 Application de CRISPR / Cas9 dans les maladies des plantes | 24 |
| III. Bioinformatique et base de données | |
| III .1 Introduction de bioinformatique | 26 |
| III. 2 Les base de données | 26 |
| III 2.1 Méthodes et applications d'alignement de séquences | 26 |
| III 2.2 Outils de comparaison de génomes | 26 |
| III 2.3 Algorithmes de recherche de similarité de séquences | 27 |
| III 2.4 Jim Kent's BLAT | 27 |
| III 2.5 Alignement multiple basé sur le génome utilisantBLASTZ | 27 |
| III.3 Les avantages de la bioinformatique dans l'étude génétique des plantes | 28 |
| III.4 Application de bioinformatique sue le Blé | 28 |
| Chapitre II: Matériels et Méthodes | |
| II.1 Informations sur les échantillons du Blé étudié | 30 |
| II.2 Zone d'étude | 30 |
| II.3 Objectif | 30 |
| II .4 L'effet de la température sur les feuilles de blé | 30 |
| II.5 Partie d'Extraction d'ADN de ble tendre | 33 |

| | |
|---|----|
| II.6 Dosage d'ADN | 36 |
| II .7 Analyse du gène <i>Hsp70</i> | 37 |
| Chapitre III: Résultats et Discussion | |
| III .1 Résultats | 50 |
| III .1.1 Résultats de l'effet de la chaleur sur les feuilles de blé tendre | 50 |
| III.1.2 Résultats de Extraction d'ADN de blé tendre | 50 |
| III.1.3. Résultats de dosage de l'ADN dans les spectrophotomètres | 52 |
| III.1.4. Résultats de site chop-chop | 53 |
| III.1.5 Résultats de l'évaluation sgARN. Site checker CRISP cas 9. | 53 |
| III. 2 Discussion | 55 |
| III 2.1 L'effet de la chaleur sur les feuilles de Blé | 55 |
| III 2.2 Extraction d'ADN | 55 |
| III 2.3 Bioinformatique et analyse du gene hsp70 | 55 |
| Perspective et Conclution | 56 |



Introduction

Introduction

Le blé, premier aliment cultivé par l'homme il y a 10 000 ans, a joué un rôle crucial dans l'évolution de l'agriculture et de la relation entre l'homme et l'environnement. Avec sa richesse en protéines et en nutriments essentiels, le blé est vital pour des milliards de personnes dans le monde, selon un rapport de l'OCDE-FAO prévoyant une augmentation de sa consommation mondiale de 13 % d'ici 2027. Cependant, le changement climatique constitue une menace sérieuse pour sa production, affectant négativement les températures et menaçant ainsi la sécurité alimentaire mondiale. Des preuves scientifiques montrent que les émissions de gaz à effet de serre, résultant de l'activité humaine, exacerbent ce changement climatique, ce qui a un impact négatif sur la productivité agricole. Face à ces défis émergents, il est impératif de comprendre les paramètres climatiques qui influent sur la productivité du blé dans le monde. **(Swastika et Puja, 2022).**

L'amélioration de la productivité du blé sans compromettre la qualité des grains nécessite le développement de nouvelles technologies pour l'analyse du génome et l'édition précise. La technologie CRISPR/Cas9 est un outil révolutionnaire qui repose sur un système immunitaire bactérien et est utilisée pour éditer les gènes de manière ciblée. **(Li et al 2021)** Elle peut améliorer les caractéristiques agricoles sans ajouter de séquences génétiques volumineuses à la plante finale. Cependant, ses applications rencontrent des défis dans le développement des cultures en raison du temps et des ressources nécessaires. **(Bhowmik, 2018).**

Cette année, l'Algérie a connu une révolution agricole dans la production de blé dur dans différentes régions désertiques, en exploitant les eaux souterraines disponibles. Le développement de modifications génétiques pour améliorer les cultures de blé afin de résister aux températures élevées réduit la consommation d'eau.

La bioinformatique applique les principes des sciences de l'information et de la technologie aux données complexes des sciences de la vie. Elle est essentielle pour comprendre comment les activités cellulaires changent dans les états pathologiques, nécessitant une intégration complète des données (Lapatas et al 2015) . La bioinformatique analyse les séquences d'acides nucléiques et de protéines, aidant à l'organisation du génome, à la régulation de l'expression génique et aux études évolutives. Les tâches comprennent l'identification des gènes, l'alignement des séquences et la prédiction des structures protéiques. Les sous-disciplines impliquent le développement d'algorithmes, l'analyse des données et la mise en œuvre d'outils pour une gestion efficace de l'information. **(Alemu ,2015).**

Introduction

Les objectifs principaux de l'étude sont les suivants :

- L'effet de la chaleur sur les feuilles de Blé: L'exposition de différentes feuilles de blé à des températures variées est observée au microscope optique afin de comprendre l'impact sur les tissus et la structure cellulaire
- Extraction et analyse de l'ADN de blé : Utilisation de la technique de l'éthanol pour extraire l'acide désoxyribonucléique (ADN) du blé, suivi de son analyse par la technique du dosage de l'ADN. Cela vise à comprendre les fondamentaux du génome et la diversité génétique du blé.
- Conception de pré guides ARN court (sgARN) en Intention de guider la technologie CRISPR-Cas9 : Conception de molécules d'ARN court utilisées dans la technologie d'édition génomique CRISPR-Cas9, en utilisant la bioinformatique pour programmer différentes règles génétiques associées au blé. L'objectif est d'améliorer la protéine HSP70 pour augmenter l'efficacité du processus d'édition génique et de guider précisément l'expression des gènes pour améliorer les caractéristiques de tolérance à la chaleur du blé. Cela reflète les défis et les opportunités potentiels pour améliorer l'agriculture et augmenter la productivité des cultures.

Chapitre I

Revue bibliographique

I Généralités sur le Blé

I.1 Histoire du Blé

Le terme « céréales » provient du nom de Cérès, une déesse préromaine liée à la récolte et à l'utilisation de l'agriculture. Les céréales sont des grains ou graines alimentaires appartenant à la famille des graminées. (McKevith *et al.*, 2004).

Le blé est l'une des trois céréales, une plante principalement graminée (dont le Sarrazin ou blé noir est une polygonacée) dont les grains sont employés pour la nourriture humaine ou animale à partir du grec Cérès (la déesse des champs) Les monocotylédones forment la base.

Alimentation des personnes à travers le monde : blé, riz, maïs. Il semblerait que l'origine du blé (*Triticum*), du maïs (*Zea*) et du riz (*Oryza*) soit similaire ; le mot "blé" provient probablement du gaulois blato (qui est à l'origine du vieux français blaie, blee, blaier, blaver, d'où le verbe "emblaver", qui signifie ensemercer en blé). Le blé désigne les grains qui, broyés, procurent de la farine, que ce soit pour des bouillies (polenta), des crêpes ou du pain. Des espèces différentes sont donc présentes sous le nom de blé : *Triticum* (de la langue latine tritus, us = broiement, frottement) : Le froment, ainsi que l'orge (*Hordeum*) et le seigle (*secale cereale*), le blé noir (sarrasin : *fagopyrum esculentum*, polygonacée), le blé des canaries (alpiste, *phalaris canariensis*).

Le blé de Turquie (maïs) est cultivé comme nourriture pour les serins, dont le nom est probablement issu des oiseaux (canaris) et non de l'île, du moins au début (Henry et Jacques., 2000).

I.2 Origine du Blé

Le Blé est depuis le commencement de l'agriculture la principale source de nourriture de l'humanité. (Ruel *et al.*, 2006).

Le Blé (*Triticum aestivum*) est la céréale la plus largement cultivée au monde, couvrant environ 237 millions d'hectares chaque année, représentant un total de 420 millions de tonnes et contribuant à au moins un cinquième de l'apport calorique humain (Charles i Oyewole *et al.*, 2016)

Il est un aliment énergétique et une culture largement utilisée, car il est consommé par 50 % de la population comme alimentation de base, parce que le blé contient des fibres alimentaires, des glucides et davantage de protéines végétales, nécessaires à la nutrition humaine (Curtis *et al.* , 2014).

I.3 Origine géographique

La découverte du blé il y a environ 15 000 ans. À l'origine, il était cultivé dans la vallée de la Somalie et les plaines de Mésopotamie, le long des fleuves Tigre et Euphrate, dans une région connue sous le nom du Croissant Fertile (Smith *et al.*, 1995).

À cette époque, les humains étaient principalement des chasseurs-cueilleurs. Cependant, un changement climatique les a obligés à trouver de nouvelles façons de se nourrir. L'agriculture est alors apparue comme une alternative prometteuse.

La domestication des plantes, dont le blé, a été essentielle dans cette transition. Elle a conduit à la formation de communautés villageoises, marquant le début de l'agriculture sédentaire. Ce changement a profondément influencé le développement humain, favorisant des structures sociales plus complexes et permettant une densification de la population. (Wadley *et al.*, 1993).

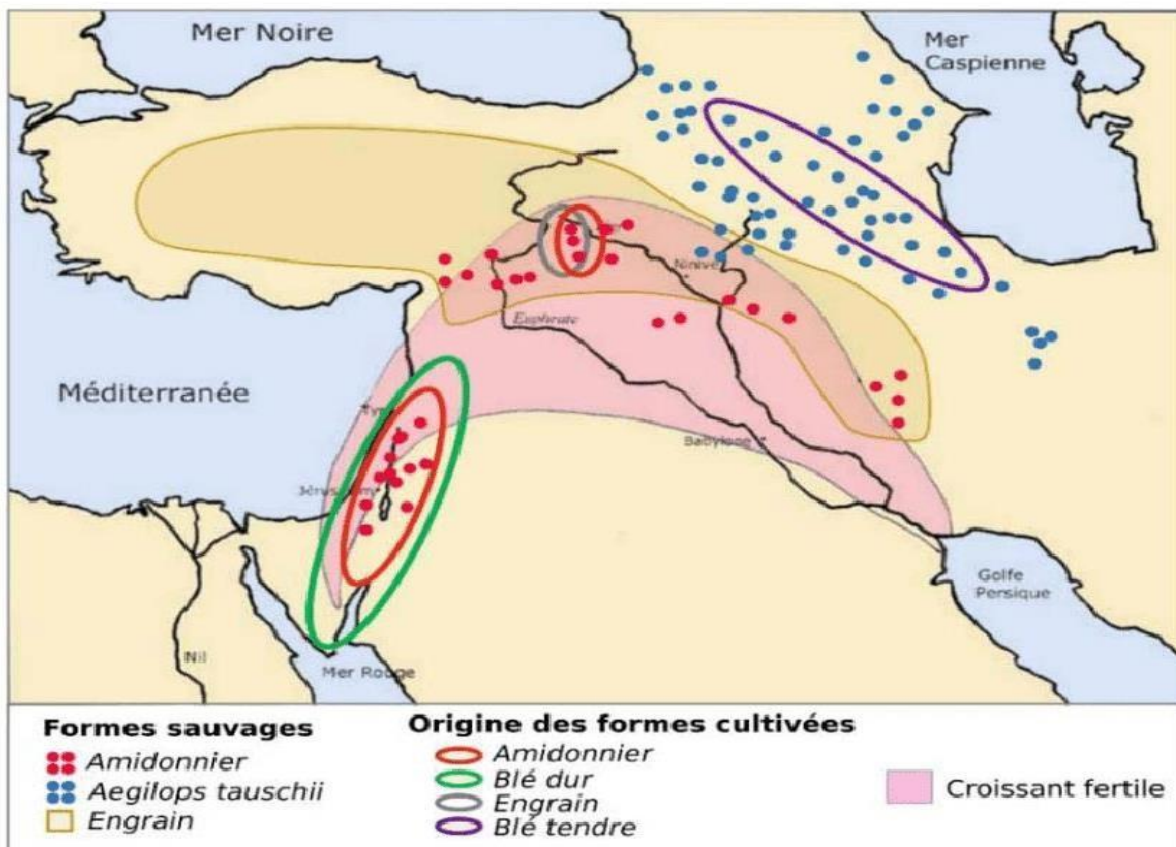


Figure 1 : Origine géographique du Blé Adapté de Dubcovsky et Dvorak (2007).

I.4 Classification

Le blé, membre du genre *Triticum* de la famille des Graminées, est une monocotylédone. Il s'agit d'une céréale dont le grain, connu sous le nom de caryopse, est un fruit sec et indéhiscent, composé d'une graine et de téguments. Les principales variétés cultivées sont le blé tendre (*Triticum aestivum*) et le blé dur (*Triticum durum*), mais il existe d'autres espèces de *Triticum* qui se distinguent par leur niveau de ploïdie.

Selon la classification de Mazoyer (2002) le blé tendre appartient à :

- Règne : végétale
- Embranchement : phanérogames
- Sous embranchement: Angiospermes
- Classe : Monocotylédones
- Ordre : graminales
- Famille : graminacées (poacées)
- Genre : *Triticum*
- Espèces : *Triticum vulgare* aussi appelé *triticum aestivum* (**Mazoyer *et al.* , 2002**)

Selon la classification de Bonjean et Picard (1990) Le blé dur est une monocotylédone classé comme suit :

- Embranchement :spermaphytes.
- Sous-embranchement : Angiospermes
- Classe : Monocotylédones
- Super-ordre : Commeliniflorales
- Ordre : Poales
- Famille : Graminacées
- Genre : *Triticum sp*
- Espèce : *durum Desf* (**Bonjean *et al.* ,1990**)

I.5 Génome du Blé

Le blé tendre possède les génomes AA, BB et DD, totalisant 42 chromosomes, tandis que le blé dur ne contient que les génomes AA et BB, soit 28 chromosomes. (**Feillet *et al.* , 2000**)

L'ascendance génétique des différentes variétés de blé est complexe et partiellement comprise. Le génome A provient de *Triticum monococcum*, le génome B d'une espèce d'*Aegilops*, et le génome D d'*Aegilops*

squarrosa. Le croisement naturel entre *T. monococcum* et *Aegilops* a donné naissance à un blé dur sauvage de type AABB, qui a évolué vers d'autres variétés puis vers le blé dur cultivé. Les blés tendres cultivés sont également issus de croisements naturels entre différentes espèces de blé et d'*Aegilops*. (Feillet *et al.* , 2000)

I.6 Les différents types de blé

Sont principalement classés selon leur saison de croissance.

- Blé d'hiver : planté à l'automne, récolté au printemps, représentant environ 75% du blé cultivé aux États-Unis.
- Blé de printemps : planté au printemps, récolté à la fin de l'été ou au début de l'automne.

Au-delà de la saison de croissance, le blé est ensuite catégorisé selon sa dureté (dur/mou), sa couleur (rouge/blanc) et la forme de son grain (Ayaz *et al.* , 2020)

. En fin de compte, nous avons les six types de blé suivants :

- Blé rouge dur d'hiver.
- Blé rouge dur de printemps.
- Blé rouge mou d'hiver.
- Blé durum.
- Blé blanc dur.
- Blé blanc mou.(Ayaz *et al.*,2020)

I.7 Biologie De Blé

Selon Lersten (1987), le blé est une graminée annuelle ou annuelle hivernale, de hauteur moyenne. Les feuilles ont un limbe plan, et l'inflorescence est un épi terminal, à fleurs parfaites. L'état végétatif de la plante se caractérise par la présence d'un plateau de tallage, dont les bourgeons axillaires se transforment en tiges feuillées. Les tiges, appelées chaumes, possèdent cinq à sept nœuds ainsi que trois ou quatre feuilles véritables. La feuille la plus haute, ou dernière feuille, sous-tend l'inflorescence. Chaque chaume produit un épi composé, dont les ramifications sont les épillets. Les épillets sont portés par le rachis, ou axe principal de l'épi, et séparés par de courts entre-nœuds. Chaque épillet est un axe reproducteur condensé, sous-tendu par deux bractées stériles appelées glumes. Les glumes enveloppent les deux à cinq fleurs, portées chacune par un court pédicelle appelé rachéole. La fleur possède trois étamines se terminant chacune par une grande anthère; le pistil comprend un seul ovaire, un seul ovule et deux styles se terminant chacun par un stigmate plumeux et ramifié.

I.8 Les contraintes subis par le Blé

Comme la majorité des plantes cultivées, le blé est sensible à différentes formes de stress, biotiques

(Maladies) et abiotiques (fluctuations environnementales, température, sécheresse ...), en particulier dans le contexte actuel de changement climatique. Ces stress ont un impact considérable sur le rendement mais aussi sur la qualité de la production. (Comby *et al.*, 2018)

Les événements de stress osmotique ont un impact considérable sur la production mondiale de blé, La sécheresse est un problème mondial, qui se produit dans presque toutes les régions productrices de blé et qui peut engendrer un stress osmotique sévère. Selon des estimations, le stress hydrique aux États-Unis entraîne des pertes de 6 à 8 milliards de dollars par an et accentue la pression sur la sécurité alimentaire mondiale Il y a de plus en plus de cas de sécheresse et de plus en plus de persistance en raison du réchauffement climatique, ce qui accroît le risque de compromettre les rendements. La salinisation du sol est une autre cause de stress osmotique sévère qui menace environ 20% de la surface agricole cultivable. (Abhinandan *et al.*, 2018).

Selon Mazouz (2006), La baisse de la fertilité des épis est due aux dégâts de gel (Fig.3) au cours des stades végétatifs allant de la montaison à l'épiaison, surtout chez les variétés précoces.



Figure 2: Dégât du gel sur l'épi et les feuilles.

I.8.1 Stress biotique

Un stress biotique découle de l'action néfaste d'un être vivant au cours de cycle de développement de blé.

- Les mauvaises herbes : causent la perte de 20% de rendements de céréaliculture (Oufroukh et Hamadi, 1993 in Fritas, 2012). Selon Blaid (1996) les mauvaises herbes les plus importants sont la folle avoine (*Avena sterilis*), le brome (*Bromus rigidum*), le phalaris (*Phalaris brachystachys* et *phalaris paradoxa*) et le ray-grass (*Lolium multiflorum*).
- Les insectes : sont des ravageurs de céréales qui causent des dégâts directe sur les feuilles ou indirecte en

tant que vecteurs de maladies (**Boulal et al ., 2007**), Les plus importants sont le criocère (Fig.3), les pucerons (deux espèces : *Sitobion avenae* et *Rhopalosium padi*) (Fig.3), la mouche de hesse (*Mayetiola destructor*) et les punaises (*Aelia germarih*).

Les plus importants sont le criocère (Fig.4), les pucerons (deux espèces : *Sitobion avenae* et *Rhopalosium padi*) (Fig.4), la mouche de hesse (*Mayetiola destructor*) et les punaises (*Aelia germarih*).



Figure 3:l'effet du criocère sur la feuille. ,(a- Larve du criocère, b- Adulte de criocère, c- Dégât de criocère sur la feuille.)

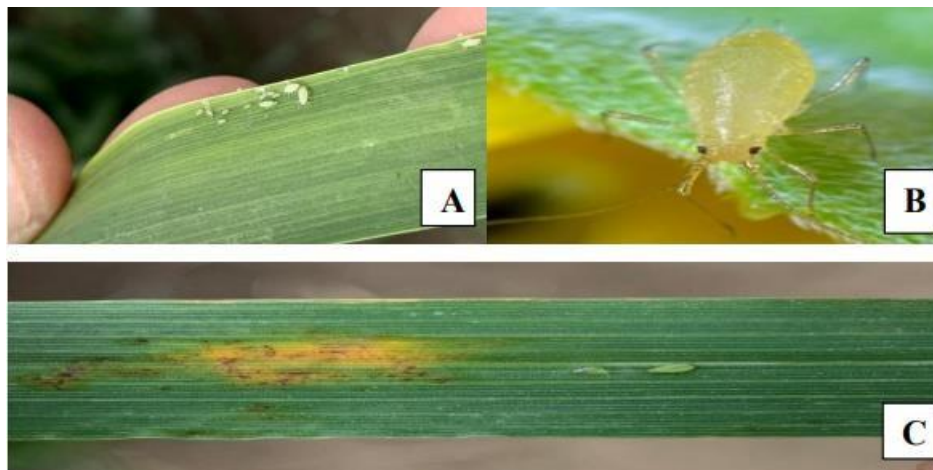


Figure 4 : l'effet du puceron sur les feuilles, (a et b Insecte puceron, c- Dégât du puceron sur la feuille.)

- Les nématodes : sont connus comme étant des ravageurs, leur dégât dépend de la quantité des œufs qui se trouvent dans le sol. Les nématodes du Blé *Anguilules* (*Anguina tritici*).
- Les oiseaux : les céréales attirent les oiseaux depuis le stade laiteux jusqu'à la maturité, les oiseaux

Comme le corbeau freu (*corvus frugilenus*) et en Algérie les moineaux.

- Les pathogènes : le Blé peut être attaqué par des champignons, bactéries et virus. Ces derniers peuvent provoquer plusieurs symptômes et générer des impacts sur le rendement et ou la qualité du Blé.

I.8.2 Stress thermique

Le rôle crucial de la température dans la régulation de la croissance et du développement des cultures, et donc de leur rendement, est largement reconnu. Le blé, cultivé mondialement, est apprécié pour sa capacité à résister à une large gamme de températures. Sa survie se situe entre des limites de température létales d'environ $47,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ et $-17 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$. Approcher l'une de ces limites a des effets néfastes sur la croissance et le développement des plantes. Comme pour le stress osmotique, l'effet du stress thermique sur la production de blé dépend fortement du stade de développement du blé, influencé par les températures du sol environnantes. Les retards de germination et d'émergence peuvent altérer la densité des plantes et l'établissement précoce de la culture, ce qui entraîne une prévalence de températures élevées pendant l'anthesis et la formation des graines, conduisant à des pertes significatives de rendement. Ainsi, la température est une variable significative déterminant les pratiques agricoles telles que le moment des semis et de la récolte. Par conséquent, les fluctuations de température pendant la saison de croissance peuvent entraîner des pertes de récolte graves. (**Kumar *et al.*, 2018**)

I.8.3 Stress du froid

Le stress causé par le froid est particulièrement préoccupant pour le blé cultivé dans les cultures hivernales des régions tempérées et arides. L'exposition à des températures froides altère divers processus biochimiques, y compris la photosynthèse, et peut causer des lésions membranaires, réduisant ainsi les performances des plantes. Le durcissement des cultures est crucial, notamment pour les cultures de blé hivernales, où les semis s'adaptent progressivement aux conditions de refroidissement. Ce processus aide à atténuer les dommages et à améliorer la tolérance au stress grâce à divers mécanismes, notamment la préservation de l'appareil photosynthétique. Pendant la phase de reproduction, le blé est particulièrement sensible au stress causé par le froid, ce qui peut affecter le nombre de grains avant l'anthesis. Les températures froides peuvent perturber le développement des tissus des gamétophytes, en particulier des cellules tapétales du pollen, conduisant à la stérilité du pollen. De plus, l'allongement du tube pollinique est perturbé par le stress à basse température. (**Matija *et al.*., 2018**)

I.9 Caractéristiques morphologique de la plante

Comme toutes les céréales, la plante de blé est un organisme vivant qui peut être subdivisé en deux parties :

Le système racinaire est une partie souterraine qui permet la communication entre le sol et les plantes.

une partie aérienne facilite les échanges entre la plante et l'atmosphère, en particulier le processus de photosynthèse et de transpiration. (Hadria *et al.*, 2006).

Du point de vue morphologique, le blé dur se distingue du blé tendre par un feuillage plus clair, entièrement glabre. Selon (Olmedo *et al.*, 1995), l'appareil végétatif présente un tallage faible, une chaume longue et une souplesse. Le rachis de l'épi est solide, avec de 15 à 25 épillets composés chacun de 3 à 4 fleurs.

La structure de celles-ci met en évidence une caractéristique essentielle : l'autofécondation, le blé dur, tout comme le blé tendre, étant autogame (Parts *et al.*, 1971). Selon Soltner (2005) et Hadria (2006), le grain présente une grande taille, une section triangulaire très riche en albumen et une texture vitreuse. (Yaakoub et Delloumi 2017).

I.10 Le grain de Blé

Le grain de Blé est un fruit, plus précisément un fruit sec, contenant une seule graine. Ses parois ont fusionné avec le tégument de la graine pour constituer « l'enveloppe » du grain de Blé ; ce genre de fruit est nommé « caryopse » (Egginger *et al.*, 2018)



Figure 5 : Variation de la taille et de la forme des grains dans le blé tétraploïde (modifié de

Desiderio *et al.*, 2019)

I.10.1 Origine du grain de Blé

Comme tous les fruits, le grain de blé a pour origine la pollinisation du pistil d'une fleur. Chez les graminées, les inflorescences se font en épis, constitués d'épillets. Chaque épillet contient quatre fleurs, peu visibles et peu odorantes (peu attractives pour l'insecte), possédant de longues étamines et un stigmate plumeux : ces fleurs n'utilisent pas l'insecte pour leur pollinisation, mais le vent. (Egginger *et al.*, 2018)

I.10.2 Anatomie du grain de Blé

La paroi du fruit étant très mince, on pourra avec les élèves assimiler le grain de blé à une graine. Comme toutes les « graines », le grain de blé contient un embryon en dormance (plantule), des réserves nutritives (albumen), le tout protégé par une enveloppe. (Egginger *et al.*, 2018)

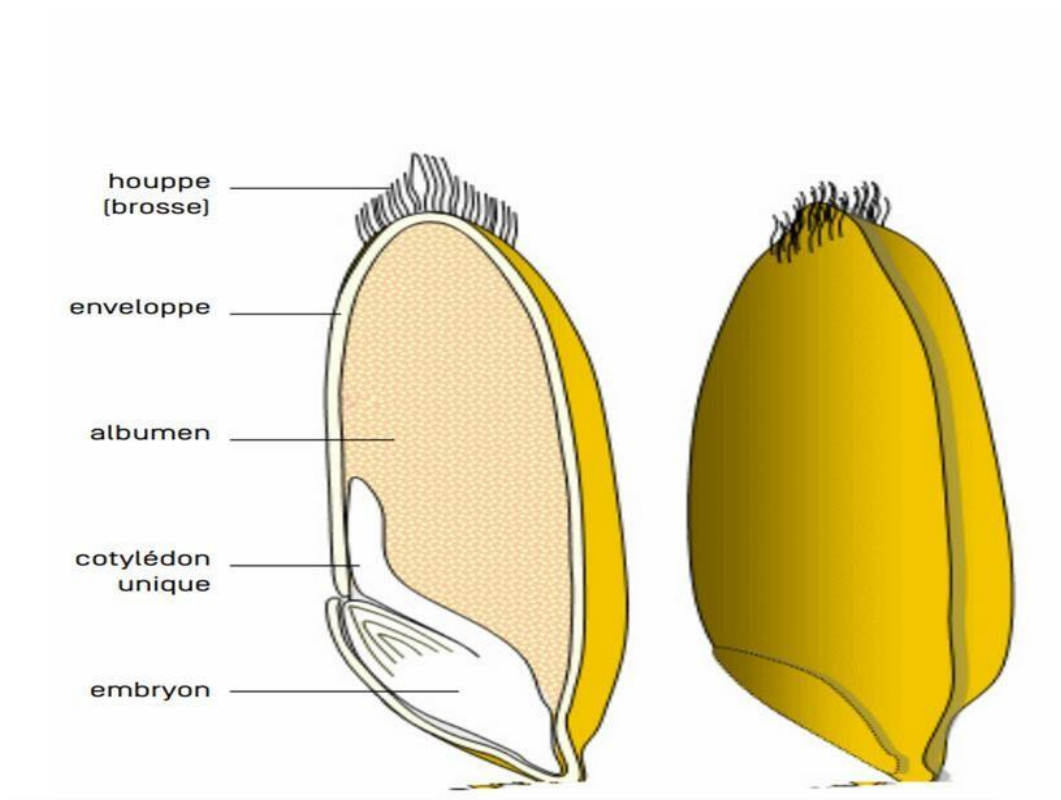


Figure 6: Blé en coupe longitudinale et vu de l'extérieur. (Alain Gallien *et al.*, 2009)

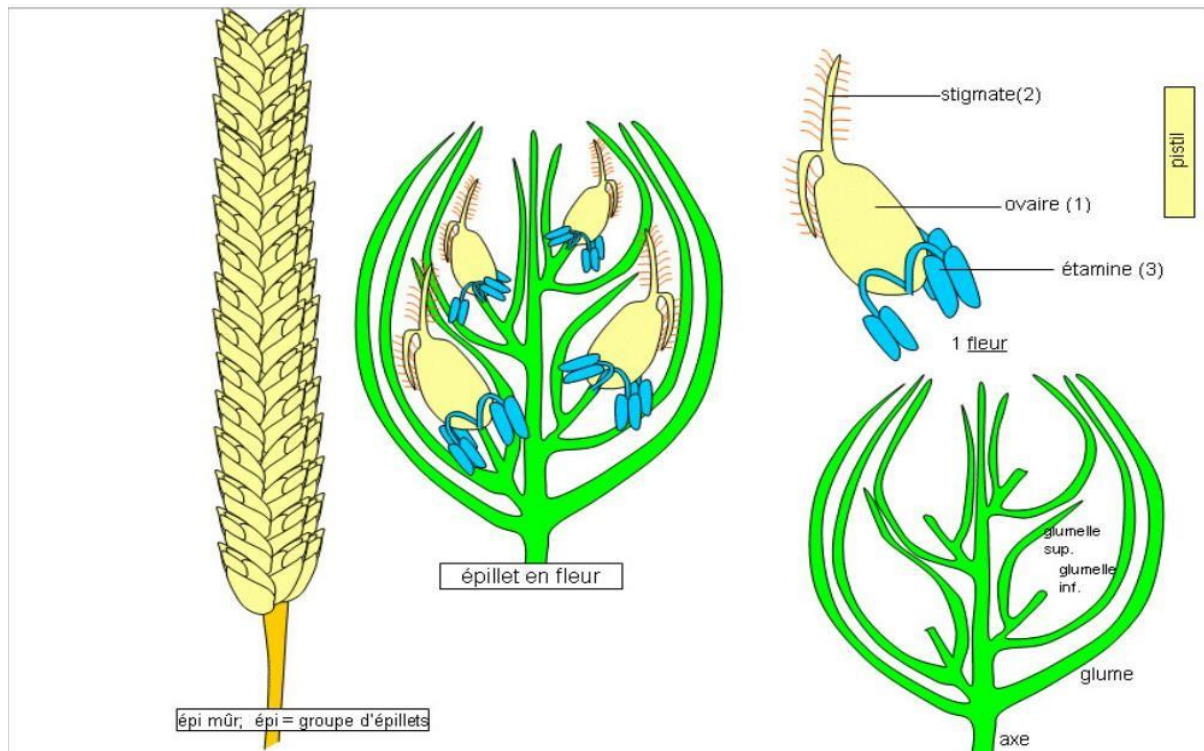


Figure 7 : Épi, épillet et fleur de blé. (Auzoux et *al.* 2018)


I.10.3 Composition du grain du Blé



Selon Titouan Bonnot en 2016 Le grain de blé est composé de trois parties principales : l'albumen ou amande farineuse (80-85%), les enveloppes ou son (13-16%), et le germe (2-3%). L'albumen en est principalement constitué d'amidon (70% de la matière sèche) et de protéines (10-15%). Les enveloppes sont riches en fibres (majoritairement insolubles), en minéraux et en vitamines B. Le germe, bien que très petit, est la partie la plus riche en éléments nutritifs, notamment en lipides, vitamines B et E. Sur le plan chimique, le grain de blé contient également des hémicelluloses (8-10%), principalement des arabinoxylanes, des lipides (1,5-2%) concentrés dans le germe, des minéraux (1,5-2%), des vitamines du groupe B (B1, B3, B5, B6) et de la vitamine E. La composition du grain de blé varie en fonction des variétés, des origines géographiques et des techniques de mouture. Le son, riche en fibres et nutriments, est souvent éliminé lors du raffinage de la farine, appauvrissant ainsi sa valeur nutritionnelle. (Bannot ., 2016)




I.11 Principales maladies fongiques du blé

Les maladies fongiques du blé sont causées par divers champignons qui peuvent affecter différentes parties de la plante, entraînant des pertes de rendement et de qualité. (Jean .Y,et al (2023)

Tableau 1 : Principales maladies fongiques du blé et des champignons responsables, d'après les informations fournies par Jean Yves Maufras 2023 :

| Maladies fongiques | Champignon responsable | Caractéristiques | Figures |
|--------------------|------------------------|--|---|
| L'oïdium | Blumeria graminis | L'oïdium est causé par le champignon <i>Blumeria graminis</i> . Il se manifeste par un feutrage blanc sur les tiges, feuilles et épis, qui devient brun et gris avec de petits points noirs. L'oïdium peut gravement affecter le rendement si l'épi est atteint. |  |

| | | | |
|----------------|-----------------------------|---|--|
| Les fusarioses | Fusarium | <p>Les fusarioses regroupent plusieurs maladies causées par des champignons du genre <i>Fusarium</i>. Elles altèrent le rendement et la qualité des grains, avec production de mycotoxines comme le DON. <i>F. graminearum</i> est l'espèce principale, responsable d'une couleur rose-orangée sur le rachis.</p> |  |
| La septoriose | <i>Zymoseptoria tritici</i> | <p>La septoriose est causée par le champignon <i>Zymoseptoria tritici</i>. Elle provoque l'apparition de taches brunes sur les feuilles, réduisant la surface foliaire photosynthétique et donc les rendements.</p> |  |

| | | | |
|------------------|---------------------------------------|--|--|
| La rouille brune | Puccinia recondita | La rouille brune est une maladie qui apparaît généralement assez tardivement au printemps. Elle est causée par le champignon Puccinia recondita. |  |
| La rouille jaune | Puccinia striiformis | La rouille jaune peut être très nuisible sur des variétés sensibles en cas d'attaques précoces. Elle est provoquée par le champignon Puccinia striiformis. |  |
| Le piétin-verse | Oculimacula acuformis et O. yallundae | Le piétin-verse est causé par les champignons Oculimacula acuformis et O. yallundae. Il affaiblit la base de la tige, favorisant la verse. |  |

I.12 Lutte contre les maladies génétiques de blé

Tableau 2 : Les principales stratégies de lutte contre les maladies du blé préconisées par ARVALIS (ARVALIS *et al.* , 2018).

| Les stratégies | Définitions et explications |
|--|--|
| 1) Résistance génétique | Est une méthode clé pour réduire les maladies fongiques du blé. Avec 70 gènes de résistance (Lr) identifiés sur le génome du blé tendre, la résistance génétique est une approche primordiale pour réduire les maladies. |
| 2) Adaptation aux conditions climatiques | Il est essentiel de prendre en compte le contexte de la saison et les conditions climatiques pour ajuster les programmes de lutte contre les maladies en cours de campagne. Les conditions climatiques influent sur le développement des maladies, et il est crucial d'adapter les programmes en conséquence |
| 3) Utilisation de fongicides | Les fongicides, notamment les SDHI, ont confirmé leur efficacité dans les programmes de traitement contre les maladies fongiques du blé. Ils sont compétitifs par rapport aux solutions existantes, à condition d'adapter les doses en fonction de la pression des maladies |
| 4) Facteurs influençant les maladies | Des pratiques agronomiques telles que la date de semis, le travail du sol, la rotation des cultures, la densité de semis et la fertilisation azotée peuvent également influencer la pression des maladies fongiques du blé. |

En résumé, la lutte contre les maladies génétiques du blé implique une approche intégrée combinant la résistance génétique, l'adaptation aux conditions climatiques, l'utilisation de fongicides et des pratiques agronomiques appropriées pour réduire l'impact des maladies

Fongiques sur les cultures de blé. (**ARVALIS *et al.*, 2018**).

II. Génétique Moléculaire et Édition Génétique CRISPR-Cas9.

II.1 Les protéines de choc thermique *HSPs*

Lorsqu'ils sont exposés à des températures élevées, tous les organismes, des procaryotes aux eucaryotes, répondent en induisant ou en renforçant l'expression des protéines de choc thermique (*HSPs*). Les *HSPs* sont des protéines qui semblent fonctionner dans tous les types de cellules et se forment lorsque la cellule est soumise à un stress environnemental, tel que le stress thermique. Le stress thermique est l'un des stress environnementaux qui peuvent provoquer la production de *HSPs*. Les hydroponiques peuvent être induites et inhibées sous plusieurs stress, tels que l'éthanol et les métaux lourds, le manque d'oxygène, etc. Les *HSPs* fonctionnent correctement comme (MC) pour garantir que les protéines correctes sont formées correctement dans les cellules. En 1962, Ritossa a découvert que les glandes salivaires de la mouche des fruits *Drosophila melanogaster* contiennent des structures inhabituelles qui gonflent lorsqu'elles sont soumises à des chocs thermiques à long terme, ce qui a également été remarqué par [106]. Ils ont montré que c'est une maladie héréditaire due à une augmentation de l'expression des protéines de choc thermique, qui est une réponse à des conditions environnementales anormales. Les protéines de stress sont impliquées dans la dégradation lysosomale et ubiquitine-protéine. La réponse au stress cellulaire induit des protéines qui soutiennent les mécanismes de réparation et de recyclage de la cellule. La chaleur, les conditions oxydantes et les produits chimiques toxiques influencent les protéines cellulaires ; ainsi, toutes les cellules produisent des *HSPs*. Expériences. Salmonella, levure, mouches, souris, rats. Greene a démontré que l'augmentation de ces protéines peut guérir les dommages induits par le stress. (Aljohan *et al*, 2022)

Les protéines principales produites par les eucaryotes appartiennent à six classes distinctes : *Hsp100*, *Hsp90*, *Hsp70*, *Hsp60* (chaperonines), les petites protéines de poids moléculaire d'environ 17 à 30 kDa (*sHsps*), et l'ubiquitine (8,5 kDa). Les *Hsps* de poids moléculaire élevé se caractérisent par une homologie de séquence élevée chez les plantes. Cependant, même les familles de gènes *Hsp* étroitement liées présentent des différences dans leurs fonctions spécifiques. De plus, les homologues *Hsp* appartenant à la même famille fonctionnent également dans différents compartiments cellulaires. Les *Hsps* présentent de grandes différences chez les plantes entre les eucaryotes (.EFEOĞLU, 2009)

II.2 Le gène hsp70

La protéine de choc thermique (*HSP*) sont une classe de protéines ubiquitaires et hautement conservées qui montrent une expression accrue en réponse à une température élevée ou à autres formes de stress environnemental. Elles sont proposées comme étant fondamentales et essentielles pour la survie cellulaire. Les *HSP* peuvent être produites à des stades particuliers du cycle cellulaire ou pendant le développement en absence de stress, ou être présentes de manière constitutive dans les cellules normales et stressées.

Les protéines de choc thermique de 70 kda (*HSP70*) sont codées par une des principales familles multigéniques de *HSP* et sont ubiquitaires chez les eucaryotes et les procaryotes. Chez les eucaryotes, les membres des *HSP70* sont situés dans les principaux compartiments subcellulaires, y compris le cytoplasme, la lumière du réticulum endoplasmique, la matrice des mitochondries et les chloroplastes des plantes. Les différentes localisations subcellulaires impliquent à la fois une distinction fonctionnelle et une divergence phylogénétique. Les *HSP70* appartiennent à une des familles de protéines les plus conservées.

Les caractéristiques distinctives une protéine *HSP70* sont un domaine ATPase amino-terminal conservé. Les protéines *HSP70* sont composées d'un domaine de liaison au peptide carboxyle (C) terminal d'environ 25 kda, qui est ensuite subdivisé en un sous-domaine de sandwich bêta de 15 kda et un sous-domaine alpha-hélicoïdal C-terminal. Les *HSP70* fonctionnent comme des chaperons moléculaires dans le repliement et le reliage des protéines non natives pour prévenir l'agrégation irréversible, et jouent des rôles dans les processus de transport et d'assemblage des protéines. Ils interagissent également avec les protéines de transduction de signal, et cela n'est pas nécessairement lié à leur fonction de chaperon. Les *HSP70* sont fondamentales dans les processus de développement et fonctionnent dans le stress environnemental, notamment la chaleur, le froid, les métaux lourds, le déficit en eau, le stress oxydatif (Duan *et al*, 2011).

II.3 Extraction d'ADN à partir des végétaux

L'isolement et la purification de l'ADN sont des étapes cruciales dans les techniques moléculaires de l'ADN utilisées dans les études sur les plantes pour identifier les genres, les caractéristiques économiques associées aux gènes d'intérêt et la diversité génétique. La mesure fiable de la concentration et de la pureté de l'ADN est également importante pour évaluer la sécurité alimentaire, notamment avec l'augmentation des superficies mondiales

Cultivées de cultures génétiquement modifiées. Pour faciliter la protection de la biodiversité et garantir l'utilisation rationnelle de ces cultures génétiquement modifiées, des mesures adéquates de pureté, de qualité et de quantité d'ADN présentes dans ces produits doivent être déterminées pour se conformer aux exigences de réglementation en matière d'étiquetage (Aboul Maaty et Oraby ,2019).

II.4 Différentes méthodes d'extraction de l'ADN chez les végétaux

II.4.1 Méthode CTAB (méthode au bromure de cétyltriméthylammonium)

Le protocole le plus largement utilisé actuellement pour l'extraction d'ADN végétal est le protocole d'extraction d'ADN basé sur le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB), développé il y a près de 40 ans et toujours considéré comme la méthode "standard" pour isoler de l'ADN de haute qualité à partir de tissus végétaux. Cependant, l'extraction au CTAB est un processus complexe et long, impliquant plusieurs étapes, notamment : Le broyage mécanique des tissus végétaux (comme les feuilles) à l'aide d'un mortier et d'un pilon ,La lyse cellulaire basée sur le CTAB L'extraction de l'ADN en phase organique , La précipitation et la purification de l'ADN avec l'aide d'alcool (Paul *et al*, 2019).

II 4.2Méthode phénol-chloroforme

Cette méthode utilise l'extraction d'ADN Dans ce protocole général, Fragmentation et dissociation des substances colorées, Digestion des composants cellulaires ,Élimination des contaminants à l'aide de solvants organiques, Récupération de l'ADN par précipitation avec de l'alcool et du sel, Réhydratation de l'ADN précipité, Digestion des protéines et de l'ADN des cellules en utilisant des enzymes et des détergents tels que la protéinase K et le dodécyl sulfate de sodium. Ajout d'un volume équivalent de phénol saturé en eau à l'échantillon d'ADN aqueux ,Agitation vigoureuse. Séparation des phases par centrifugation. Transfert soigneux de la couche aqueuse supérieure dans un nouveau tube, en évitant l'interface du phénol .Ajout de chloroforme pour extraire le phénol résiduel de la phase aqueuse. Concentration de l'ADN par précipitation à l'éthanol en présence de sel .Lavage à l'éthanol à 70% suivi du séchage de l'ADN précipité dans un concentrateur de vide, puis dissolution dans un tampon à faible teneur en sel. Approprié pour l'extraction de l'ADN à partir d'un large éventail de types cellulaires et de substances colorées (Köchls *et al*, 2005)

II 4.3 Méthode Dneasy Plant Mini Kit

Les kits ADN easy Plant utilisent une technologie avancée basée sur des membranes de gel de silice et des procédures de rotation simples pour isoler complètement l'ADN cellulaire pur à partir de tissus et de cellules de plantes ou de champignons. La technologie dneasy remplace les procédures d'isolement d'ADN fastidieuses telles que l'extraction au CTAB, au phénol ou au chloroforme. En utilisant la méthode Dneasy, il n'est pas nécessaire de précipiter l'ADN avec de l'alcool – l'ADN purifié est prêt à être utilisé immédiatement. Les tests d'absorption de l'ADN purifié par Dneasy montrent un pic symétrique à 260 nanomètres, confirmant que l'ADN est exempt d'impuretés, y compris les inhibiteurs enzymatiques. La technologie de préparation des échantillons Dneasy est entièrement brevetée, ce qui permet d'utiliser les acides nucléiques purifiés par Dneasy dans n'importe quelle analyse moléculaire ou application sans risque de violation de brevet (AYDIN *et al*, 2020).



Figure 8 : QIAcube Connect. (Dneasy Plant Pro Kit Handbook, 2019)

II .5 La technique de CRISP Cas 9

II 5.1 Histoire de la découverte de CRISPR cas9

Les répétitions CRISPR des groupes de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées ont été découvertes pour la première fois dans des séquences; ADN de la bactérie *Escherichia coli* et décrites en 1987 par Ichino et al. À l'époque, il fallait plusieurs mois pour séquencer ces fragments difficiles, mais la localisation ou l'importance de ces fragments dans la cellule bactérienne n'était pas comprise avant leur découverte. Bien que dans les premiers travaux dans ce domaine, la fonction biologique du système CRISPR n'ait pas encore été élucidée, les scientifiques ont déjà présenté un moyen utilisé les informations codées dans les sites CRISPR dans la recherche médicale, notamment pour déterminer les génotypes de différentes souches de bactéries. : Initialement sur *Mycobacterium tuberculosis* puis sur *Streptococcus biogenase*. Il s'est avéré que les locus CRISPR présentaient un degré élevé de variabilité génétique dans différentes souches du même type de bactérie pathogène, ce qui a permis l'identification de souches bactériennes en milieu clinique. Un tournant majeur dans la compréhension de la fonction biologique des loci CRISPR est produit avec la découverte de Francisco Mojica de Université Alicante (Espagne), qui a découvert des structures similaires dans ancien génome du microbiome *haloferax mediterranei* en 1995 [4]. La présence de ces éléments dans deux domaines de vie évolutivement éloignés a démontré une grande importance fonctionnelle de ces éléments et a incité à des recherches plus approfondies. Mujica a noté la similitude entre les éléments qui il a décrits dans les mondes antiques avec les itérations précédentes de ADN dans des générations de bactéries, et a été un des premiers scientifiques à émettre hypothèse que ces sites inhabituels contenaient des fragments ADN étranger et faisaient en réalité partie du système immunitaire (**Gostimskaya et al, 2022**).

Mécanisme moléculaire de cette réponse immunitaire a été élucidé en 2012 ; deux articles ont démontré que les regroupements CRISPR sont transcrits en ARN, qui est ensuite clivé et chargé dans les protéines associées à CRISPR (cas) (cas9, dans ce cas). Ce complexe ARN-protéine est suffisant pour l'activité endonucléase de l'ARN guidée par l'ARN. Ont démontré que cas9 pouvait être reprogrammé pour cibler de nouvelles séquences avec un ARN guide unique transcrit *in vitro* (sg RNA). Ce groupe a également montré que deux changements d'acides aminés à cas9 pourraient rendre ses domaines nucléases non fonctionnels, un concept qui a été saisi par d'autres groupes pour développer de nouveaux outils pour réguler l'expression génique (**Pourcel c ,et al .(2017)**).

II 5.2 Classification de CRISPR/Cas9 Système

Les chercheurs Haft et ses collègues ont tenté initialement de catégoriser le système CRISPR/Cas9. Ils ont identifié 45 familles de protéines liées au CRISPR (Cas), huit sous-types de CRISPR/Cas, et l'unité RAMP présente dans les génomes bactériens. Selon Makarova et ses collègues, les systèmes CRISPR/Cas9 peuvent être divisés en trois catégories distinctes : type I, type II et type III. Ces catégories sont caractéristiques du processus de clivage de l'ADN guidé par ARN. La séquence d'ADN de 20 paires de bases qui doit être éditée doit être située immédiatement en amont d'une séquence PAM pour que le système CRISPR/Cas9 soit fonctionnel. Il existe de nombreux vecteurs différents pouvant être utilisés pour l'édition du génome dans divers organismes, tels que pRGE31, pRGE31, lentiCRISPR v2, eSPCas9 (1.1), et d'autres. Ces vecteurs contiennent toutes les séquences nécessaires et permettent le clonage de l'ARN guide généré pour un gène spécifique. Cette étape est suivie de la transformation des plantes par transformation médiée par *Agrobacterium*. À l'intérieur des cellules végétales, l'ARN guide fournit des instructions à l'enzyme CAS9, lui indiquant de cliver la séquence cible. Cela déclenche à son tour le mécanisme de réparation de l'ADN, tel que NHEJ. En raison du fait que ces systèmes de réparation de l'ADN sont sujets aux erreurs, ils entraînent des mutations décalées, ce qui conduit à une édition de gènes spécifique. Ces mutations sont causées par des insertions et des délétions. (Das, K *et al.* ,2023).

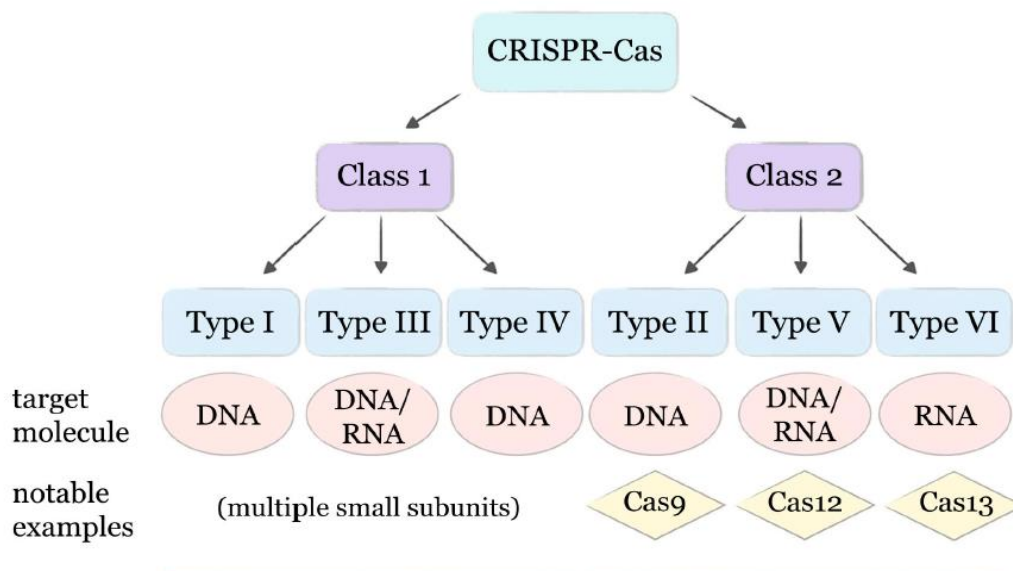


Figure 9: Classification de Système CRISPR/Cas9 (Gostimskaya I,2022)

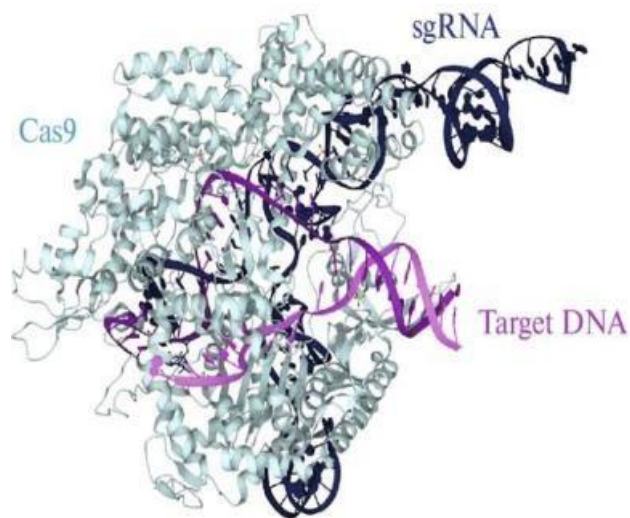


Figure 10 : Structure montrant l'action de CRISPR cas9 et sgARN.

II 5.3 Application de CRISPR / Cas9 dans les maladies des plantes

Les méthodes efficaces d'édition du génome, telles que CRISPR/Cas9, présentent de multiples possibilités dans la lutte contre les maladies des plantes. Il est possible de conférer des caractéristiques souhaitables et de modifier le génome des maladies des plantes pour diverses applications, offrant ainsi un cadre expérimental pour étudier l'activité génique dans tout le génome des plantes. Les techniques CRISPR/SpCas9 offrent des méthodes souvent plus efficaces et parfois plus faciles que les approches traditionnelles de modification génétique, qui sont souvent associées à une recombinaison homologue inefficace. Elles permettent également de modifier efficacement le génome des bactéries, renforçant ainsi la résistance aux maladies des plantes. (Das *et al*, 2023).

Les principales applications du système CRISPR/Cas9 dans la lutte contre les maladies des

Plantes sont:

- Résistance aux maladies fongiques.
- Résistance aux virus.
- Résistance aux bactéries.
- Réduction de la teneur en gluten. . (**Das et al, 2023**).

III. Bioinformatique et base de données.

III 1 .Introduction de bioinformatique

Association de la biologie et de l'informatique afin d'analyser, modéliser ou prédire les informations issues de données biologiques expérimentales et développer les outils nécessaires. Concevoir des méthodes de traitement de l'information inspirées des systèmes biologiques permettant de résoudre des problèmes algorithmiques complexes, (algorithmes génétiques, réseaux de neurones formels, etc...) À l'interface entre biologie, informatique et mathématiques, la bioinformatique analyse et interprète, au moyen de méthodes informatiques, les données biologiques que sont les séquences des gènes et des protéines cellulaires, et apporte ainsi de nouvelles connaissances sur le fonctionnement des cellules et des organismes vivants. La bioinformatique est définie comme l'utilisation de bases de données et d'algorithmes informatiques pour analyser les gènes, les protéines, et la collection complète d'acide désoxyribonucléique (ADN) d'un organisme vivant (le génome). Un défi majeur en biologie consiste à comprendre les énormes quantités de données de séquence et de données structurales générées par les expériences biologiques (ex : les projets de séquençage). Elle est basée sur l'Analyse de la séquence, et de l'expression, la prédiction de structure et la Phylogénie pour comprendre les systèmes de régulation, étudier les interactions moléculaires et reconstituer ainsi l'histoire de la «vie». (Schulze., *et al* 2002)

III 2. Les bases de données

III 2.1 Méthodes et applications d'alignement de séquences

L'alignement de séquences est l'arrangement de deux ou plusieurs séquences d'acides aminés ou de nucléotides provenant d'un ou plusieurs organismes de sorte que les séquences partageant des propriétés communes soient alignées. Le degré de parenté ou d'homologie entre les séquences est prédit informatiquement ou statistiquement sur la base des poids attribués aux éléments alignés entre les séquences. Cela peut à son tour servir d'indicateur de la parenté génétique entre les organismes (Baxevanis et Oullette, 2001) (Vassilev *et al* ., 2006)

III 2.2. Outils de comparaison de génomes

MegaBlast est un algorithme basé sur NCBI BLAST pour la recherche de similarités de séquences de grande taille (Hesslop-Harrison, 2000). MegaBlast met en œuvre un algorithme glouton pour la recherche d'alignements de séquences d'ADN avec des lacunes. MegaBlast

est utilisé pour comparer les séquences génomiques brutes à une base de données de séquences contaminantes, comprenant la base de données UniVec des séquences de vecteurs, le génome d'*Escherichia coli*, les séquences d'insertion bactérienne, et les bases de données de bactériophages. Toute séquence étrangère est retirée de la séquence de qualité brouillon ou masquée dans la séquence finie pour éviter leur participation à l'alignement. (Vassilev *et al* .2006)

III 2.3 Algorithmes de recherche de similarité de séquences

Smith-Waterman est un algorithme pour l'alignement local de séquences, utilisant deux séquences en entrée (Smith et Waterman, 1981). La différence entre NCBI BLAST (également un algorithme d'alignement local) et Smith-Waterman est que a) BLAST recherche une séquence dans toute une base de données de séquences; et b) BLAST calcule statistiquement le match le plus probable, tandis que Smith-Waterman calcule le match exact. (Vassilev *et al* .2006)

III 2.4. Jim Kent's BLAT

(BLAST-Like Alignment Tool) est un outil qui réalise des alignements rapides d'ARNm/ADN et de protéines entre espèces. BLAT est plus précis, 500 fois plus rapide que les algorithmes existants populaires pour les alignements ARNm/ADN, et 50 fois plus rapide pour les alignements de protéines aux réglages de sensibilité généralement utilisés lors de la comparaison de séquences de vertébrés. (Vassilev *et al* ., 2006)

III 2.5 Alignement multiple basé sur le génome utilisant BLASTZ

. BLASTZ est un programme d'alignement de séquences multiples utilisé essentiellement pour les alignements génomiques complets entre l'homme et la souris. Les résultats de BlastZ peuvent être visualisés avec le visualiser d'alignement interactif LAJ, convertis en alignements textuels traditionnels. LAJ est un outil permettant de visualiser et de manipuler les résultats des programmes d'alignement par paires tels que BLASTZ. Il peut afficher des représentations interactives en dotplot, en pip, et en texte des alignements, un diagramme montrant les emplacements des exons et des répétitions, ainsi que des liens d'annotation vers d'autres sites web contenant des informations supplémentaires sur des régions particulières. (Vassilev *et al* ., 2006).

III 3. Les avantages de la bioinformatique dans l'étude génétique des plantes

L'introduction de la bioinformatique et de la biologie computationnelle dans le domaine de la biologie végétale accélère considérablement l'invention scientifique dans les sciences de la vie. Avec l'aide de la technologie de séquençage, les scientifiques en biologie végétale ont révélé l'architecture génétique de différentes espèces de plantes et de micro-organismes, tels que le protéome, le transcriptome, le métabolome et même leurs voies métaboliques. L'analyse de séquence est l'approche la plus fondamentale pour obtenir la séquence complète du génome, telle que l'ADN, l'ARN et la séquence protéique, à partir du génome d'un organisme dans la science moderne. Le séquençage du génome entier permet de déterminer l'organisation des différentes espèces et fournit un point de départ pour comprendre leur fonctionnalité. Les données de séquence complètes comprennent des régions codantes et non codantes, qui peuvent servir de précurseur nécessaire à tout gène fonctionnel qui détermine les caractéristiques uniques des organismes. La séquence résultante inclut toutes les régions telles que les exons, les introns, le régulateur et le promoteur, ce qui entraîne souvent une grande quantité d'informations génomiques. Avec l'émergence des technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) et d'autres technologies omiques utilisées pour examiner le génome des plantes, de plus en plus de génomes de plantes séquencés seront révélés. Pour faire face à ces vastes quantités de données, le développement et la mise en œuvre de la bioinformatique permettent aux scientifiques de les capturer, de les stocker et de les organiser dans une base de données systématique (**Tan et al, 2022**).

III 4. Application de bioinformatique sur le Blé

L'amélioration du blé a été difficile, car les chercheurs ont dû surmonter les grandes difficultés pour obtenir un génome de référence séquencé en entier. Les avancées dans les plateformes de séquençage de nouvelle génération (NGS) et d'autres outils bioinformatiques ont révélé les vastes réarrangements structurels et le contenu génétique complexe dans le blé, révolutionnant ainsi la génomique du blé avec l'amélioration de son rendement et son adaptation à des environnements divers. Les plateformes NGS permettent la détection rapide des marqueurs d'ADN à partir des énormes données génomiques en peu de temps. Ces approches basées sur la NGS ont révolutionné la découverte des allèles et le génotypage par séquençage (GBS).

En fournissant un génome de référence de haute qualité du blé dans les bases de données, cela permet davantage de comparaisons de séquences entre le blé et d'autres espèces pour trouver plus de gènes homologues. De plus, le développement de technologies de séquençage à haut débit et de longueur de lecture, combiné avec les bases de données biologiques, permet le développement rapide de nouveaux algorithmes pour le génome complexe du blé. Les études d'association pangénomique (GWAS) sont une approche utilisée dans la recherche génomique qui permet un criblage rapide des données brutes pour sélectionner des régions spécifiques avec des traits agronomiques.

Cela permet de tester de multiples variantes génétiques à travers le génome pour étudier l'association génotype-phénotype. Ainsi, cette méthode peut être utilisée pour faciliter les améliorations des traits agronomiques.

Le stress biotique peut être divisé en stress biotique et abiotique. Le stress biotique fait principalement référence à l'influence négative causée par des organismes vivants tels que les virus, les champignons, les bactéries, les insectes, les nématodes et les mauvaises herbes, tandis que le stress abiotique fait référence à des facteurs tels que les températures extrêmes, la sécheresse, la salinité et les radiations qui affectent considérablement le rendement des cultures. Les technologies NGS et autres outils informatiques puissants, qui ont permis le séquençage complet du génome et du transcriptome, ont conduit à des études approfondies des plantes en réponse au stress sur une base moléculaire. La quantité énorme de données génomiques végétales obtenues à partir du séquençage du génome permet l'étude des corrélations entre la structure moléculaire des organismes vivants et leurs adaptations à l'environnement. (Tan *et al.*, 2022).

Chapitre II
Matériels et méthodes

II.1 Informations sur les échantillons du Blé étudié

Blé tendre cultivé en pots en plastique à Ouled Bouziane, Oued El Khir, Mostaganem, pendant 15 jours du mois d'Avril.

II.2 Zone d'étude

L'analyse des différents paramètres étudiés a été effectuée au niveau de notre laboratoire de la biochimie et biologie végétale à la Faculté des sciences de la nature et de la vie à l'Université Abd el-Hamid Ibn Badis à Mostaganem, Algérie.

II.3 Objectif

L'observation des feuilles de blé dans des conditions de température variable vise à évaluer l'impact de la chaleur sur la santé et la croissance des plantes. Cette expérience permet d'identifier la température qui nuit à la croissance et au développement normal des feuilles de blé. Parallèlement, l'extraction de l'ADN du blé à l'aide d'un spectromètre vise à quantifier la concentration d'ADN dans les échantillons de feuilles et de graines, ainsi qu'à examiner les différences de qualité de l'ADN entre eux. Enfin, l'analyse du gène Hsp70 et la conception d'amorces sgARN pour le système CRISPR-Cas9 visent à comprendre le rôle biologique de la protéine Hsp70 dans les plants de blé et à identifier des stratégies potentielles de modification génétique pour améliorer l'augmentation de la résistance thermique.

II .4 L'effet de la température sur les feuilles de blé

II 4.1 Optimisation de la méthode d'exposition thermique des feuilles de blé

Est Le processus d'exposition des feuilles de blé à la chaleur est un élément essentiel de la recherche agricole et du développement agricole.

L'exposition à la chaleur des feuilles de blé peut être utilisée comme un outil efficace pour comprendre l'effet de la chaleur sur la croissance des plantes et leur réponse à l'environnement. Contribue à déterminer la réponse du blé à différentes conditions de température et à identifier les souches résistantes à la chaleur. « En exposant les feuilles de blé à des températures spécifiques,

L'effet de la chaleur sur la structure et la croissance des plantes peut être analysé et ainsi, des variétés de blé mieux adaptées. Aux conditions environnementales changeantes peuvent être développées, améliorant ainsi la durabilité et la productivité de la culture du blé.

II 4.2 Matériel utilisé comprend

- ❖ Feuilles de blé (choisir des feuilles saines et homogènes).
- ❖ Journal de suivi et enregistrements.
- ❖ Microscope optique, huile.
- ❖ Chronomètre.
- ❖ Etuve.

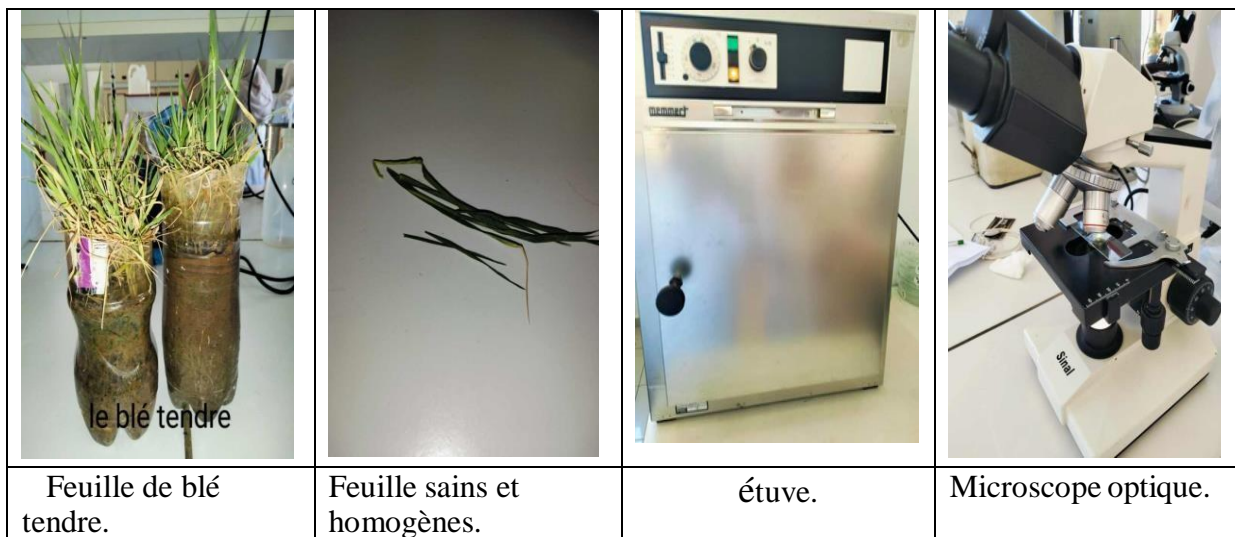


Figure 11 : Matériaux dans l'étude de la température et des feuilles de Blé.

II 4.3 Les Méthode de travail

- ✓ L'appareil est ajusté à des Les feuilles sont nettoyées et découpées pour éliminer la saleté et les impuretés. Elles peuvent être exposées à la saleté et aux impuretés qui s'accumulent sur elles provenant de l'environnement. Leur nettoyage avant l'exposition à la chaleur permet d'éliminer ces impuretés pour garantir un effet précis de la chaleur sur la plante .températures différentes, soit 40°C et 27°C.
- ✓ Un groupe est laissé à l'intérieur d'un laboratoire et utilisé comme témoin 17 °C.
- ✓ Un appareil de mesure du temps est installé pendant une demi-heure pour chaque groupe de papiers, et un microscope optique est également préparé. Un appareil de mesure du temps est ajusté pour une demi-heure par groupe de feuilles.

- ✓ Chaque groupe est mis dans un thermomètre et une heure précise est attendue pour chaque groupe.
- ✓ L'observation microscopique de chaque feuille est effectuée. L'effet de la température est observé en plaçant une goutte d'huile sur une partie de celle-ci, et un microscope optique est utilisé pour cette observation.

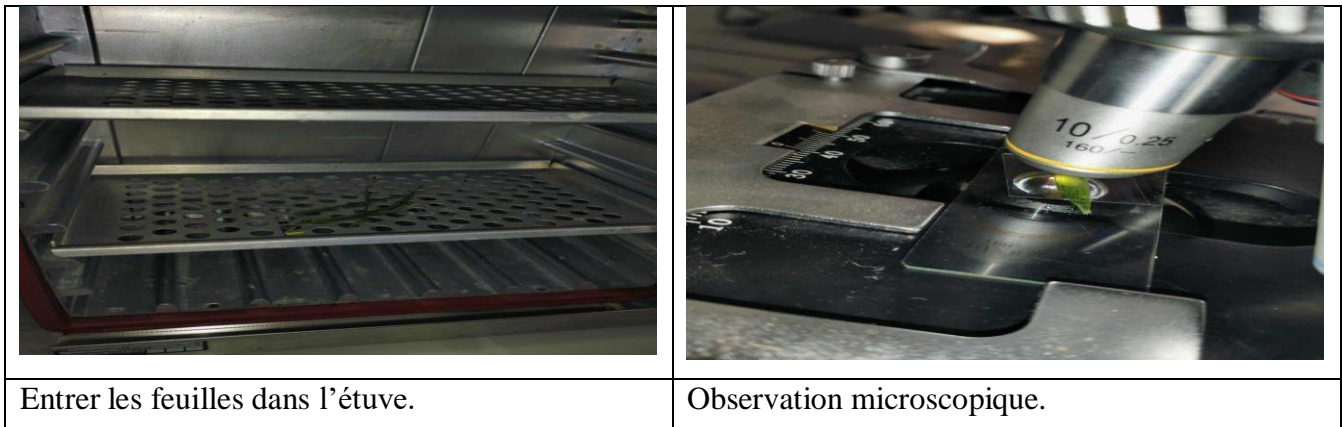


Figure 12 : Observation microscopique du feuille

II.5 Partie d'Extraction d'ADN de blé

II 5.1 Définition

L'extraction de l'ADN est un processus utilisé pour extraire l'ADN des cellules vivantes. Les étapes de base comprennent la fragmentation des cellules, puis la séparation de l'ADN du reste des composants cellulaires tels que les protéines, les lipides et autres acides nucléiques. Ce processus est utilisé dans de nombreuses applications, notamment la recherche scientifique, le diagnostic de maladies, les rapports médico-légaux et le développement agricole. L'extraction de l'ADN est l'étape la plus importante de toute étude des gènes considérés comme faisant partie de l'évolution biologique.

II 5.2 Extraction d'ADN à l'éthanol

La méthode d'extraction de l'ADN à l'éthanol est l'une des méthodes couramment utilisées en biologie moléculaire pour séparer et purifier l'ADN des échantillons biologiques. Cette méthode est basée sur la précipitation de l'ADN par ajout d'éthanol, ce qui entraîne la précipitation de l'ADN sous forme d'éthanol glycol. Cette séparation est basée sur la différence de densité des substances

Présentes dans le mélange, l'ADN étant plus dense que l'éthanol. Cette méthode est efficace pour extraire de l'ADN de haute qualité et de grande pureté. (STEIN, *et al.*2001).

II 5.3 Matériel utilisé dans cette expérience

- ❖ Feuilles de blé tendre vert et grains moulus du même type.
- ❖ Bécher, tubes à essai, balance, cuillère, calibre.
- ❖ tubes sec, agitateur, coton tige, Passoire. Mortier et pilon

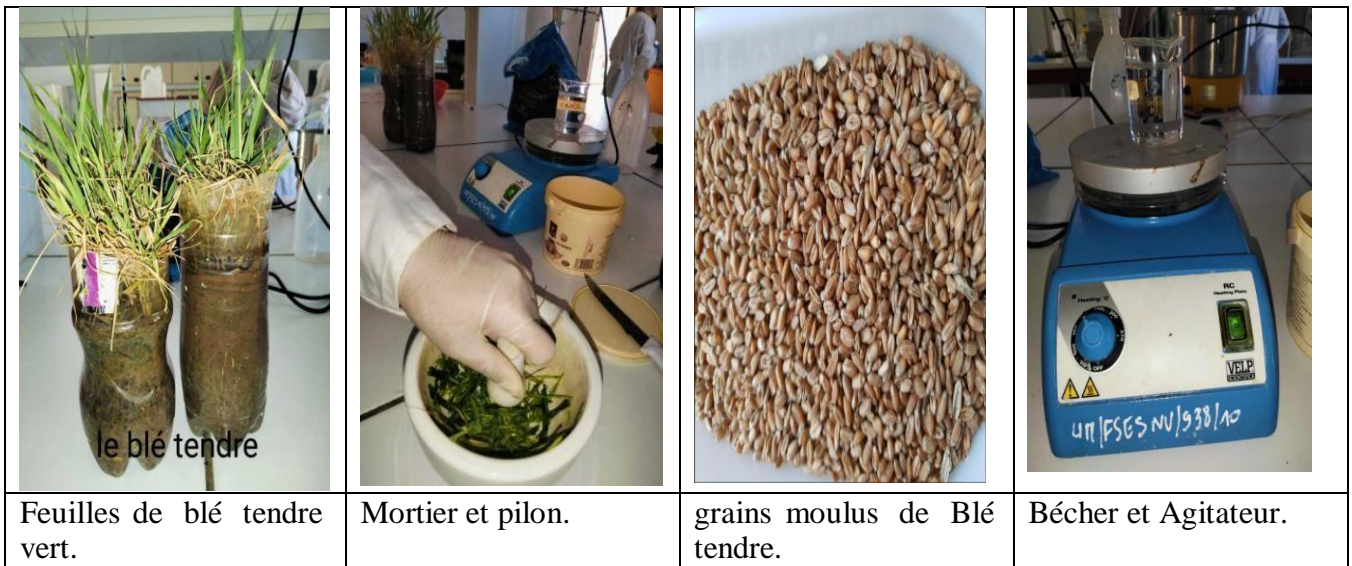


Figure 13 : Éléments utilisés dans l'extraction d'ADN

II 5.4 Les solutions utilisé

- ❖ L'eau plus sel
- ❖ Détergent (Isis)
- ❖ L'éthanol

II 5.5 Méthodologie

- Préparation des échantillons.
- Nous récoltons une quantité de feuilles de blé tendre vert, pesant 4,49 g. Nous pesons également 9,9 g de graines moulues.
- On met les feuilles à l'intérieur du Mortier et pilon et on les broie
- Placez les graines moulues dans le bécher.
- Préparation de la solution saline: On pèse 5g de sel dissous dans l'eau, 10ml de feuilles et graines pour chacune des feuilles et graines. Placez-les sur l'agitateur pour les réchauffer, puis ajoutez-les à chaque échantillon.
- Une solution saline est utilisée pour décomposer doucement les cellules et les désintégrer
- La solution saline contribue à créer un environnement propice au processus de dégradation en maintenant un équilibre de concentration en sel à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule.
- Utiliser des détergents pour éliminer les graisses
- Nous ajoutons 4 gouttes de détergent pour lave-vaisselle usagé à chaque échantillon en raison de l'absence de SDS. Cela permet d'éliminer les graisses et les lipides qui ont pu s'accumuler sur les cellules et qui peuvent affecter la qualité de l'ADN extrait.
- **Précipitation des protéines et de l'ADN à l'aide d'éthanol :**
- De l'éthanol 20 ml pour chaque échantillon est ajouté lentement aux échantillons pour précipiter les protéines et l'ADN.
- Dans des conditions appropriées, la protéine précipite sur un substrat clair qui permet de la séparer du reste de la solution.
- L'ADN précipite dans la couche supérieure de la solution, et peut être récupéré par une pipette pasteur pour obtenir une extraction pure.
- Nous mettons l'ADN extrait dans les tubes SEC.

II.6 Dosage d'ADN

II 6.1 Définition

La méthode consiste à déterminer la concentration d'ADN dans un échantillon à l'aide d'un spectrophotomètre. Le processus commence par la préparation de l'échantillon d'ADN à l'aide d'eau distillée, Après cela l'échantillon est placé dans un Spectromètre, où l'appareil mesure l'absorption de la lumière à une longueur d'onde spécifique, à : 260 280 nm. À l'aide de mesures, la concentration d'ADN dans l'échantillon est calculée. (Clark et Christopher 2000).

Cette méthode est généralement utilisée pour évaluer la pureté d'un échantillon et déterminer son aptitude à être utilisé dans des expériences moléculaires.

II 6.2 Matériel utilisé

Les échantillons d'ADN des feuilles et des graines.

L'appareil spectrophotomètre.

Les Cuves du spectrophotomètre.

L'eau distillée.

Tubes

micropipette

II 6.3 Le Protocole

1. L'appareil Spectrophotomètre a été mis en marche conformément aux instructions du fabricant.
2. Nous avons préparé le blanc, pour étalonner l'appareil, en utilisant de l'eau distillée dans une cuve propre.
3. Une petite quantité de votre échantillon d'acide nucléique a été ajoutée à 2 ml d'eau distillée dans les cuves du spectrophotomètre pour la lecture spectrale.
4. La cuve avec l'échantillon vide a été chargée et le spectre a été enregistré pour déterminer la ligne de base.
5. L'absorption a été mesurée à deux longueurs d'onde : 260 nanomètres pour l'acide nucléique et 280 nanomètres pour les protéines.

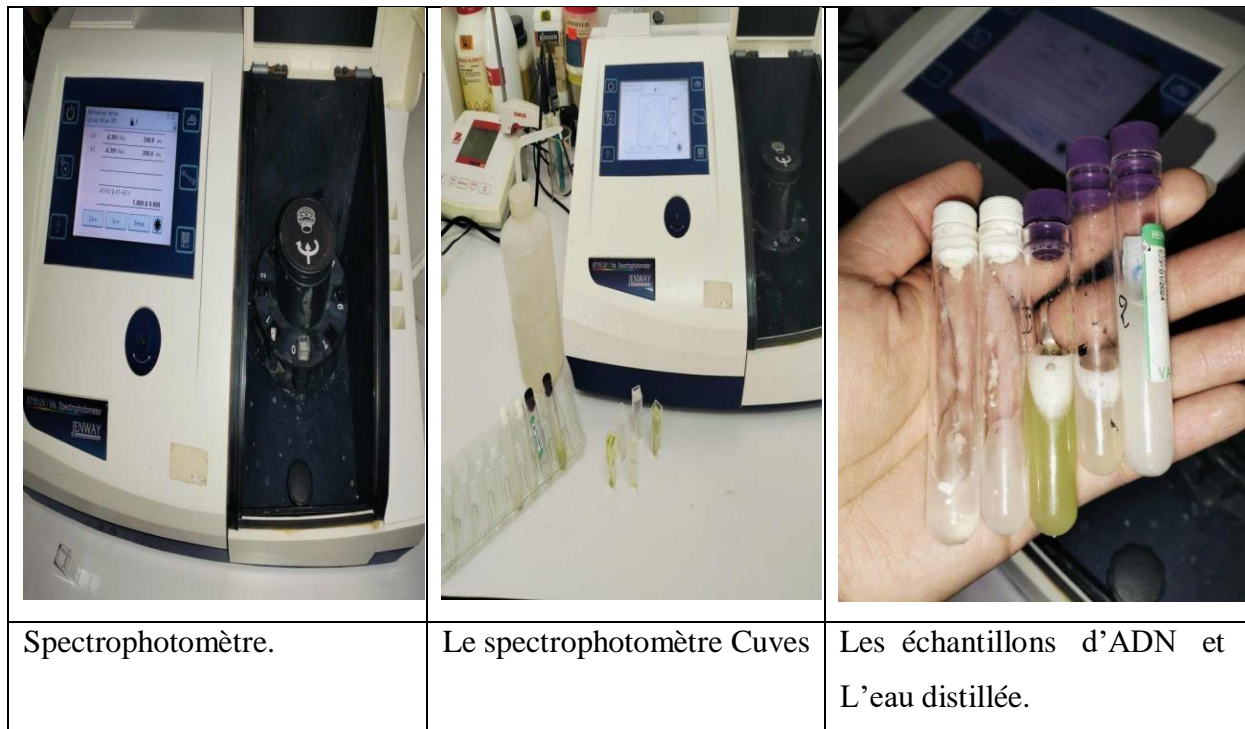


Figure 14 : Dosage d'ADN

II.7 Analyse du gène Hsp70

7.1 Désigne sgARN primer de CRISPER cas 9

Étape 1: Choisissez le gène

Le choix du gène dépend de plusieurs facteurs, allant de la compréhension de sa fonction et de son impact sur les phénomènes biologiques, à l'évaluation de sa compatibilité avec les objectifs spécifiques de l'étude ou de la recherche. L'analyse des données génétiques et des bases de données géniques est utilisée pour identifier les gènes appropriés, en tenant compte des facteurs génétiques et environnementaux qui les influencent. Ce processus est crucial dans la recherche scientifique.

Notre choix se soit porté sur le gène *Hsp70* impliqué dans la résistance du Blé aux hautes températures.

7.2 Définition Ensembl Plants

Ensembl, lancé en 2000, avait pour objectif d'automatiser l'annotation du génome, de l'intégrer à d'autres données biologiques et de fournir un accès public en ligne rapide. Initialement axé sur le génome humain, il s'est étendu pour inclure divers génomes et types de données, ce qui a conduit à la création d'Ensembl Genomes en 2009. Ce projet propose des portails spécialisés pour différents organismes, aidant à la compréhension de l'évolution et

Couvrant les organismes expérimentaux, les espèces agricoles, les agents pathogènes et les vecteurs.

En 2020, Ensembl et Ensembl Genomes ont collectivement pris en charge plus de 50 000 génomes, y compris Rapid Release pour les génomes fraîchement annotés et COVID-19 pour le génome du SARS-CoV-2. Co-dirigé par Rob Finn et Andy Yates, le projet bénéficie de l'orientation d'un conseil scientifique indépendant et implique plus de 70 individus répartis dans des équipes thématiques. Ces équipes développent des méthodes d'analyse, exécutent des analyses, construisent des ressources en ligne et interagissent avec la communauté scientifique.

Ensembl est hébergé à l'Institut européen de bioinformatique du Laboratoire européen de biologie moléculaire, situé sur le campus du Wellcome Genome à Hinxton, près de Cambridge, au Royaume-Uni. <https://plants.ensembl.org/info/about/index.html>

1) Nous utilisons le programme ensemble.plant <https://plants.ensembl.org/index.html> pour analyser l'emplacement spécifié.

The screenshot displays the Ensembl Plants website interface for *Triticum aestivum*. At the top, there is a navigation menu with links for 'HMMER', 'BLAST', 'BioMart', 'Tools', 'Downloads', 'Help & Docs', and 'Blog'. A search bar is located on the right side of the header. Below the header, the main content area is divided into several sections:

- Search:** A search bar containing the text 'HSP70' and a 'Go' button. Below the search bar, there are suggestions for search terms: 'e.g. TraesCS3D02G273600 or 3D:2585940-2634711 or Carboxy*'. To the right of the search bar, there is a yellow box with information about the assembly and annotation, including a link to the 'IWGSC announcement' and a link to the 'Ensembl Plants archive'.
- About *Triticum aestivum*:** A section providing background information on bread wheat, including its origin in the 'fertile crescent' around 7000 years ago, its genome size (estimated at ~17 Gb), and its composition of three closely related genomes (A, B, and D). It also mentions the 'Wheat Gene Catalogue' and provides a link to 'GrainGenes'.
- Gene assembly: IWGSC:** A section with a 'View karyotype' button and a 'Download DNA sequence (FASTA)' button.
- Gene annotation:** A section with a 'More about this genebuild' button and a 'Download genes, cDNAs, ncRNA, proteins - FASTA - GFF3' button. It also includes an 'Example gene' section with a 'Carboxy* CAB' gene structure diagram.

Figure15: interface du site ensembl.plant.



Figure16:Fenêtre de Triticum aestivum

2) Nous avons téléchargé le fichier génomique de notre blé sélectionné, puis saisi les informations *Hsp70* pour identifier le gène.

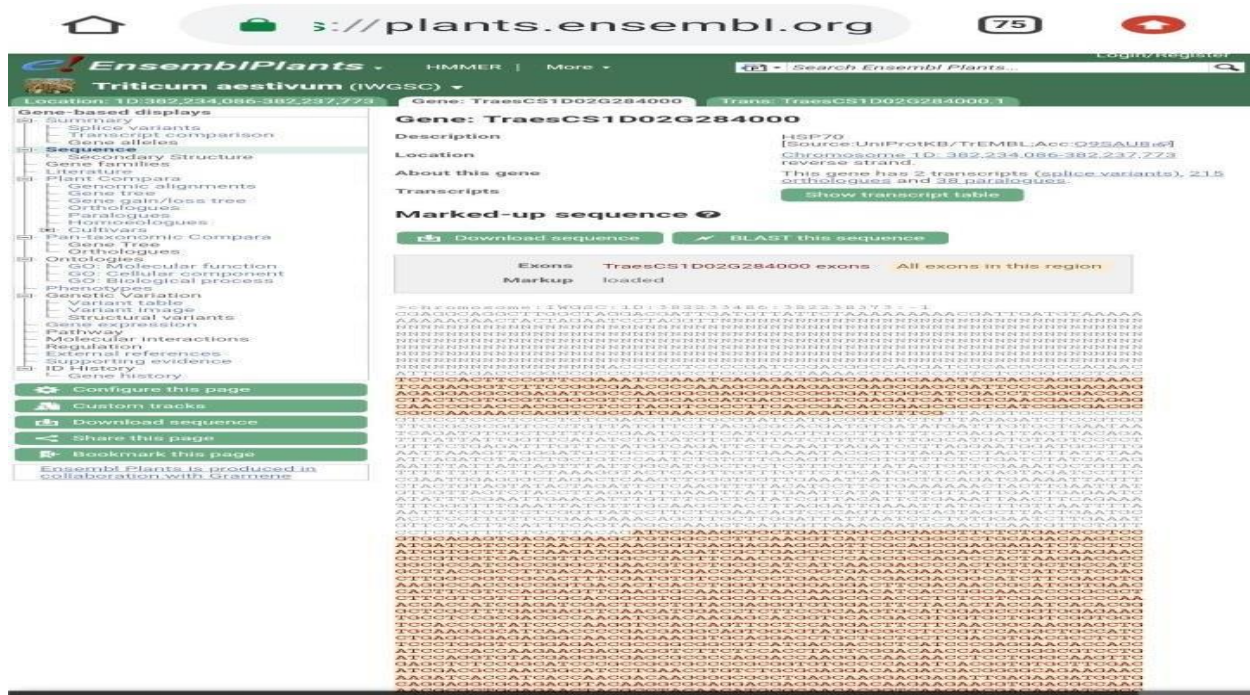


Figure17 : La séquence du gène *Hsp70* (en rouge les séquences exonique et en noire les séquences intronique).

3) Nous avons analysé les données extraites du programme pour déterminer les gènes candidats présents dans l'emplacement spécifié.

4) Nous avons choisi le gène que nous souhaitons étudier.

7.3 Etape 2: Confirmation le gène *Hsp70*.

7.4 Définition de NCBI

NCBI signifie "National Center for Biotechnology Information", c'est un organisme américain qui fournit des ressources en ligne dans le domaine de la biologie moléculaire et de la bioinformatique. Il gère plusieurs bases de données de séquences génétiques, de littérature scientifique et d'outils d'analyse pour les chercheurs en biologie <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

- Nous allons sur le web du NCBI pour Vérifier la validité d'une gène avant de concevoir quelque chose, ensuite nous sélectionnons nucléotides blast pour effectuer une recherche.
- Nous saisissons une séquence prélevée dans l'ensemble de plantes.

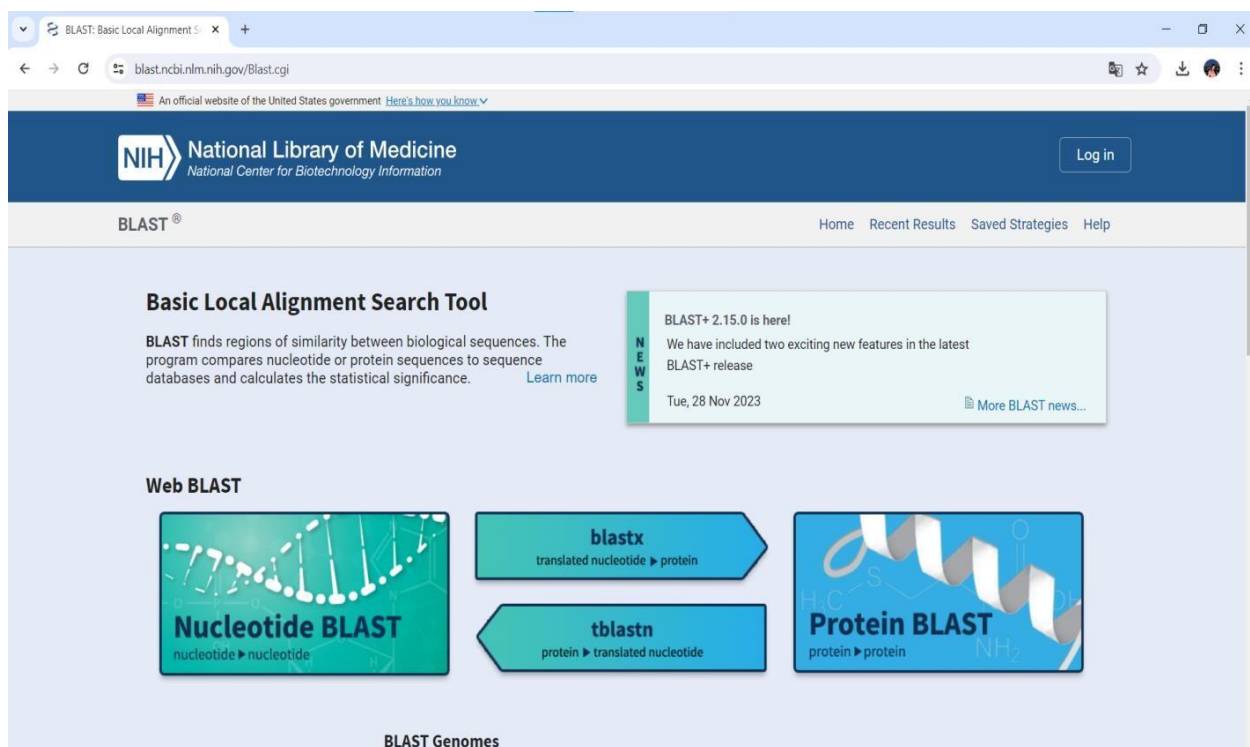


Figure 18 : Site NCBI

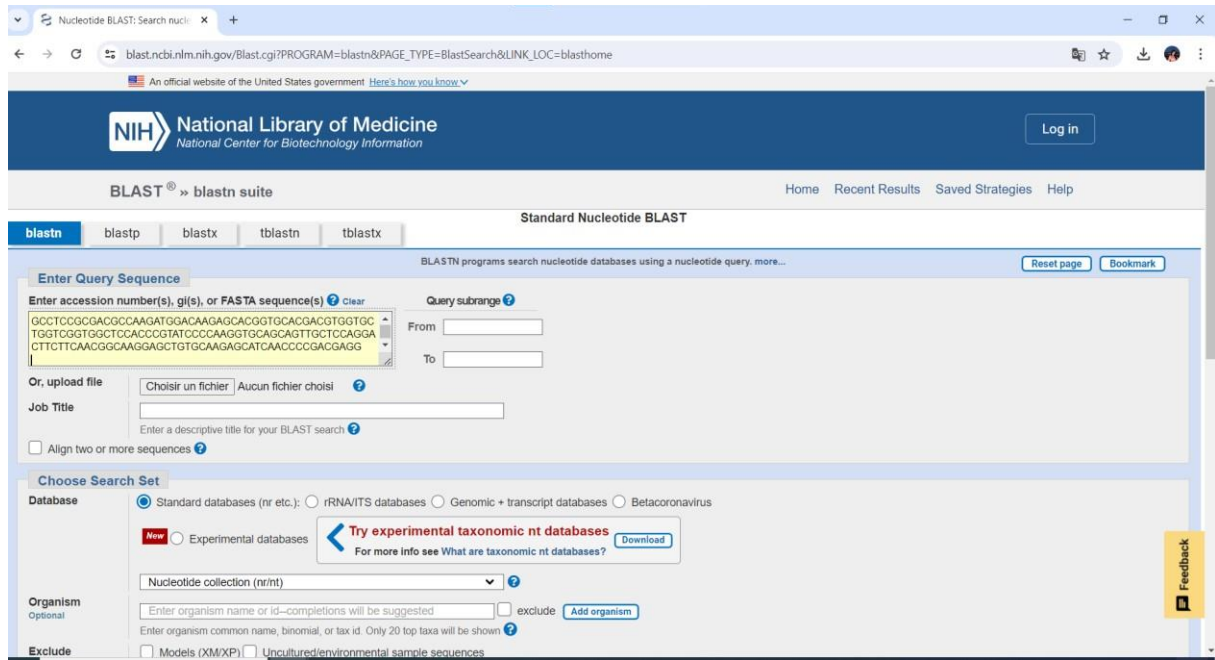


Figure 19 : Nucléotides blast.

➤ Les premiers résultats

| Sequences producing significant alignments | | Download | Select columns | Show | 100 | | | |
|---|------------------------------------|-----------|----------------|-------------|---------|------------|----------|--------------------------------|
| Description | Scientific Name | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Acc. Len | Accession |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Triticum aestivum heat shock 70 kDa protein 4 (LOC542820) .mRNA | Triticum aestivum | 1676 | 2502 | 54% | 0.0 | 100.00% | 2450 | XM_044594775.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Triticum aestivum 70 kDa heat shock protein (TaHSP70d) mRNA .complete cds | Triticum aestivum | 1676 | 2277 | 49% | 0.0 | 100.00% | 2311 | AF005993.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Aegilops tauschii subsp. strangulata heat shock 70 kDa protein 4 (LOC109745079) .mRNA | Aegilops tausch... | 1648 | 2293 | 50% | 0.0 | 99.45% | 2340 | XM_020304217.3 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Triticum aestivum heat shock 70 kDa protein 4-like (LOC123135982) .mRNA | Triticum aestivum | 1526 | 2018 | 50% | 0.0 | 97.02% | 2334 | XM_044555260.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Triticum dicoccoides heat shock 70 kDa protein 4 (LOC119347443) .mRNA | Triticum dicocc... | 1526 | 2013 | 50% | 0.0 | 97.02% | 2356 | XM_037616183.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Triticum urartu heat shock 70 kDa protein 4-like (LOC125520704) .mRNA | Triticum urartu | 1459 | 1948 | 50% | 0.0 | 95.70% | 2319 | XM_048685693.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Triticum dicoccoides heat shock 70 kDa protein 4-like (LOC119282457) .mRNA | Triticum dicocc... | 1454 | 1957 | 50% | 0.0 | 95.59% | 2342 | XM_037562687.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Triticum aestivum heat shock 70 kDa protein 4-like (LOC123059094) .mRNA | Triticum aestivum | 1448 | 1944 | 50% | 0.0 | 95.48% | 2335 | XM_044481739.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Hordeum vulgare subsp. vulgare heat shock 70 kDa protein 4 (LOC123445429) .mRNA | Hordeum vulgar... | 1410 | 1810 | 49% | 0.0 | 94.71% | 2307 | XM_045122420.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Hordeum vulgare subsp. vulgare mRNA for predicted protein .complete cds .clone NIAshv2084105 | Hordeum vulgar... | 1410 | 1810 | 49% | 0.0 | 94.71% | 2298 | AK369055.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Triticum aestivum heat shock protein 70-like (HSP70) mRNA .complete sequence | Triticum aestivum | 1321 | 1321 | 31% | 0.0 | 96.95% | 1810 | HM209063.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Brachypodium hybridum ecotype IBd483 chromosome Bhs8 sequence | Brachypodium ... | 1301 | 2032 | 48% | 0.0 | 91.23% | 22201197 | CP145510.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Brachypodium stacei ecotype Bst99 chromosome 8 genomic sequence | Brachypodium ... | 1301 | 2032 | 48% | 0.0 | 91.23% | 22716060 | CP145525.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Lolium perenne heat shock 70 kDa protein 4-like (LOC127321805) .mRNA | Lolium perenne | 1266 | 1581 | 44% | 0.0 | 91.84% | 2265 | XM_051350782.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Lolium rigidum heat shock 70 kDa protein 4-like (LOC124707604) .mRNA | Lolium rigidum | 1260 | 1579 | 44% | 0.0 | 91.73% | 2153 | XM_047239265.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Brachypodium hybridum ecotype IBd483 chromosome Bhd2 sequence | Brachypodium ... | 1256 | 3001 | 47% | 0.0 | 90.55% | 61247657 | CP145499.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Brachypodium distachyon ecotype Bd21 chromosome 2 genomic sequence | Brachypodium ... | 1251 | 2996 | 47% | 0.0 | 90.44% | 60349883 | CP145529.1 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Brachypodium distachyon probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 3 ... | Brachypodium ... | 1238 | 1592 | 45% | 0.0 | 91.29% | 2289 | XM_010232998.2 |
| <input checked="" type="checkbox"/> PREDICTED: Panicum hallii probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c (LOC112... | Panicum hallii | 1216 | 1547 | 45% | 0.0 | 90.85% | 2308 | XM_025949964.1 |

Figure 20 : Les séquences similaires au gène *Hsp70*

- Nous Choisissons le GenBank pour confirmer le gène *Hsp70*.

7.5 Définition GenBank

La base de données GenBank est conçue pour fournir et encourager l'accès au sein de la communauté scientifique aux informations sur les séquences d'ADN les plus récentes et les plus complètes. Par conséquent, le NCBI ne place aucune restriction sur l'utilisation ou la distribution des données de GenBank. Cependant, certains soumissionnaires peuvent revendiquer des droits de brevet, de copyright ou d'autres droits de propriété intellectuelle sur tout ou partie des données qu'ils ont soumises. Le NCBI n'est pas en mesure d'évaluer la validité de telles revendications et ne peut donc pas fournir de commentaire ou de permission non restreint concernant l'utilisation, la copie ou la distribution des informations contenues dans GenBank <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

PREDICTED: Triticum aestivum heat shock 70 kDa protein 4 (LOC542820), mRNA

NCBI Reference Sequence: XM_044594775.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: [☺](#)

LOCUS XM_044594775 907 bp mRNA linear PLN 25-OCT-2021
 DEFINITION PREDICTED: Triticum aestivum heat shock 70 kDa protein 4 (LOC542820), mRNA.
 ACCESSION XM_044594775 REGION: 462..1368
 VERSION XM_044594775.1
 DBLINK BioProject: [PRJNA764258](#)
 KEYWORDS RefSeq.
 SOURCE Triticum aestivum (bread wheat)
 ORGANISM [Triticum aestivum](#)
 Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta; Spermatophyta; Magnoliopsida; Liliopsida; Poales; Poaceae; BOP clade; Pooideae; Triticoideae; Triticeae; Triticineae; Triticum.
 COMMENT MODEL REFSEQ: This record is predicted by automated computational analysis. This record is derived from a genomic sequence (NC_057796.1) annotated using gene prediction method: Gnomon, supported by mRNA and EST evidence.
 Also see: [Documentation](#) of NCBI's Annotation Process

##Genome-Annotation-Data-START##
 Annotation Provider :: NCBI
 Annotation Status :: Full annotation
 Annotation Name :: [Triticum aestivum Annotation Release 100](#)
 Annotation Version :: 100
 Annotation Pipeline :: NCBI eukaryotic genome annotation pipeline
 Annotation Software Version :: 9.0
 Annotation Method :: Best-placed RefSeq; Gnomon
 Features Annotated :: Gene; mRNA; CDS; ncRNA
 ##Genome-Annotation-Data-END##

FEATURES
 Location/Qualifiers
 source 1..907
 /organism="Triticum aestivum"
 /mol_type="mRNA"
 /cultivar="Chinese Spring"
 /db_xref="taxon:4565"
 /chromosome="1D"
 /tissue_type="leaf"
 /dev_stage="Vegetative"
 /country="USA: Davis, California"
 gene <1..907
 /gene="LOC542820"
 /note="Derived by automated computational analysis using gene prediction method: Gnomon. Supporting evidence includes similarity to: 1 mRNA, 113 ESTs, 70 Proteins, and 100% coverage of the annotated genomic feature by RNAseq

Whole sequence
 Selected region
 from: 462 to: 1368

Customize view

Analyze this sequence
 Run BLAST
 Pick Primers
 Highlight Sequence Features
 Find in this Sequence
 Show in Genome Data Viewer

Articles about the LOC542820 gene
 TreeGrafter: phylogenetic tree-based annotation of proteins with Gene Ontol [Bioinformatics. 2019]
 Genome-wide identification of novel genetic markers from RNAs [Mol Genet Genomics. 2016]
 Manual GO annotation of predictive protein signatures: the InterPr [Database (Oxford). 2012]
 See all...

Reference sequence information
 RefSeq protein product
 See the reference protein sequence for heat shock 70 kDa protein 4 (XP_044450710.1).

More about the gene LOC542820
 LOC542820 gene
 Also Known As: TaHSP70d

Related information
 BioProject
 Protein
 Taxonomy
 Annotated Genomic

Figure 22 : Résultat du GenBank .

7.6 Etape 3: Analyser la séquence

Information sur le gène *Hsp70*

Nom de gène : *Hsp70*.

Famille de Gene: *HSPS*.

Locus de gene: chromosome: IWGSC:1D:382233486:382238373:-1.

La longueur de la séquence : 4391pb

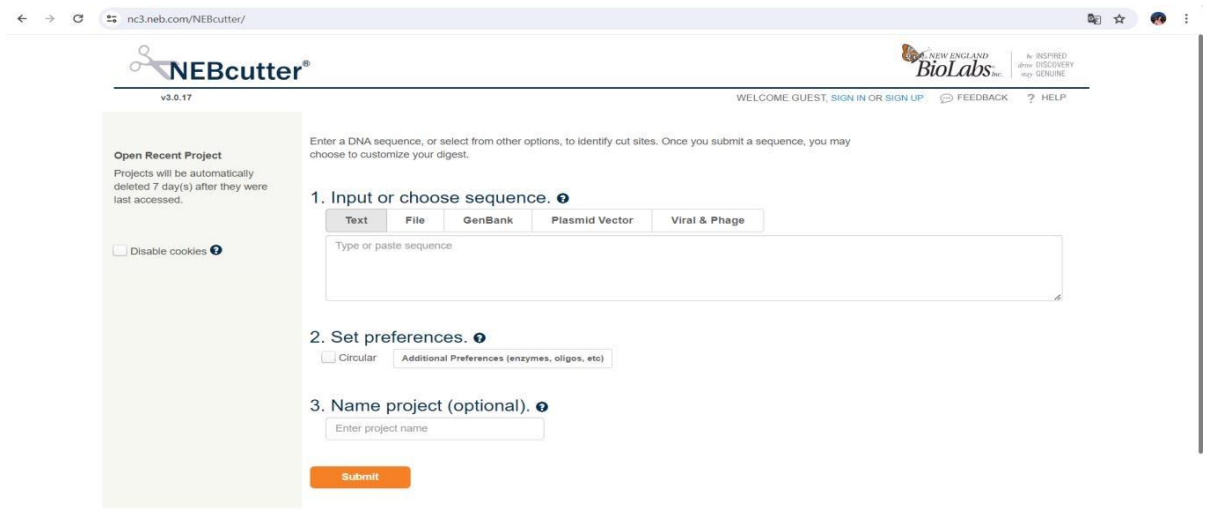
7.7 Identifier les sites enzymatiques afin d'éviter de tomber dans le même site de coupure CRISPR-Cas9.

7.8 Définition du NEB cutter

NEB cutter est un outil de bioinformatique développé par New England Biolabs (NEB) qui permet d'analyser des séquences d'ADN et de prédire les emplacements des sites de coupure des enzymes de restriction. Les enzymes restriction sont des protéines qui coupent l'ADN à

des endroits spécifiques, créant des fragments d'ADN de différentes tailles. NEB cutter permet aux chercheurs de prédire les tailles des fragments d'ADN qui seront générés lors d'une digestion enzymatique par restriction, en fonction de la séquence d'ADN et des enzymes de restriction sélectionnées. Cette information est utile dans de nombreuses applications de la biologie moléculaire, notamment le clonage, le séquençage de l'ADN et l'ingénierie génétique. NEB cutter est disponible gratuitement en ligne et est utilisé par des chercheurs du monde entier pour faciliter leur travail expérimental <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.

- On a entré les séquences dans NEB cutter.



The screenshot shows the NEBcutter website interface. At the top, there is a navigation bar with the NEBcutter logo, version v3.0.17, and a welcome message for a guest user. Below the navigation bar, there is a main content area with three steps: 1. Input or choose sequence, 2. Set preferences, and 3. Name project (optional). Step 1 includes tabs for Text, File, GenBank, Plasmid Vector, and Viral & Phage, and a text input field for the DNA sequence. Step 2 includes a checkbox for Circular and a button for Additional Preferences. Step 3 includes a text input field for the project name and a Submit button.

Figure 23 : Site de NEBcutter

- Tous les enzymes de restriction qui on a trouvé.

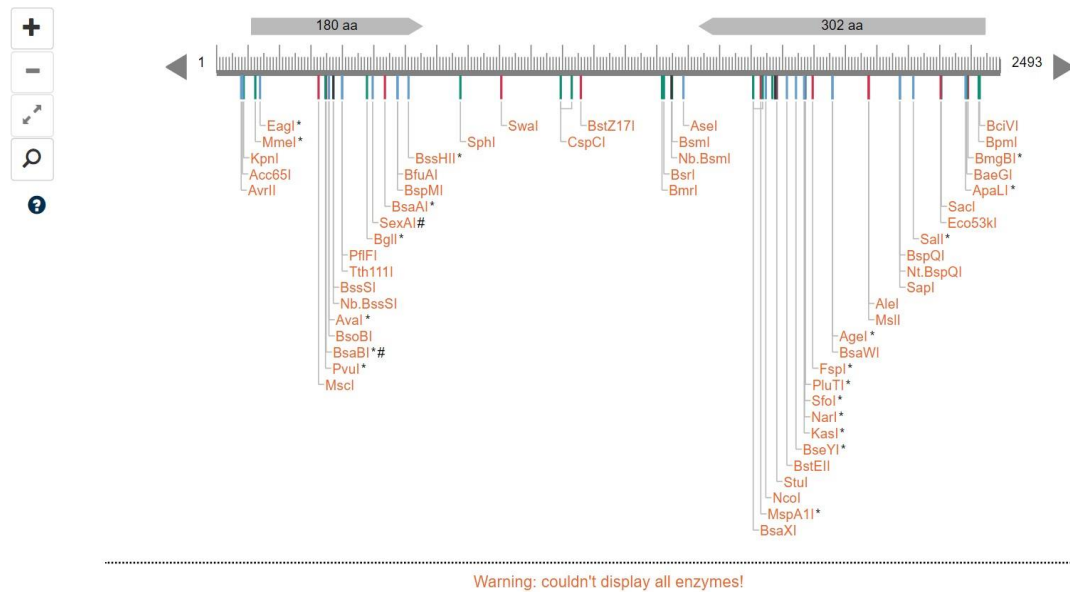


Figure24: Tous les enzymes de restrictions

7.8 Edition de la séquence du brin complémentaire

Nous utilisons le site :<https://en.vectorbuilder.com>

7.9 Définition Vector Builder

C'est Vector Builder est un leader mondial des technologies de délivrance de gènes. En tant que partenaire de confiance de milliers de laboratoires et d'entreprises biotechnologiques/pharmaceutiques à travers le monde, Vector Builder propose une gamme complète de solutions de délivrance de gènes couvrant pratiquement tous les besoins cliniques et de recherche, du laboratoire au chevet. <https://en.vectorbuilder.com/>

1) Nous insérons une séquence dans un emplacement vide dans le site

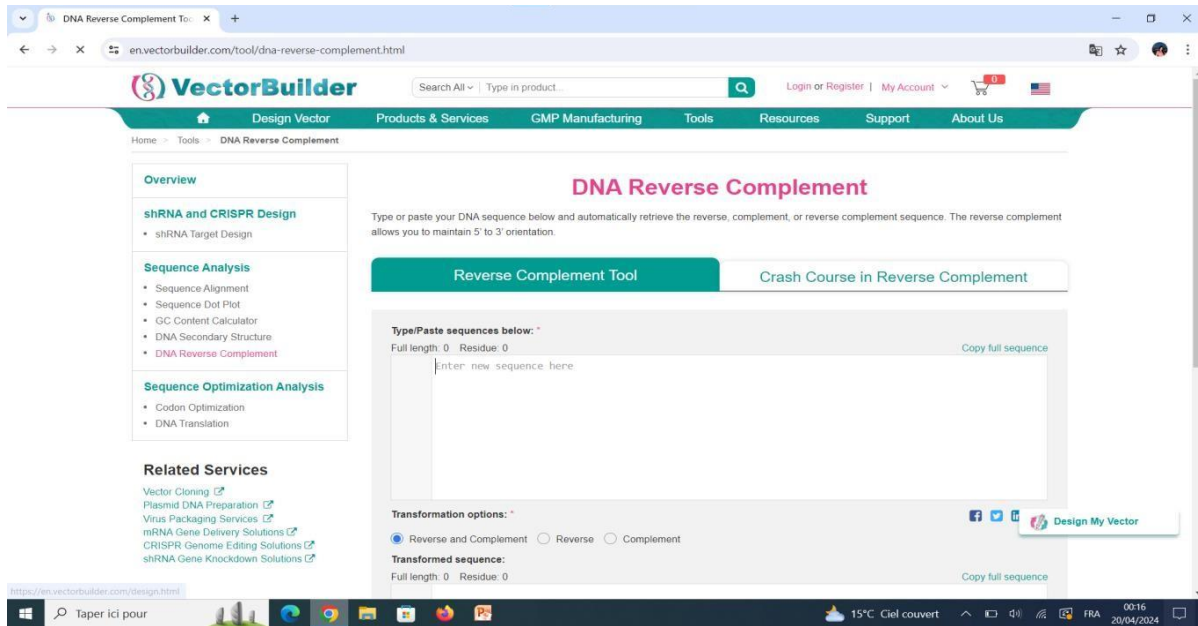


Figure 25 : Site de Vector Build

2) On choisit le mot complément pour la séquence ADN

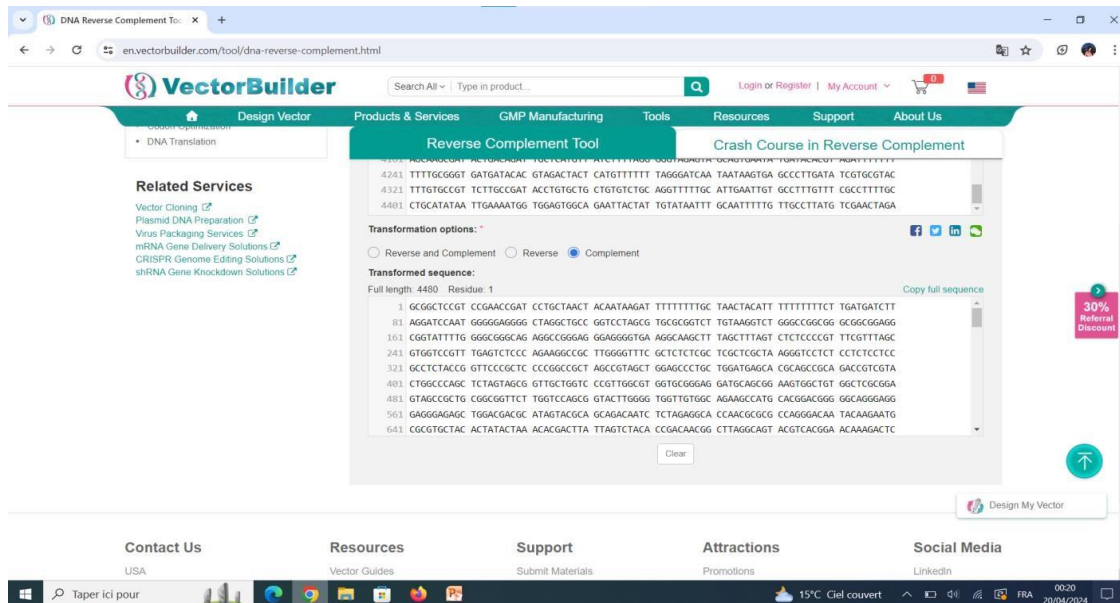


Figure 26 : complément de l'ADN

7.10 Etape 4: Identification de sites de cisaillement CRISPR cas9 possibles pour la modification du gène HSP70

7.11 Définition CHOP-CHOP

C'est un excellent outil logiciel pour concevoir le CRISPR Cas9, facilitant la découpe et la modification précise de l'ADN avec efficacité. CHOP-CHOP permet aux chercheurs de choisir les sites idéaux pour la découpe, ce qui améliore l'efficacité et la spécificité. Avec les

Nouvelles mises à jour, il offre plus de flexibilité et d'options dans la conception des sgARN, renforçant ainsi la capacité à reformuler efficacement les sites cibles

<https://chopchop.cbu.uib.no/>.

- Nous entrons sur le site et saisissons les informations sur le gène, y compris le nom du gène et le type de plante (blé). Une chaîne est entrée dans le champ de séquence cible.

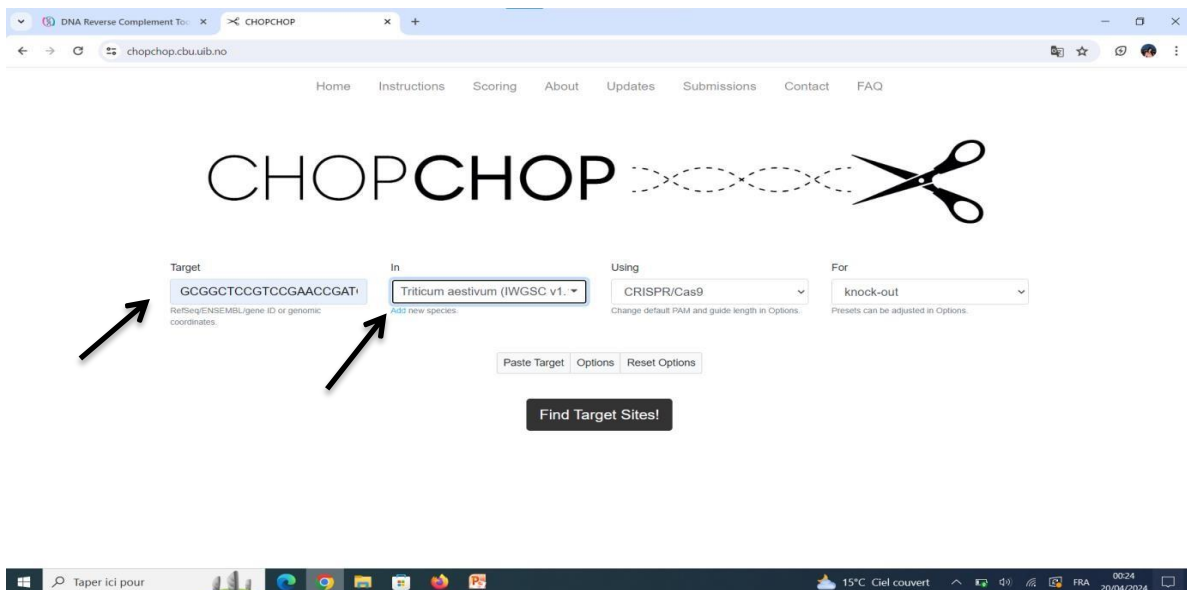


Figure 27 : Site de chop chop. (Target séquence, L'organisme)

- Après avoir saisi toutes les informations, nous attendons les résultats que nous analysons depuis les sites d'analyse.

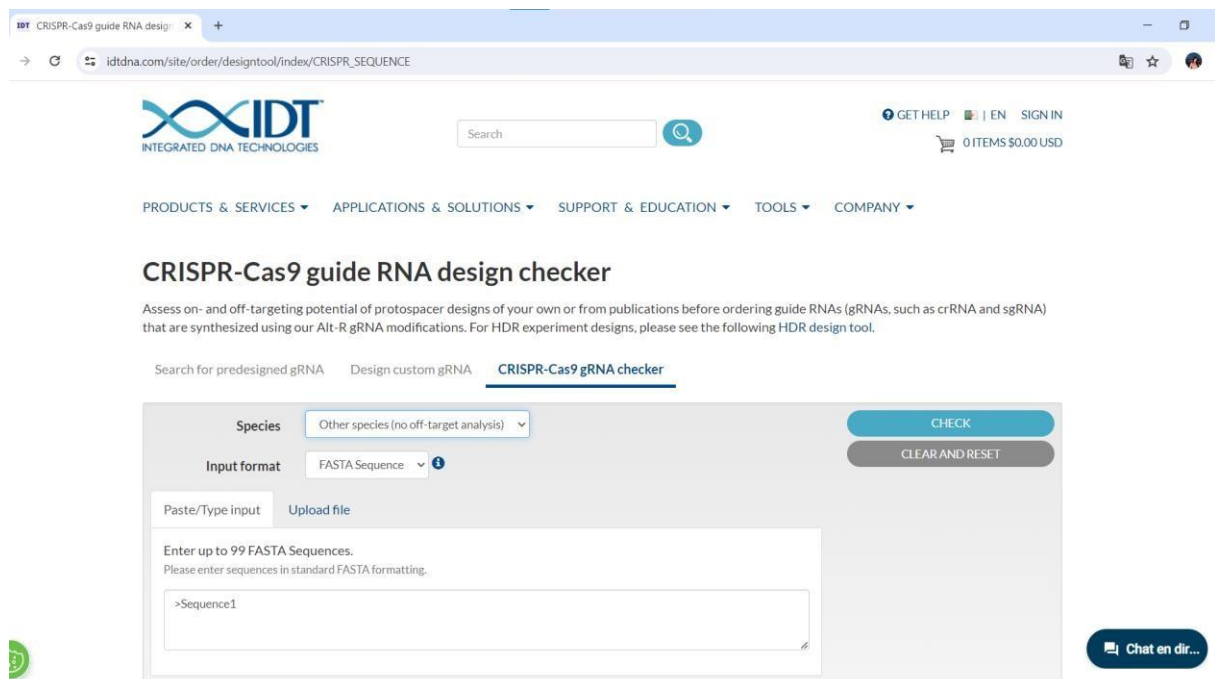
7.12 Etape 5 Évaluer l'activité de l'ARN guide conçu

7.13 Définition de L'entreprise Technologies Intégrées de l'ADN (IDT)

C'est la plus grande société au monde spécialisée dans la fabrication d'oligonucléotides, en particulier dans le domaine des sciences de la vie pour la recherche et le diagnostic. Leurs principaux produits comprennent des oligonucléotides d'ADN et d'ARN, des tests qPCR, des duplex d'ARN interférents (siARN) et la synthèse de gènes. IDT a été pionnière dans l'utilisation de méthodes de contrôle qualité à haut débit et est la seule société de fabrication

d'oligonucléotides à offrir des garanties de qualité et de pureté à 100 %, fournissant une documentation de contrôle qualité en ligne à ses clients. Cela garantit à nos clients la meilleure qualité de synthèse avec des analyses de spectrométrie de masse et des traces CE sur les oligos purifiés gratuitement.

- Après avoir conçu sgARN, nous le testons avec le logiciel
- Toutes les informations privées sont entrées dans le concepteur sgARN.
- Le type d'organisme est sélectionné, et nous entrons également le sgARN à l'endroit désigné.



The screenshot shows the IDT website's CRISPR-Cas9 guide RNA design checker. The browser address bar shows the URL: idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE. The page features the IDT logo (Integrated DNA Technologies) and a search bar. Below the logo, there are navigation menus for 'PRODUCTS & SERVICES', 'APPLICATIONS & SOLUTIONS', 'SUPPORT & EDUCATION', 'TOOLS', and 'COMPANY'. The main heading is 'CRISPR-Cas9 guide RNA design checker'. Below this, there is a sub-heading: 'Assess on- and off-targeting potential of protospacer designs of your own or from publications before ordering guide RNAs (gRNAs, such as crRNA and sgRNA) that are synthesized using our Alt-R gRNA modifications. For HDR experiment designs, please see the following HDR design tool.' There are three tabs: 'Search for pre-designed gRNA', 'Design custom gRNA', and 'CRISPR-Cas9 gRNA checker' (which is selected). The interface includes a 'Species' dropdown menu set to 'Other species (no off-target analysis)', an 'Input format' dropdown set to 'FASTA Sequence', and a 'CHECK' button. Below these are 'Paste/Type input' and 'Upload file' options. A text area contains the instruction 'Enter up to 99 FASTA Sequences. Please enter sequences in standard FASTA formatting.' and a single sequence entry '>Sequence1'. There is also a 'CLEAR AND RESET' button and a 'Chat en dir...' button in the bottom right corner.

Figure28 : Évaluer l'activité sgARN conçue.

- Attendez les résultats de l'évaluation sgARN.
période spécifiée.

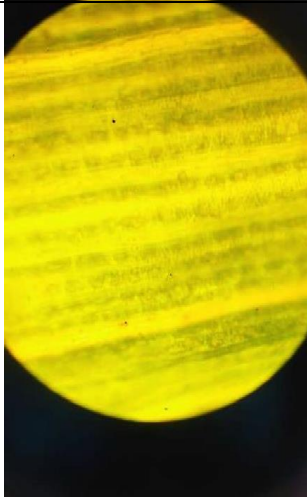

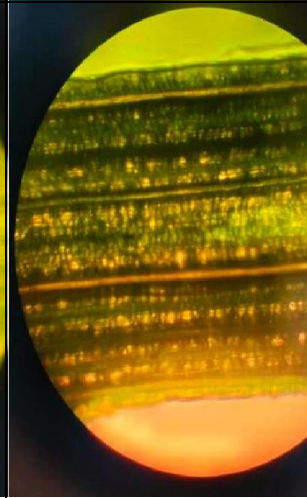
Chapitre III

Résultats et discussion

III .1 Résultats

III .1.1 Résultats de l'effet de la chaleur sur les feuilles de blé tendre

Tableau 3 : L'effet à groupe de feuilles dans laboratoire dans différentes température

| Températures. | la forme de feuilles à 17°C. | la forme de feuilles à 27° C. | la forme de feuilles à 40°C. |
|------------------------------------|--|---|--|
| Observation microscopique.10 /025. |  |  |  |

III .1.2 Résultats d'Extraction d'ADN de blé tendre

- Après avoir ajouté de l'éthanol aux tubes, l'ADN commence à monter, tandis que les impuretés restantes restent au fond du tube.

III 1.2.1 ADN extrait de feuilles de blé

ADN



Figure 29 : La Méduses d'ADN des feuilles.

III 1.2.2 ADN extrait de grain de blé



Figure 30 : La Méduses d'ADN de grain du Blé.

III.1.3 Résultats de dosage de l'ADN dans les spectrophotomètres

Le rapport d'absorption 260/280 a été calculé pour évaluer la pureté de l'acide nucléique. Un Rapport entre 1,8 à 2 est considéré comme moyen, représentant la pureté de votre Échantillon d'acide nucléique

Tableau 4 : Absorbance de l'ADN dans la longueur-d'ondes à 260 et 280 nm.

| Échantillon | DO 260 nm | DO 280 nm | DO 260 /280 nm |
|-----------------------|-----------|-----------|----------------|
| Échantillon Feuille 1 | 0,301 | 0,52 | 0,57 |
| Échantillon Feuille 2 | 0,21 | 0,19 | 1,10 |
| Échantillon Feuille 3 | 0,17 | 0,22 | 0,77 |
| Échantillon grain 1 | 0,25 | 0,21 | 1,19 |
| Échantillon grain 2 | 0,54 | 0,31 | 1,83 |
| Échantillon grain 3 | 0,12 | 0,92 | 0,13 |

III 1.4 Résultats de site chop-chop

- Les résultats de la sélection des emplacements cibles apparaissent(Séquence Target).

Possible Dans lequel nous pouvons modifier la Conception de sgARN (figure 30)

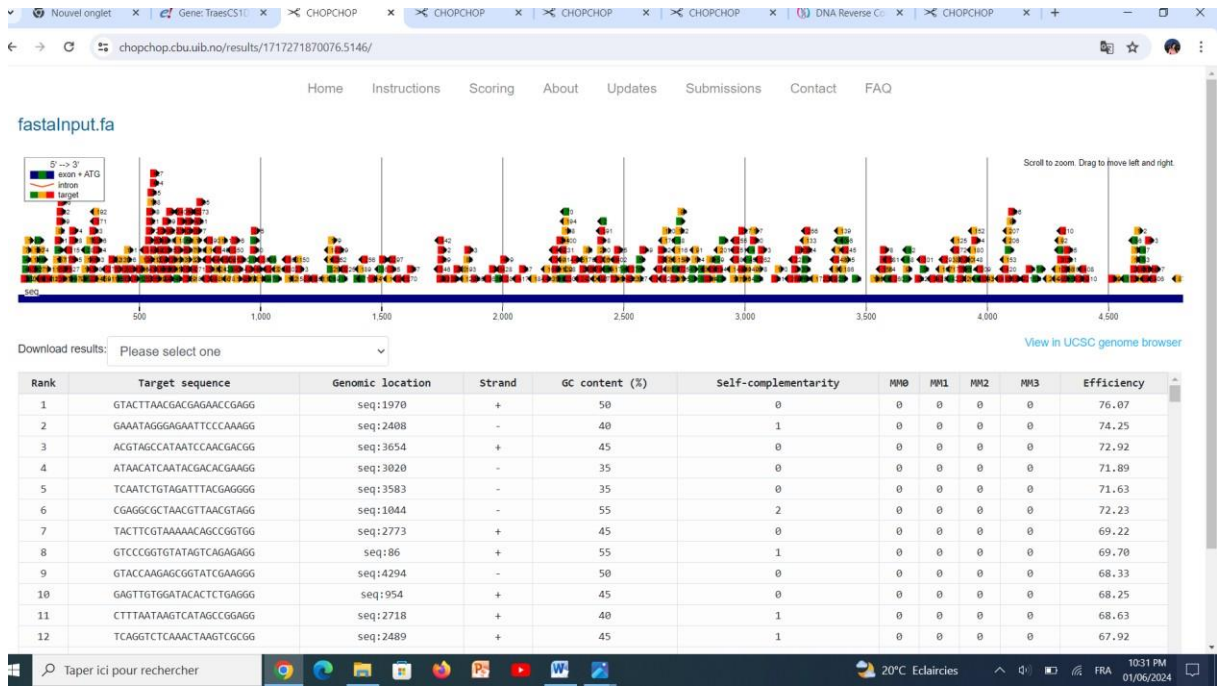


Figure31: Résultats de site chop chop .

➤ Choisir chez Séquence Target très efficace. (sgADN) 76.07%

➤ III.1.5 Résultats de l'évaluation sgARN. Site checker CRISP cas 9

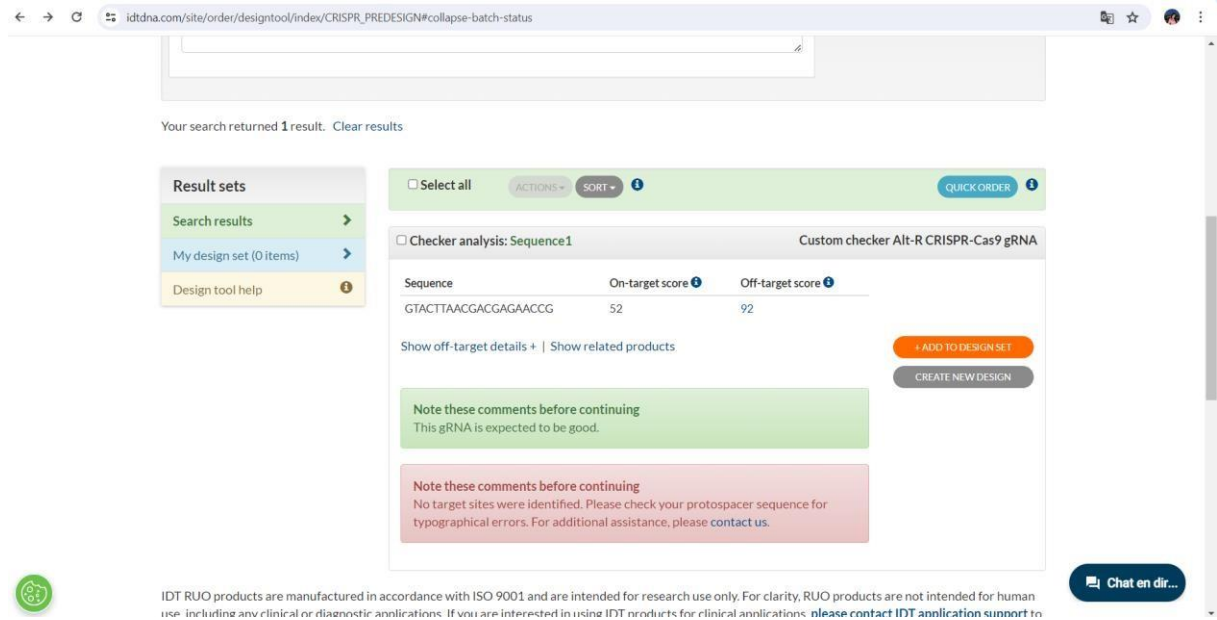


Figure 32 : La séquence de l'ARN Guide choisie

La séquence du sgARN :

5'GTACTTAACGACGAGAACCG 3'

➤ On s'attend à ce que ce sgARN soit un bon éclaireur pour l'enzyme CRISP cas 9. Car elle présente les scores suivants :

On Target Score : 52%.

Off Target Score : 92%.

III. 2Discussion

III 2.1 L'effet de la chaleur sur les feuilles de Blé

Les résultats montrent que différentes températures affectent l'état des cellules et des tissus des feuilles de blé. À 17°C, les cellules étaient intactes, ce qui indique qu'elles fonctionnaient toujours bien. Cependant, à 27°C, on a observé un changement de couleur et une décoloration des cellules et des tissus, indiquant que la température plus élevée avait causé des dommages. Finalement, à une température de 42°C, les cellules des tissus ont été complètement détruites.

III 2.2 Extraction d'ADN

Le Rapport des densités 260/280 d'ADN dilué des échantillons de feuilles était inférieur à 1,8. Cela suggère que les échantillons peuvent contenir des impuretés ou d'autres substances affectant la concentration de l'acide désoxyribonucléique. L'échantillon unique de graines qui était pur avait un rapport de 1,83. Cela indique que les graines étaient plus pures et pourraient contenir une concentration d'ADN plus élevée par rapport aux autres échantillons. Les conditions environnementales telles que la pollution ou l'exposition à des facteurs externes pourraient être à l'origine des variations de concentration dans les échantillons. Ces résultats pourraient affecter d'autres analyses dépendant de la concentration d'ADN et pourraient nécessiter des études supplémentaires pour identifier les raisons des variations de concentration. Les résultats de l'extraction d'ADN sont bons si la valeur de pureté est la plage 1,8-2,0, la concentration est supérieure à 20 (ng/μL) (Kirby 1990; Artama 1991).

III 2.3 Bioinformatique et analyse du gène *Hsp70*

Les résultats d'une étude sur l'utilisation du programme Chop chop Cas9 comme un catalyseur pour des perspectives précises en édition génétique ont montré, par l'analyse de *Hsp70*, l'identification de 296 cible de séquence, la séquence la plus efficace un site de 76% d'efficacité exempte complètement de répétitions. Cela met en évidence l'efficacité du programme dans l'identification des sites potentiels pour l'édition génétique, ouvrant ainsi de larges perspectives de recherche dans divers domaines tels que l'agriculture génétiquement modifiée et l'édition des gènes dans la recherche médicale. De plus, les résultats positifs de l'utilisation du programme sur le blé par des chercheurs (**Molinari et al, 2021**) ont démontré l'efficacité du programme Chop chop dans la conception de sgARN efficaces, Ces résultats confirment.

L'importance et l'efficacité des techniques d'édition génétique, non seulement sur le Blé, mais aussi sur des cultures telles que le maïs et le riz, pour augmenter la productivité grâce à CRISPR cas 9.

Sur la base des résultats obtenus grâce à l'utilisation du programme de vérification CRISPR cas9 guide RNA design checker, le concepteur d'efficacité sgARN a constaté que 50 % de la cible attendue avait été identifiée avec succès pour atteindre le site de coupe pour le guidage cas9. Cependant, 92 cibles inattendues ont également été trouvées, ce qui indique qu'il y en a. sont des défis dans la détermination de l'objectif spécifique. Sur la base de ces résultats, le sgARN devrait avoir un effet sérieux, mais des résultats supplémentaires doivent être pris en compte pour déterminer les probabilités exactes des effets potentiels.



Perspectives

Et Conclusion

Perspectives et Conclusions

Cette étude propose un nouveau cadre théorique qui contribue à élargir notre compréhension d'un phénomène spécifique dans le domaine des sciences. Après avoir mené une étude sur l'effet de la température sur les feuilles de blé à 42 degrés Celsius, il a été constaté que ces conditions provoquaient la mort des cellules et des tissus. De plus, une quantité d'ADN plus importante a été extraite des graines par rapport aux feuilles, ce qui accroît les possibilités de modifier l'ARN guide (sgARN) pour atteindre la cible souhaitée. Les résultats indiquent qu'une conception de sgARN avec un taux de réussite de 52 % et un taux de hors-cible de 92% présente des perspectives de succès prometteuses.

En modifiant le gène *Hsp70* à l'aide de la technologie CRISPR-Cas9 pour augmenter la tolérance à la chaleur du blé, la fonction des protéines de choc thermique codées par ce gène peut être améliorée. Cette modification augmente la capacité du blé à résister à la chaleur extrême et à réagir efficacement aux conditions environnementales difficiles. Par conséquent, cela peut contribuer à accroître la résistance du blé aux températures élevées et à améliorer sa productivité, ce qui est très important pour faire face aux changements climatiques et garantir la disponibilité alimentaire future. Exploiter la majeure partie du désert algérien, atteindre l'autosuffisance et revitaliser l'économie.

Références
bibliographiques

A

Abhinandan K., Skori L., Stanic, M., Hickerson N.M.N., Jamshed M. and Samuel, M.A. (2018) Abiotic stress signalling in wheat - An inclusive overview of hormonal interactions during abiotic stress responses in wheat. *Front. Plant Sci.* 9, 734.

Abiotic Stress Signaling in Wheat – An Inclusive Overview of Hormonal Interactions During Abiotic Stress Responses in Wheat Kumar Abhinandan† , Logan Skori† , Matija Stanic, Neil

M. N. Hickerson, Muhammad Jamshed and Marcus A. Samuel* Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary, AB, Canada

Aboul-Maaty, N. A. F., et Oraby, H. A. S. (2019). Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-10.

Aydın, Z. U., Şenova, M. K., Koch, M., et Dönmez, A. (2020). DNA from Leaf or Stem: A Comparative Work on *Dianthus L.* For DNA Barcoding Analysis with Four Commercial Extraction Kits. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 48(4), 333-339.

Aljohani, N., Fletcher, J., El Shafey, H., Ghanem, S., Kabli, S. A., Morsi, M., & Aljohani, R. (2022). Overview of Heat Shock Proteins (HSPs) in Prokaryotes. *16(6):1-11*.

Alemu, K. (2015). The role and application of bioinformatics in plant disease management. *Advances in Life Science and Technology*, 28, 28-33.

Artama WT. 1991. Genetical manipulation. Center for Inter-University-Biotechnology. Gadjah Mada University, Yogyakarta. [Indonesian]

B

Bonnot, T. (2016). Réponse du grain de blé à la nutrition azotée et soufrée: étude intégrative des mécanismes moléculaires mis en jeu au cours du développement du grain par des analyses-omiques (Doctoral dissertation, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II). 1-176p

Bonjean A .et Picard E., 1990. Les céréales à paille origine, historique, économie et sélection. Ed.Nathan, 235p

Bhowmik, P., Ellison, E., Polley, B., Bollina, V., Kulkarni, M., Ghanbarnia, K., ... & Kagale, S. (2018). Targeted mutagenesis in wheat microspores using CRISPR/Cas9. *Scientific reports*, 8(1), 6502.

C

Charles i Oyewole et al 2016, the Wheat Crop Department of Crop Production, Faculty of Agriculture, Kogi State University, P.M.B. 1008, Anyigba, Kogi State, Nigeria .1-16p

Curtis, T., & Halford, N. G. (2014). Food security: the challenge of increasing wheat yield and the importance of not compromising food safety. *Annals of applied biology*, 164(3), 354-372.

Comby, M., Ptas, S., Profizi, C., Randoux, B., Reignault, P., Halama, P., ... & Clément, C. (2018, January). Le biocontrôle des stress biotiques et abiotiques chez le blé: c'est possible. In *PHLOEME*, 1ères biennales de l'innovation céréalière, Cité des Sciences et de l'Industrie, (1) ,79-83p

Clark, W., & Christopher, K. (2000). An Introduction to DNA: Spectrophotometry, degradation, and the 'Frankengel' experiment. *Tested studies for laboratory teaching*, 22, 81- 99

D

Duan, Y. H., Guo, J., Ding, K., Wang, S. J., Zhang, H., Dai, X. W., ... & Kang, Z. S. (2011). Characterization of a wheat HSP70 gene and its expression in response to stripe rust infection and abiotic stresses. *Molecular biology reports*, 38, 301-307.

Das, K., Ayim, B. Y., Borodynko-Filas, N., Das, S. C., & Aminuzzaman, F. M. (2023). Genome editing (CRISPR/Cas9) in plant disease management: challenges and future prospects. *Journal of Plant Protection Research*, 159-172.

E

EFEÖĞLU, Banu. Heat shock proteins and heat shock response in plants. *Gazi University Journal of Science*, 2009, vol. 22, no 2, p. 67-75.

F

Feillet. P. (2000) Le grain de blé. (eds)Composition et utilisation INRA. Paris: p 312.

G

Gestion durable des adventices: Céréales à paille. (2017). France: Editions Arvalis.

Gostimskaya, I. (2022). CRISPR–cas9: A history of its discovery and ethical considerations of its use in genome editing. *Biochemistry (Moscow)*, 87(8), 777 788.

H

Henry Y, Beyser J – 2000 : Origine des blés dans la science – H sène 26 : 60- 62

Hadria R., 2006. Adaptation et spatialisation des modèles strics pour la gestion d'un périmètre céréalier irriguée en milieu semi aride. Thèse de doctorat. Univ Cadi AYYAD Samlalia- Marrakech 216p

J

Jäger, M., Schubert, S., Ochrimenko, S., Fischer, D., & Schubert, U. S. (2012). Branched and linear poly(ethylene imine)-based conjugates: synthetic modification, characterization, and application. *Chemical Society Reviews*, 41(13), 4755-476

K

Kirby LT. 1990. DNA Fingerprinting: An Introduction. M. Stockton Press, New York. DOI: 10.1007/978-1-349-12040-6.

Köchler, S., Niederstätter, H., & Parson, W. (2005). DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. *Forensic DNA typing protocols*, 13-29.

L

Lersten, N.R. 1987. Morphology and Anatomy of the Wheat Plant. In: Heyne, E.G.(ed). *Wheat and Wheat Improvement*. American Society of Agronomy, Madison, WI pp. 33-75

Li, S., Zhang, C., Li, J., Yan, L., Wang, N., & Xia, L. (2021). Present and future prospects for wheat improvement through genome editing and advanced technologies. *Plant Communications*, 2(4).

Lapatas, V., Stefanidakis, M., Jimenez, R. C., Via, A., & Schneider, M. V. (2015). Data integration in biological research: an overview. *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 22, 1-16.

M

Mazouz L., (2006). Etude de la contribution des paramètres phéno-morphologiques dans l'adaptation du blé dur (*Triticum durum* Desf.) dans l'étage bioclimatique semi-aride. Thèse de magister. Institut d'Agronomie, Université Colonel El Hadj Lakhdar, Batna, 65 pages.

Maufras, J. Y. (2023). Maladies des céréales à paille. France: ARVALIS - Institut du végétal 364p

McKevith, B. (2004), Nutritional aspects of cereals. Nutrition Bulletin, 29: 111-142

Molinari, H. B. C., Vieira, L. R., SILVA, N., Prado, G. S., LOPES FILHO, J. F., LETÍCIA, R. V., ... & LOPES FILHO, J. H. (2021) Genome editing by CRISPR/Cas via homologous recombination in : CRISPR technology in plant genome editing: biotechnology applied to agriculture. 91-121

O

Olmedo Arcega O.B., Cantrell R.G., 1995.Recurrent selection for grain yield in Durum Wheat.Crop Scid. N° 35. Pp.714-719.

P

Prats J., Grandcount M. C., 1971. Les céréales 2ème éd. Coll d'enseignement Agricole.288 P.

Paul, R., Saville, A. C., Hansel, J. C., Ye, Y., Ball, C., Williams, A., ... & Wei, Q. (2019). Extraction of plant DNA by microneedle patch for rapid detection of plant diseases. ACS nano, 13(6), 6540-6549.

Pourcel, C. (2017). Historique de la découverte des systèmes CRISPR-Cas.Biologie Aujourd'hui, 211(4), 247-254.

R

Ruel T.,(2006),Document sur la culture du blé, édition Educagri .18 p

S

Soltner D., 2005. Les grandes productions végétales. 20^{ème} Ed. CCTA . Pp20-14

STEIN, N., HERREN, G., et KELLER, Beat. A new DNA extraction method for high- throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum*. *Plant breeding*, 2001, vol. 120, no 4, p. 354-356.

Swastika Subedi, Puja Khadka (2022). Impact of Climate Change on Wheat Productivity: A Review. *Ecofeminism and Climate Change*, 3(1): 68-71.

T

Tan, Y. C., Kumar, A. U., Wong, Y. P., & Ling, A. P. K. (2022). Bioinformatics approaches and applications in plant biotechnology. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 106.

V

Vassilev, D., Nenov, A., Atanassov, A., Dimov, G., & Getov, L. (2006). Application of bioinformatics in fruit plant breeding. *Journal of fruit and ornamental plant research*, 14, 145.

W

Wadley G., Martin A. 1993. The Origins of Agriculture? A Biological Perspective and New Hypothesis. *Australian Biologist* 6: 96-10

Autres références bibliographiques :

<https://plants.ensembl.org/info/about/index.html>

<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>.

<https://en.vectorbuilder.com/>

<https://chopchop.cbu.uib.no/>

https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_SEQUENCE

