



Rapport de stage professionnel – juillet 2018



Réalisé par : ZIANE Kawtar GPSP

Encadrée par : ARUN PATOKAR Chetan

Remerciement

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de mon stage et qui m'ont aidée lors de son déroulement.

Je voudrais dans un premier temps remercier, Monsieur Bamouh, professeur à l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui m'ont permis de bien choisir la structure de stage.

Je remercie également toute l'équipe pédagogique de l'institut agronomique et vétérinaire Hassan II et les intervenants professionnels responsables de ma formation, pour avoir assuré la partie théorique de celle-ci.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance aux personnes suivantes, pour leur aide pendant le déroulement de ce stage :

Docteur ARUN PATOKAR Chetan, mon maître de stage qui m'a beaucoup fait découvrir sur les technicités utilisées en génétique moléculaire. Il a partagé ses connaissances et expériences dans ce milieu, tout en m'accordant sa confiance et une large indépendance dans l'exécution de quelques tâches.

Messieurs TSIVELIKAS Athanasios et SIJILMASSI Badreddine pour m'avoir accordé une partie de leur temps et avoir répondu à toutes mes questions concernant les banques de gènes ainsi que les techniques d'analyse au laboratoire mais aussi de leur expérience personnelle. Ils ont été d'un grand soutien pendant le déroulement de ce stage

Sommaire

Remerciement.....	2
I. Présentation	4
1. Mission de l'ICARDA :.....	4
2. Défis des zones arides.....	5
Pourquoi l'ICARDA s'intéresse-t-elle aux zones arides ?.....	5
II. Activités réalisées.....	7
1. Activité de laboratoire	7
Listes des produits nécessaires pour le protocole d'extraction d'ADN à partir d'un échantillon de feuilles :.....	8
Extraction d'ADN :.....	8
Marquage d'ADN :.....	11
Quantification d'ADN	12
Observation des cellules du méristème apical racinaire :.....	14
2. Banque de gène	14
3. Visite des champs	16
III. Apports de stage	18

I. Présentation

1. Mission de l'ICARDA :

International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA) est une organisation mondiale de recherche pour le développement. Le but suprême de ce centre est de trouver des moyens de subsistance résilients dans les communautés des zones arides des pays en développement, en assurant un accès sécurisé à la nourriture, aux marchés, à la nutrition et à la santé, et la capacité de gérer durablement les ressources naturelles. Depuis sa création en 1977 en tant qu'organisation à but non lucratif, l'ICARDA a mis en œuvre des programmes de recherche pour le développement dans 50 pays des zones arides du monde, en Afrique du Nord au Bangladesh en Asie du Sud.

En fournissant des solutions scientifiques innovantes aux communautés des zones sèches non tropicales des pays en développement, en particulier en Asie occidentale, centrale et méridionale et en Afrique du Nord et subsaharienne. A l'aide de collaborations avec un vaste réseau de systèmes nationaux de recherche agricole (SNRA) et d'instituts de recherche avancée pour renforcer leurs efforts et leurs compétences et afin de pouvoir mener leurs propres programmes de recherche et développement. Les chercheurs de l'ICARDA sont également en étroite collaboration avec d'autres centres de recherche du CGIAR, des ONG, des gouvernements et le secteur privé. Son travail fait progresser les connaissances scientifiques, façonne les pratiques et oriente les politiques.

L'ICARDA conserve et utilise l'agro-biodiversité dans les banques de gènes et des programmes de sélection de petits ruminants pour développer de nouveaux germoplasmes et races afin de s'adapter aux changements climatiques. Ainsi qu'en optant pour des systèmes de production intégrés, pluviaux, irrigués et marginaux pour les zones sèches, en utilisant la diversité des cultures et du bétail pour créer des entreprises agricoles rentables et durables ; en développant des chaînes de valeur durables pour les zones sèches non tropicales dans des cultures mandatées - orge, lentilles, féverole, blé, pois chiche et pois carré - et petits ruminants ; des approches innovantes pour gérer les ressources en eau, en terre et en sol afin de remédier à la pénurie d'eau,

d'améliorer la santé et la productivité des sols et de neutraliser la dégradation des sols.

2. Défis des zones arides

Pourquoi l'ICARDA s'intéresse-t-elle aux zones arides ?

Les zones sèches non tropicales couvrent plus de 40% de la surface terrestre et couvrent 100 pays en développement, avec une population croissante de plus de 2,5 milliards de personnes. Ces personnes cultivent 44% de la nourriture mondiale et détiennent la moitié du cheptel mondial, mais près d'un cinquième vit dans des conditions de pauvreté chronique. Les zones sèches sont également confrontées à des défis majeurs: insuffisance des précipitations, variabilité et changement du climat, dégradation des sols, désertification, sécheresses récurrentes, températures extrêmes, forte croissance démographique, pauvreté et chômage. En outre, les zones sèches abritent de nombreux États fragiles et sortant d'un conflit qui dépendent d'économies fortement agraires.

En combinant des preuves scientifiques et des connaissances autochtones issues de communautés des zones arides pour relever ces défis, qui ont également un impact considérable sur les nouveaux problèmes mondiaux de sécurité alimentaire, de dégradation des sols et de changement climatique. Les recherches effectuées à l'ICARDA visent à fournir les preuves nécessaires pour mieux positionner les problèmes des zones arides sur le programme de recherche et développement aux niveaux national, régional et mondial.

Les trois principaux objectifs contribuent directement à l'agenda des objectifs de développement durable :

- Réduire la pauvreté: en générant des revenus plus élevés, diversifiés et durables grâce à des marchés fonctionnels qui améliorent le niveau de vie des hommes, des femmes et des enfants dans les zones arides
- Améliorer l'alimentation, la sécurité nutritionnelle pour la santé humaine dans les communautés vulnérables

- Améliorer les ressources naturelles en développant des pratiques de gestion équitables et durables des terres, des ressources en eau, de l'énergie et de la biodiversité dans les zones arides pour les générations futures

II. Activités réalisées

Les activités réalisées au cours de ce stage professionnel se subdivisent en deux catégories majeures :

1. Activités de laboratoires
2. Banques de gènes
3. Activités en plein champs

1. Activité de laboratoire

Les techniques acquises pendant le déroulement de ce stage au niveau du laboratoire sont étroitement liées aux méthodes de génétique moléculaire, allant de la préparation des solutions d'extraction d'ADN, à l'extraction d'ADN d'un matériel végétal vivant, observation de cellules racinaires au microscope optique, marquage fluorescent d'ADN, amplification d'ADN et observation sur gel d'agarose.

Toutes ces techniques sont mise en œuvre pour le programme d'hybridation in-situ de deux parents à pool génétiques différents (♀ Blé dur Cultivé x ♂ Blé dur sauvage) en marquant l'ADN des deux individus à l'aide le labels fluorescent avant de les croiser.

L'ADN de la descendance F1 sera ensuite extrait et étudié dans le but de savoir quelle partie de son génotype est hérité de la variété cultivée et laquelle provient de la variété exotique.

On tient à noter que l'ADN des parents est préalablement étudié, par contre celui de l'individu hybride est inconnu.

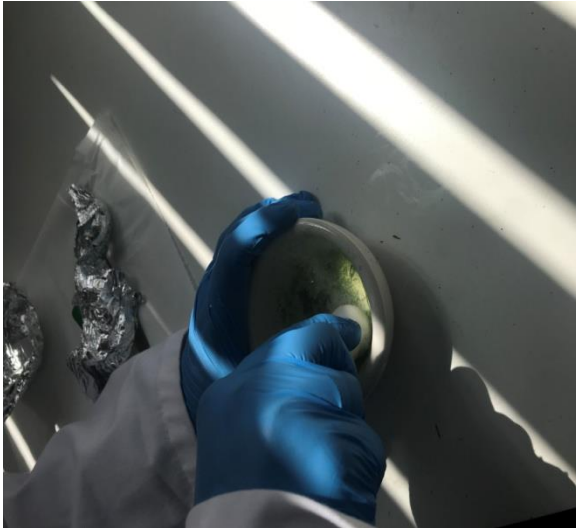
Listes des produits nécessaires pour le protocole d'extraction d'ADN à partir d'un échantillon de feuilles :



- Tampon CTAB
- 2% CTAB, 20mg CTAB
- 20 mM EDTA, 40mL EDTA (0.5M)
- 100 mM Tris-Cl pH 8.0, 100mL Tris-Cl (1M)
- 1.4M NaCl, 280 mL NaCl (5M)
-rajouter l'eau distillée jusqu'à arriver à 1L, puis mettre la solution dans l'autoclave.
- +0.2% mercaptoethanol
- 76% ethanol
- 10mM acide NH₄

Extraction d'ADN :

- Préchauffer 5 ml de CTAB (ajouter 10 microlitres de mercaptoéthanol à 5 ml de CTAB) dans un tube à centrifuger de 50 ml à tête bleue à 60 ° C. Retirer et descendre les nervures médianes et envelopper les feuilles dans de l'aluminium
- émietter délicatement les feuilles sur un pilon froid d'azote liquide. Broyer les feuilles congelées avec une spatule de sable fin et ajouter 1/2 spatule de poudre de PVPP après broyage. (L'étape PVPP peut être supprimée)

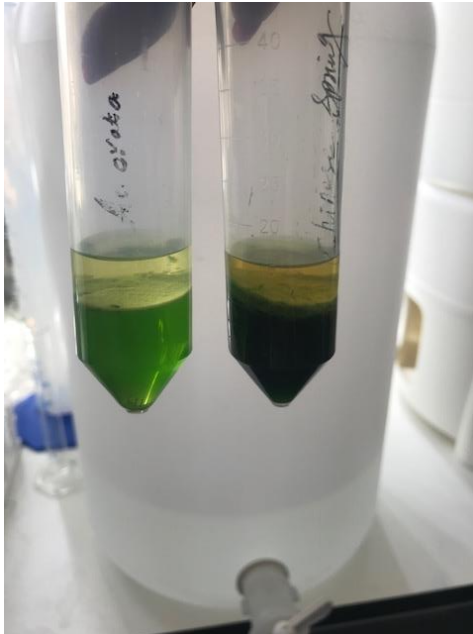


- mettre la poudre dans un tube sec et ajouter le tampon préchauffé et mélanger doucement. Évitez de laisser des matériaux secs aux bords du tube. Ajustez le volume CTAB pour obtenir une consistance pâteuse. Mélangez.



- incuber pendant 60 min à 60 ° C
- Ajouter un volume égal de chloroforme / alcool iso-amylque (24: 1); mélanger pendant environ 3 minutes, puis transférer le contenu dans des tubes de centrifugation à alésage étroit. Equilibrer la centrifugeuse en ajoutant du chloro/iso supplémentaire. Tourner 5 000 tr / min pendant 10 min (s'assurer que les tubes utilisés sont correctement placés et équilibrés). (Pour une isolation ADN extra-pure, nous filons et conservons le surnageant avant l'extraction du chloroforme).

- Récupérer le surnageant et répéter l'extraction du chloroforme jusqu'à ce que le surnageant devienne complètement clair (ou légèrement coloré).



- précipiter l'ADN avec 0,66volume d'iso-propanol froid. (laisser reposer une nuit entière)
- Transférer chaque échantillon dans 5mL de tampon de lavage (75% ethanol)
- retirer l'alcool du mélange, et laisser reposer jusqu'à ce que le culot soit entièrement sec et rajouter ensuite 1mL de T.E.B (tris-EDTA) à chaque échantillon.
- Ajouter 1 microlitre de 10 mg / ml d'ARNase à chaque mélange de 1 ml de T.E / DNA et incubé pendant 60 minutes à 37 ° C.

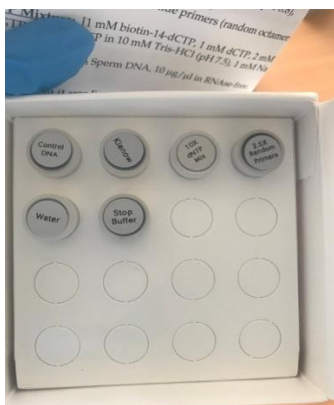


- Stériliser le matériel et dénaturer l'ADN en plaçant les tubes dans l'autoclave pendant 3min à 110°C. (ne pas oublier de piquer la fermeture des tubes pour y créer un trou) ; cette étape permettra le marquage d'ADN.



- Après avoir retiré les tubes de l'autoclave, on les place directement dans la glace pour empêcher les brins d'ADN de s'hybrider à nouveau

Marquage d'ADN :



(kit de marquage en annexe)

(Marqueur fluorescent DAPI pour le marquage des chromosomes qui se lie aux bases dTTP et dATP libres)



Quantification d'ADN

a. Spectrophotomètre

Il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur purification. La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet). Parallèlement on détermine leur pureté en mesurant l'absorbance à 280 nm, 230 nm et 320 nm.



Avant de procéder à la quantification, il faudra effectuer au préalable un blanc en utilisant le tampon d'extraction (2 microlitres d'EDTA dans ce cas).

On mesure deux ratios par la suite :

- **Ratio A260nm/A280nm :**

L'intérêt de l'utilisation du ratio A260nm/A280nm pour détecter la contamination d'acides nucléiques présente dans une solution de protéines. Maintenant, ce ratio est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques (Warburg et Christian, 1942).

- **Ratio A260nm/A230nm :**

« Le ratio A260/A230 est un deuxième indicateur de pureté, il est généralement plus élevé que le ratio A260/A280. Un ratio A260/A230 compris entre 2,0 – 2,2 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Lorsque ce ratio est significativement plus faible que 2,0 – 2,2, cela révèle la présence de contaminants absorbant à 230 nm dans la solution. Plusieurs contaminants absorbant à 230 nm proviennent de l'échantillon ou de la purification, comme par exemple le phénol, l'isothiocyanate de guanidine, les carbohydrates, les peptides, l'acide humique, l'urée, l'EDTA, les polysaccharides Leur présence est détectable grâce à ce ratio. » (ozyme.fr)

b. Electrophorèse sur gel d'agarose :



- **Préparation du gel d'agarose 0.5%**

Dans 50 mL d'eau distillée, on rajoute 0.25 g de poudre d'agarose.

On mélange et on met la solution au four à micro-ondes pendant 2 minutes en continuant à agiter de temps en temps.

On rajoute 3 microlitre de colorant et on verse la solution tiède du gel d'agarose dans le bac d'électrophorèse.

- **Quantification**

Marqueur de taille : 1.5µL Loading dye (colorant) + 5µL DNA Ladder



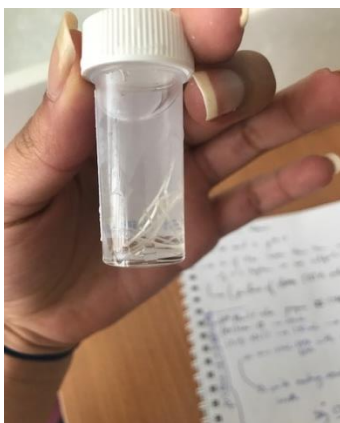
Les différentes bandes du marqueur de taille ont un poids moléculaire connu et une concentration en ADN connue. Ce qui permettra de connaître le poids moléculaire des bandes d'ADN des échantillons étudiés.

Observation des cellules du méristème apical racinaire :

On procède à l'extraction des racines à partir de graines d'orges germées. Ces racines sont ensuite fixées dans la glace pendant 24 heures.

Après 24h, rajouter 20 mL du (3 :1) ethanol acetic acid.

Observer les cellules au microscope optique



2. Banque de gène

A l'arrivée des graines à la banque de gènes provenant de différentes sources, un ensemble de tests sont réalisés pour contrôler les semences : tests sanitaires (les maladies et ravageurs), test d'hygrométrie (mesurer l'activité de l'eau dans la semence).



Après vérification de toutes les normes, on procède à l'emballage des graines dans des sachets scellés et on aspire l'air qui s'y trouve.



Ensuite on procède à la réduction du degré d'humidité à 4% pour les céréales et 7% pour les semences de légumineuses. Toutes les accessions seront stockées dans des chambres froides.

La banque de gène se trouvant à l'ICARDA dispose de deux types de collections d'accessions.

La première est dite une collection de base, stocké à une température de -18°C. Ce sont des semences destinées à être stockées pour le long terme (100 ans) où il y a trois générations de graines de la même accession. On tient à

noter qu'on ne garde que les graines avec un matériel génétique le plus proche du matériel de base.

La deuxième est une collection active destinée au stockage au moyen terme (20 à 40 ans) à une température qui varie entre 0-4°C à humidité relative de 25%. Une fois la collection active atteint les 1200 graines on procède à la régénération.



La régénération des graines se fait dans deux cas :

- Taux de viabilité des semences baisse et donc nécessité de « rajeunir » le stock.
- Accession a été utilisée très fréquemment, et donc diminution du nombre de graine d'où la nécessité de régénérer le stock.

Les types de variétés disponibles dans la banque de gènes à l'ICARDA sont des variétés : sauvages, primitives, obsolètes et cultivées améliorées.

3. Visite des champs

Les sites d'essays variétaux visités se trouvent à Marchouch dans la région de Rabat- Salé-Zemmour-Zaer.

La mise en place de ces essais est dans le but de la création de nouvelles variétés plus résistantes aux maladies et aux conditions climatiques des zones arides en croisant des variétés sauvages avec des variétés cultivées.

Les variétés cultivées sont utilisées comme pieds femelles pour garder son cytoplasme et n'apporter que l'ADN nucléaire de la variété sauvage.

Le processus de création variétale se fait en 3 étapes :

- PVT : Primilinary yield trial (essai de rendement primaire)- 3 ans
- AYT : advanced yield trial (essai de rendement avancé)- 3 ans
- UYT : uniform yield trial (test d'uniformité)

Après ces 3 essais la variété sera inscrite dans le catalogue des variétés de l'INRA.

III. Apports de stage

A la fin du déroulement du stage professionnel au sein de l'ICARDA, j'ai pu acquérir un nombre de compétences nouvelles et forger d'autres déjà acquises auparavant au cours de mon cursus à l'IAV.

Parmi ces compétences académiques, pratiques et relationnelles on peut citer :

Aspect technique et académique

- La familiarisation avec un matériel de laboratoire avancé déjà utilisé dans les laboratoires de l'institut agronomique lors des séances de travaux pratiques.
- La découverte d'un grand nombre de nouveaux matériaux et techniques tel que la quantification d'ADN, l'utilisation de marqueurs moléculaire...
- La lecture et la synthèse d'articles scientifiques rédigés en anglais dans le but d'en soutirer les méthodes à utiliser dans différents protocoles au sein du laboratoire et y apporter des modifications nécessaires pour les adapter aux besoins et à la disponibilité du matériel de laboratoire.
- Enrichir le vocabulaire scientifique en anglais (vu que la majorité des chercheurs avec qui j'ai l'honneur de travailler ne parle qu'en cette langue).
- Acquisition de polyvalence en joignant le travail sur le terrain au travail de laboratoire pour un même sujet
- Participation aux différents séminaires qui avaient lieu à l'ICARDA pendant mon mois de stage comme tout autre stagiaire et employés de la structure et pouvoir y discuter les idées.

Aspect relationnel et assiduité

- Respect des engagements envers les collègues de travail.
- Développer la créativité dans le cadre de propositions visant à améliorer et faciliter le travail.
- Reprise de confiance en soit et se réaliser au sein d'une équipe.
- Le fait d'être en open-space pendant la majeure partie du temps m'a permis non seulement à respecter le bien-être des collègues mais aussi d'imposer ma présence au sein de l'équipe.
- Ce stage m'a aussi permis de ne pas avoir peur de solliciter l'aide des personnes des différents départements en cas de besoin
- J'ai aussi eu l'occasion de bien présenter mon département et mon institut au sein de l'ICARDA et y laisser un bon écho derrière moi.