



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

PUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الإخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Biochimie Moléculaire et Santé*

Intitulé :

Appréciation de la variabilité génétique de quelques espèces du genre *Medicago* par les marqueurs biochimiques

Présenté et soutenu par : NEKKA Asma

Le : 15/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : KHELIFI Douadi (Professeur- UFM Constantine).

Rapporteur : BELLIL Inès (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

Examineurs : BENHAMDI Asma (Maitre de Conférences- UFM Constantine).

Année universitaire
2014 – 2015

Dédicaces

A mes parents,

*Qui au long de mon existence m'ont couvert d'amour et
d'affection et pour tout leurs sacrifices et efforts à faire de moi ce que
je suis.*

A ma chère sœur,

A mes frères,

A mon fiancé.

Remerciements

Avant tout, je remercie ALLAAH de m'avoir donné la volonté afin d'arriver à la finalité de ce modeste travail.

Je souhaite remercier très chaleureusement M^{elle} BELLIL INES docteur et Maitre de Conférences à l'université des Frères Mentouri Constantine, ma directrice de mémoire. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité votre efficacité et surtout votre rigueur scientifique. Merci pour votre aide et votre regard critique qui m'ont été grandement utiles au cours de mon travail pratique et lors de la rédaction de ce manuscrit.

Mes vifs remerciements vont aussi à Mr D. KHLIFI Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine, vous m'avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail. Pour l'honneur d'avoir accepté de présider le jury et pour vos conseils les plus importants, merci pour votre gentillesse.

A Melle A. BENHAMDI, vous me faites l'honneur d'être l'examinatrice du jury de ce mémoire. Je vous remercie de l'intérêt que vous apportez à ce travail. Je vous prie de trouver ici l'assurance de ma considération la plus respectueuse.

Merci à tous les membres du Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales de l'université des Frères Mentouri Constantine en l'occurrence Melle I. MEDOUKALI pour son aide dans la réalisation de cette étude.

Merci

ABREVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
AFLP	<u>Amplified fragment length polymorphism</u>
ALT	Altitude
CaCl₂	Chlorure de calcium
DG	Distance Génétique
MgCl₂	Chlorure de Magnesium
Mh	<i>Medicago hispida</i>
Mit	<i>Medicago italica</i>
Mlit	<i>Medicago littoralis</i>
Mmin	<i>Medicago minima</i>
Mp	<i>Medicago polymorpha</i>
Pm	Moyenne annuelle des Précipitations
PMSF	PhenylMethylSulfonyl Fluoride
Q2	Classical Emberger's coefficient
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamid Gel Electrophoresis Simple Sequence Repeats
SSRs	<u>Acide trichloroacétique</u>
TCA	Moyenne de la Température minimale du mois le plus froid
Tm	Moyenne de la Température maximale du mois le plus chaud
TM	

RÉSUMÉ

The genetic resources of living species are renewable only if they are preserved. *Medicago* are leguminous plants, having at the same time agronomy and ecological interests and represent an average naturalness of fight against the desertification. That's why, the preservation and the evaluation of the genetic diversity is an indispensable stage to the definition of the strategies of plants amelioration. It can be appreciated with the help of the biochemical markers.

Our study is a contribution to the enhancement of plant genetic resources, and assessing the genetic variability of the legume *Medicago* (alfalfa) analyzing polymorphism of biochemical markers (proteins) by using electrophoretic analysis.

We compared the profiles obtained by monodimensional electrophoresis of proteins (albumins) of populations belong many species the same king. The analysis of gels allowed counting 58 protein bands of differentes mobilities in *M.hispida* species, 53 protein bands in *M.polymorpha*, 53 protein bands in *M.minima*, 31 protein bands in *M.littoralis* and 30 protein bands in *M.italica*.

This study allowed us to identify 3 protein bands of albumins which are only present in *M.hispida*, and absent in the other species, they are: A1, A2 and A3. Proteins B1 and B2 are present only in *M. polymorpha*, the bands C1 and E1 found only in *M.minima*, *M.italica* respectively.

To appreciate numerically the diversity of these proteins, a statistical study was performed by calculating the frequencies, the genetic distance and a hierarchical classification of population according to the composition on proteins.

The results which we obtained make it possible to conclude that there is an inter and intraspecific polymorphism of albumins between the different accessions studied which results in number of the proteins and their variability.

Key words: *Medicago*, electrophoresis, genetic variability, albumins.

Les ressources génétiques des espèces vivantes ne sont renouvelables que si elles sont préservées. *Medicago* sont des légumineuses, possédant à la fois des intérêts écologiques et agronomiques et représentant un moyen naturel de lutte contre la désertification. C'est la raison pour laquelle la préservation et l'évaluation de la diversité génétique est une étape indispensable à la définition des stratégies d'amélioration des plantes. Elle peut être appréciée par les marqueurs biochimiques (protéiques).

Notre étude est une contribution à la valorisation des ressources phytogénétiques et l'appréciation de la variabilité génétique des légumineuses du genre *Medicago* (la luzerne) en analysant le polymorphisme des marqueurs biochimiques (albumines) par l'utilisation de l'analyse électrophorétique.

Nous avons comparé les profils obtenus par électrophorèse monodimensionnelle des albumines de différentes accessions appartenant aux groupes d'espèces du même genre. L'analyse des gels a permis de dénombrer 58 bandes protéiques de mobilités différentes chez l'espèce *M.hispida*, 53 bandes protéiques chez l'espèce *M.polymorpha*, 56 bandes protéiques chez l'espèce *M.minima*, 31 bandes protéique chez l'espèce *M.littoralis* et 30 bandes protéiques chez *M.italica*.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence 3 albumines présentes que chez *Medicago hispida* et absentes totalement chez les autres espèces à savoir A1, A2 et A3. Les protéines B1 et B3 sont présentes uniquement chez *M.polymorpha* et les bandes C1 et E1 se trouvent chez les deux espèce *M.minima* et *M.italica* respectivement.

Afin d'apprécier numériquement la diversité de ces protéines, une étude statistique a été effectuée en calculant les fréquences, la distance génétique et une classification hiérarchique des accessions selon la composition en protéines (albumines).

Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il existe un polymorphisme protéique inter et intra spécifique entre les différentes accessions étudiées, qui se traduit par le nombre des bandes répertoriées et leur variabilité.

Mots clés : *Medicago*, électrophorèse, variabilité génétique, albumines.

ملخص

ان الاصول الوراثية للكائنات الحية لا تكون متجددة إلا اذا كانت محفوظة. نبات البرسيم ينتمي الى عائلة البقوليات له عدة خصائص بيئية و فلاحية , يعتبر وسيلة طبيعية للوقاية ضد التصحر. لهذا الغرض فان المحافظة و تقييم التنوع الوراثي يعتبر مرحلة مهمة للغاية لإعداد استراتيجيات تحسين النباتات و يمكن تقييمها عن طريق المؤشرات البيوكيميائية. دراستنا هي المساهمة في تعزيز الموارد الوراثية النباتية، وتقييم التباين الوراثي الموجود لدى خمسة مجموعات من نبات البرسيم (*Medicago*) عبر تحليل تعدد أشكال علامات البروتينات بواسطة تقنية الهجرة الكهربائية للبروتينات (SDS-PAGE).

قمنا بمقارنة الاوضاع المتحصل عليها بواسطة الهجرة الكهربائية ذات البعد الواحد للألبومين لدى مجموعات مختلفة تنتمي ل صنف واحد. تحليل المواد الهلامية سمح لنا بحساب 58 شريط بروتيني ذوي هجرات مختلفة لمجموعة *M.hipida*. 53 شريط بروتيني لدى *M.polymorpha*. 56 شريط بروتيني لدى *M.minima*. 31 شريط بروتيني عند *M.littoralis* و 30 شريط بروتيني بالنسبة ل *M.italica*. سمحت لنا هذه الدراسة الى تحديد ثلاثة اشربة بروتينية تنتمي إلا لمجموعة *M.hipida* وغائبة بالنسبة لباقي المجموعات وهي : A2,A1 و A3 . البروتينات B1وB3 وجدت لدى *M.polymorpha* , **الاشربة E1 ! C1** وجدت عند المجموعة *M.minima ! M.italica* **على الترتيب**. لتقييم تنوع هذه البروتينات عددياً, تم اجراء دراسة احصائية عن طريق حساب الترددات , المسافة الوراثية و التصنيف الهرمي للأفراد عن طريق تكوين البروتينات. النتائج التي تحصلنا عليها تشير الى وجود إختلاف وراثي بين الأنواع و بين المجموعات التي تنتمي إلى نفس الصنف.

الكلمات المفتاحية: برسيم (*Medicago*) , الهجرة الكهربائية , الإختلاف الوراثي , بروتين الألبومين.

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : revue bibliographique.....	3
1. Généralités sur les légumineuses.....	3
2. Présentation du genre <i>Medicago</i>	3
2.1. Caractères généraux	3
2.2. Historique de la classification du genre <i>Medicago</i>	5
2.3. Distribution du genre <i>Medicago</i>	5
2.4. Position systématique	6
2.5. Les espèces spontanées rencontrées en Algérie.....	6
2.6. Le cycle de développement	8
2.7. Intérêt de la plante	9
3. Les espèces du genre <i>Medicago</i>.....	9
3.1. <i>Medicago polymorpha</i>	9
3.2. <i>Medicago minima</i>	10
3.3. <i>Medicago littoralis</i>	11
3.4. <i>Medicago italica</i>	11
4. La diversité génétique.....	12
5. Les marqueurs génétiques.....	12
5.1. Les marqueurs morphologiques.....	12
5.2. Les marqueurs moléculaires.....	12
5.3. Les marqueurs génétiques.....	13
6. Les protéines des légumineuses.....	13
Chapitre 2 : matériel et méthodes.....	15
1. Présentation du matériel végétal.....	15
2. Méthodes.....	15
2.1. Extraction des albumines.....	15
2.1.1. Préparation des échantillons.....	17
2.1.2. Delipidation de la farine.....	17
2.1.3. Extraction des Albumines.....	17
2.1.4. Préparation des extraits pour l'électrophorèse.....	17
2.2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide.....	17
2.3. Lecture des électrophoregrammes.....	18
2.4. Analyse statistique	18
Chapitre 3 : résultats et discussion.....	19
I. Analyse de la diversité intra-et interspécifique des espèces du genre <i>Medicago</i>.....	19

1. Analyse des profils électrophorétiques.....	19
1.1. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez <i>Medicago hispida</i>	19
1.2. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez <i>Medicago polymorpha</i>	21
1.3. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez <i>Medicago minima</i>	23
1.4. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez <i>Medicago littoralis</i>	24
1.5. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez <i>Medicago italica</i>	26
2. Etude de la variabilité des albumines du genre <i>Medicago</i>.....	27
2.1. Etude de la variabilité des albumines chez <i>Medicago hispida</i>	27
2.2. Etude de la variabilité des albumines chez <i>Medicago polymorpha</i>	29
2.3. Etude de la variabilité des albumines chez <i>Medicago minima</i>	30
2.4. Etude de la variabilité des albumines chez <i>Medicago littoralis</i>	32
2.5. Etude de la variabilité des albumines chez <i>Medicago italica</i>	33
3. Classification hiérarchique des albumines du genre <i>Medicago</i>.....	34
3.1. Dendrogramme des albumines des espèces du genre <i>Medicago</i>	34
3.2. Dendrogramme des albumines de l'espèce <i>Medicago hispida</i>	35
3.3. Dendrogramme des albumines de l'espèce <i>Medicago polymorpha</i>	36
3.4. Dendrogramme des albumines chez <i>Medicago minima</i>	37
3.5. Dendrogramme des albumines chez <i>Medicago littoralis</i>	38
3.6. Dendrogramme des albumines chez <i>Medicago italica</i>	39
4. Distance génétique des albumines des espèces du genre <i>Medicago</i>.....	39
4.1. Distance génétique interspécifique des espèces du genre <i>Medicago</i>	40
4.2. Distance génétique interspécifique de l'espèce <i>Medicago hispida</i>	40
4.3. Distance génétique interspécifique de l'espèce <i>Medicago polymorpha</i>	42
4.4. Distance génétique interspécifique de l'espèce <i>Medicago minima</i>	43
4.5. Distance génétique interspécifique de l'espèce <i>Medicago littoralis</i>	44
4.6. Distance génétique interspécifique de l'espèce <i>Medicago italica</i>	44
<hr/>	
Conclusion générale et perspectives.....	46
<hr/>	
Références bibliographiques.....	48
<hr/>	
Annexe.....	52
<hr/>	

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

TABLE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure 1: présentation morphologique du genre <i>Medicago</i>	4
Figure 2: présentation morphologique des gousses et graines du genre <i>Medicago</i>	4
Figure 3: distribution géographique du genre <i>Medicago</i> dans le monde	5
Figure 4: cycle de développement de la luzerne pérenne.....	8
Figure 5: <i>Medicago polymorpha</i>	10
Figure 6: <i>Medicago minima</i>	10
Figure 7: <i>Medicago littoralis</i>	11
Figure 8: <i>Medicago italica</i>	11

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Figure 9: profils électrophorétiques des albumines de <i>M. hispida</i> révélées par SDS/PAGE.....	20
Figure 10: profils électrophorétiques des albumines de <i>M. polymorpha</i> révélées par SDS/PAGE	22
Figure 11: profils électrophorétiques des albumines de <i>M. minima</i> révélées par SDS/PAGE	24
Figure 12: profils électrophorétiques des albumines de <i>M. littoralis</i> révélées par SDS/PAGE.....	25
Figure 13: profils électrophorétiques des albumines de <i>M. italica</i> révélées par SDS/PAGE.....	26
Figure 14: Dendrogramme des albumines des espèces du genre <i>Medicago</i>	35
Figure 15: Dendrogramme des albumines de <i>Medicago hispida</i>	36
Figure 16: Dendrogramme des albumines de <i>Medicago polymorpha</i>	37
Figure 17: Dendrogramme des albumines de <i>Medicago minima</i>	38
Figure 18: Dendrogramme des albumines de <i>Medicago littoralis</i>	38
Figure 19: Dendrogramme des albumines de <i>Medicago italica</i>	39

TABLE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau 1 : Espèces spontanées en Algérie	6
--	---

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

Tableau 2 : liste des accessions et leur origine géographique.....	16
---	----

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau 3 : variation des bandes protéiques A1, A2, A3, A4 et A5.....	19
Tableau 4: variation des bandes protéiques B1, B2, B3, B4 et B5.....	21
Tableau 5: variation des bandes protéiques C1, C2 et C3.....	23
Tableau 6: variabilité des bandes protéiques D1, D2 et D3.....	25
Tableau 7: variabilité des bandes protéiques E1, E2 et E3.....	26
Tableau 8: variabilité des albumines chez <i>M. hispida</i>	27
Tableau 9: variabilité des albumines chez <i>M. polymorpha</i>	29
Tableau 10: variabilité des albumines chez <i>M. minima</i>	30
Tableau 11: variabilité des albumines chez <i>M. littoralis</i>	32
Tableau 12: variabilité des albumines chez <i>M. italica</i>	33
Tableau 13: distances génétiques interspécifiques des espèces du genre <i>Medicago</i>	40
Tableau 14: distances génétiques intra spécifiques de <i>M. hispida</i>	41
Tableau 15: distances génétiques intra spécifiques de <i>M. polymorpha</i>	42
Tableau 16: distances génétiques intra spécifiques de <i>M. minima</i>	43
Tableau 17: distances génétiques intra spécifiques de <i>M. littoralis</i>	44

INTRODUCTION

Les Légumineuses (Fabacées) constituent un taxon végétal très important d'un point de vue biologique et écologique mais également agronomique et environnemental. En effet, leur culture fournit depuis les débuts de l'agriculture une source essentielle de protéines pour l'alimentation humaine et animale. Leur capacité à fixer l'azote atmosphérique génère un double intérêt, économique par une moindre utilisation d'engrais azotés de synthèse, et écologique par une limitation des fuites azotées. En Algérie, le déficit structurel en protéines végétales constitue un argument favorable à l'accroissement des surfaces cultivées en Légumineuses où en dépit de leurs nombreux avantages elles occupent moins de 5 % de la surface allouée aux grandes cultures (25 % de la superficie sont affectés aux céréales fourragères : maïs, sorgho, orge, avoine et seigle. La luzerne et le trèfle, sont peu représentatifs avec 1 à 5 % de la superficie cultivée). Les Fabacées suscitent donc un regain d'intérêt avec le souhait que l'agriculture moderne évolue vers des pratiques durables plus respectueuses de l'environnement tout en évitant les pollutions liées à l'usage intensif de produits phytosanitaires ou la diminution de la biodiversité. Pour atteindre ce double objectif, il convient de mettre en œuvre des pratiques agricoles qui garantissent la préservation des ressources naturelles.

La nécessité de conserver les ressources génétiques est devenue un enjeu politique et économique, car la production agricole actuelle et future dépend en grande partie de la diversité génétique disponible pour l'amélioration des plantes. La mise en valeur de ces dernières dans l'amélioration ne peut être réalisée qu'après une étude génétique, biochimique et moléculaire approfondie.

Les évaluations qui ont pour objectif de décrire la diversité peuvent faire appel à des marqueurs biochimiques (protéines de réserve et certains systèmes enzymatiques) ou moléculaires (marqueurs RFLP, microsatellites, etc.) ou protéomiques (recherche de certains protéomes pour couvrir la diversité génétique)

Notre travail s'inscrit dans ce contexte. Il a pour objectifs la valorisation des ressources phylogénétiques et l'appréciation de la variabilité génétique des légumineuses du genre *Medicago* (la luzerne) par l'analyse du polymorphisme des marqueurs biochimiques

(albumines) de différentes accessions appartenant aux groupes d'espèces du même genre, par l'utilisation de l'analyse électrophorétique.

Les données bibliographiques sont présentées dans le premier chapitre de ce mémoire, avec une présentation générale des légumineuses et plus particulièrement le genre *Medicago* et ses espèces, tout en mettant l'accent sur la diversité génétique et les marqueurs génétiques (morphologique, moléculaire et biochimique), ainsi que les protéines des légumineuses. Le deuxième chapitre décrit le matériel végétal et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude. Les étapes suivies dans l'exploitation des résultats ainsi que leur discussion sont présentées dans le troisième chapitre. Une conclusion générale et des perspectives sont enfin données.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses représentent un groupe de plantes à fleurs (angiosperme) dicotylédones, ce groupe botanique possède un grand intérêt économique (Ozenda, 1982). Elles sont aussi considérées comme une excellente source de fourrages, d'engrais verts. Elles produisent un grand nombre de substances toxiques et médicales en raison de la présence de certains alcaloïdes (Unesco, 1960). Cette famille est la plus grande d'angiospermes en nombre d'espèces (après les Orchidacées et les Astéracées) avec plus de 18000 espèces de répartition mondiale, classées en 750 genres environ (Ildis, 2001) caractérisés par une large diversité, et dominés par les espèces ligneuses et vivaces. La taxonomie des légumineuses est en constante évolution. En effet, cette famille est divisée en 3 sous familles qui correspondent véritablement à des groupes monophylétiques (Doyle et *al.* 2000). Chacune des sous familles est divisée en tribus et sous tribus définies d'après des caractéristiques morphologiques et regroupant plusieurs genres apparentés. Ces trois sous familles parfois considérées comme trois familles différentes sont les suivantes (Spichiger, 2004) :

- **Les Papilionacées:** devenues la famille des fabacées avec environ 500 genres et 1000 espèces comme *Medicago* et *Trifolium*. Les plantes de cette sous-famille sont principalement des herbes, mais comprenant aussi des arbres et arbustes, présents en régions tempérées et tropicales.
- **Les Mimosacées:** rassemblant surtout des arbres et des arbustes des régions tropicales et subtropicales avec environ 2000 espèces (ex: *Mimosa*, *Acacia*).
- **Les Césalpiniacées:** comportant près de 150 genres et 2000 espèces (ex : arbre de Judée).

Les légumineuses fourragères représentent une source d'alimentation riche en protéines, fibres et énergie. Elles sont à la base de la production de lait et de viande (Russelle, 2001).

2. Présentation du genre *Medicago*

2.1. Caractères généraux

Le genre *Medicago* (luzerne), légumineuse de la famille des Fabacées constitue un groupe taxonomique largement distribué dans les centres de diversification recouvrant le pourtour Méditerranéen et l'Eurasie. Il comporte un grand nombre d'espèces annuelles et pérennes utilisées depuis fort longtemps comme excellents fourrages.

Selon Fournier (1961) ; le terme « *Medicago* », vient du mot latin « *Medica* » ou « herbes de médic », il fut modifié par Dalechamps en 1587, et devient : *Medicago*.

Les espèces du genre *Medicago* sont soit herbacées ou arbustives, à de fortes racines pivotantes pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur. Les tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentés au sommet et présentent des inflorescences en grappe. Les stipules sont larges de forme allongée ou cordiforme. Les fleurs dont la couleur varie du mauve au jaune sont portées sur un long racème qui contient jusqu'à 20 fleurs (Lapeyronie, 1982; Mathieu, 2003) (Figure 1).



Figure 1: présentation morphologique du genre *Medicago*

La fécondation est allogame chez les espèces vivaces et autogame chez les espèces annuelles (Prosperi et *al.*, 1993). Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en forme de faucille, soit spiralée (de 1 à 4 spires) parfois épineuse. La graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 10 mm (Mathieu, 2003; Hireche, 2006) (Figure 2).



Figure 2: présentation morphologique des gousses et graines du genre *Medicago*

2.2. Historique de la classification du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* est proche du genre *Melilotus*, *Trigonella* et *Trifolium*. Il comprend un grand nombre d'espèces diploïdes, tétraploïdes, exceptionnellement hexaploïdes (*M. arborea*, *M. saxatilis*). Le nombre chromosomique de base est $x = 8$, exceptionnellement $x = 7$ (*M. polymorpha*, *M. praecox*, *M. rigidula* et certaines formes de *M. murex*). Plusieurs classifications du genre *Medicago* furent proposées par plusieurs botanistes et taxonomistes (Urban, 1872 in Schoutteten, 2004 ; Heyn, 1963; Lesins et Lesins, 1979; Ernest *et al.*, 1998).

Lesins et Lesins (1979) recensent 55 espèces herbacées, 34 annuelles et 21 pérennes, parmi lesquelles une dizaine sont cultivées et dont la plupart sont présentes dans les pâturages ou parcours, notamment méditerranéens. Ils divisent le genre en 4 sous genres (*Lupularia*, *Orbicularia*, *Falcago*, *Spirocarpus*) et 14 sections (Schoutteten, 2004).

Selon Ernest *et al.* (1998), le genre *Medicago* comporte 86 espèces (annuelles, bisannuelles et vivaces) représentant l'ensemble des 12 sections et 8 sous sections.

2.3. Distribution du genre *Medicago*

L'origine des espèces du genre *Medicago* ne fait pas l'unanimité selon les auteurs. En effet, pour Lapeyronie (1982), elles sont distribuées dans le bassin méditerranéen (le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le proche Orient), certaines ont été introduites en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord. D'après Derek et Ernest (1997), elles sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique et se sont répandues dans d'autres continents sous forme de mauvaises herbes (Figure 3).

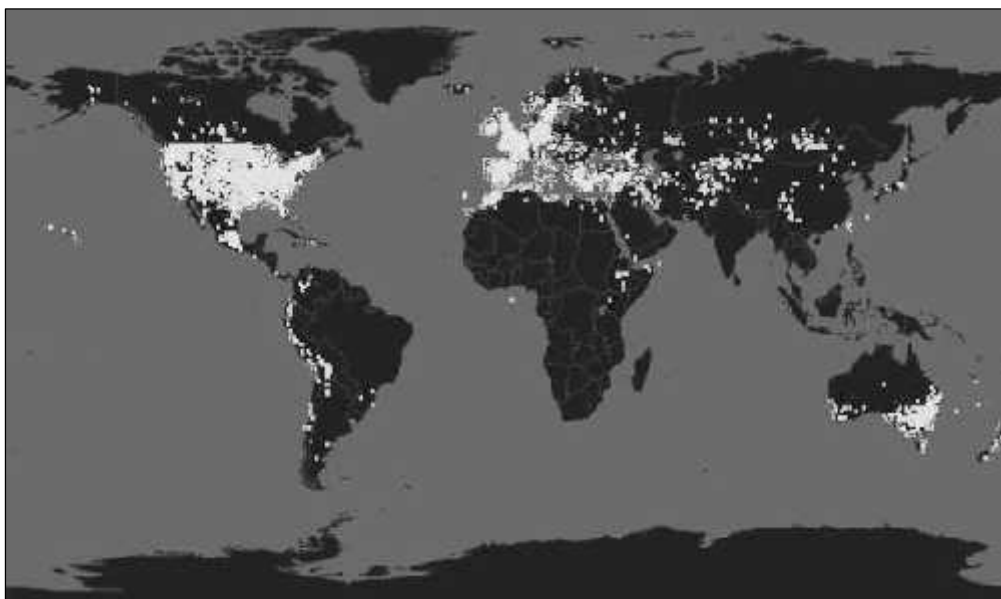


Figure 3: distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde (Proela, 2002).

Les travaux de Mathieu (2003) et Hireche (2006) affirment qu'au cours de XIX siècle, les luzernes (les espèces du genre *Medicago*) ont conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne, ensuite elles ont envahi d'autres parties du monde, en particulier les continents Américains et Australiens à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine.

Les luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides (Lapeyronie, 1982).

2.4. Position systématique

Selon Small et Jomphe, 1989, la position systématique du genre *Medicago* est la suivante :

- Règne : *Plantae*
- Embranchement : Spermatophytes
- Sous- embranchement : Angiospermes
- Classe : Dicotylédones
- Sous- classe : Rosidées
- Ordre : Fabales
- Famille : Fabaceae
- Sous-famille : *Faboideae*
- Tribus : *Trifolieae*
- Genre: *Medicago* (L.)

2.5. Les espèces spontanées rencontrées en Algérie

Le genre *Medicago* en Algérie est représenté par de nombreuses espèces spontanées dont les plus importantes sont décrites par Quezel et Santa, 1962 (Tableau 1).

Tableau 1: Espèces spontanées en Algérie

Nom d'espèce	Type de plante	Gousse	Fleur	Habitat
<i>M. intertexta</i>	annuelle	glabre de 12 à 15 mm	Jaune	pâturages, Tell Algéro-constantinois
<i>M. ciliaris</i>	annuelle	Velue hirsute, plus ou moins glanduleuses de 10-15 mm	Jaune	Pâturages, prairies, Tell à sol semi salin

<i>M. falcata</i>	Vivace	Courbée en faucille ou en anneaux, pubescente	Jaune	Pâturages argileux
<i>M. lupulina</i>	Annuelle ou bisannuelle	Réniforme, fortement arquée de 2–3 mm de diamètre	Jaune	Pâturages
<i>M. secundiflora</i>	Annuelle ou bisannuelle	Brun clair de 2-2.5 mm	Jaune	Pâturages
<i>M. marina</i>	Vivace	Contournée en hélice	Jaune	sables maritimes
<i>M. sativa</i>	Vivace	glabre ou pubescente, à 2-3 tours de spire	Violettes ou jaunes lavées de brun	Cosmopolite
<i>M. scutellata</i>	annuelle	Hémisphérique à spires emboîtées de 13-15 mm	Jaune	Sols argileux du Tell
<i>M. orbicularis</i>	annuelle	Ovoïde à 5-6 tours de spires	Jaune	Pâturages du Tell
<i>M. rugosa</i>	annuelle	Ne dépassant pas de 9 mm	Jaune	Pâturages de Constantine et Alger
<i>M. soleirolii</i>	annuelle	Glabres	Jaune	Pâturages du Tell Constantinois
<i>M. rigidula</i>	annuelle	Glanduleuse- fortement pubescente de 10 mm	Jaune	Broussailles, Montagnes
<i>M. tuberculata</i>	annuelle	Tronquée à sa base, Glabre de 10 mm	jaune	Pâturages arides
<i>M. truncatula</i>	annuelle	Tronquée à ses deux extrémités De 7-8 mm	jaune	Tell – Pâturages
<i>M. littoralis</i>	annuelle	Ovoïde ou globuleuse de 10 mm	jaune	Pâturages
<i>M. murex</i>	annuelle	Glabres ou faiblement hispides	jaune	Tell Algéro-Constantinois
<i>M. minima</i>	annuelle	Contournée en hélice, pubescente de 3-4 mm	jaune	Sols pauvres
<i>M. arabica</i>	annuelle	Glabre de 5-7 mm	jaune	Tell Algéro-Constantinois
<i>M. laciniata</i>	annuelle	Ovoïde ou sphéroïdale de 5-6 mm	jaune	Paturages arides- Montagnes

<i>M. hispida</i>	annuelle	Fortement réticulée- striée de 5-9 mm	jaune	Tell – Pâturages
-------------------	----------	--	-------	------------------

2.6. Le cycle de développement

D'après Mathieu (2003), le cycle de développement des espèces du genre *Medicago* passe par différents stades végétatifs (Figure 4) :

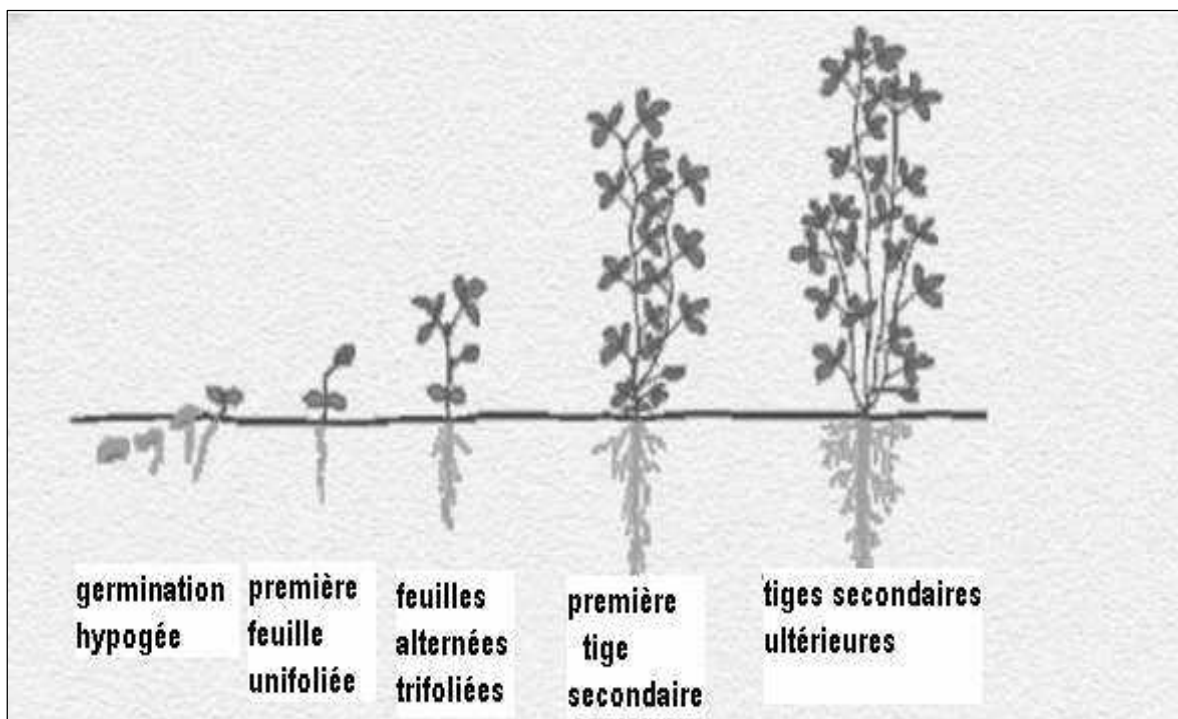


Figure 4: cycle de développement de la luzerne pérenne (Prolea, 2002).

- **Stade 1** : la plante est une dicotylédone (germination hypogée).
- **Stade 2** : l'apparition de la première feuille (unifoliée).
- **Stade 3** : les feuilles sont alternées et composées de trois folioles rattachées à la tige par un pétiole (trifoliées). Au cours de son développement, la première tige croît en produisant des feuilles alternées. Les feuilles sont en général de type trifoliées mais il existe des feuilles multifoliées à 4, 5, 6 voire de 7 folioles portées sur un pétiole.
- **Stade 4** : un bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée se développe pour donner une tige secondaire. Deux autres tiges secondaires démarrent à sa suite depuis le niveau des cotylédons. Les luzernes pérennes de type non dormant produisent plus de tiges secondaires à partir du niveau des cotylédons que les types dormants dont la croissance est stoppée en hiver. C'est cet ensemble de tiges qui va former le collet.
- **Stade 5** : le développement des tiges permet de distinguer des tiges primaires, secondaires et tertiaires.
- **Stade 6** : floraison, maturité.

2.7. Intérêt de la plante

La luzerne est cultivée pour sa richesse en protéines (allant jusqu'à 55%) et ses qualités d'amélioration des sols. Les espèces du genre *Medicago* sont abondamment répandue dans les contrées tempérées tant à l'état sauvage que cultivé. La luzerne est utilisée pour l'alimentation du bétail.

Elle est parmi les légumineuses, qui fournit le plus de protéines brutes à l'hectare : 2000 à 3000 Kg, soit trois fois plus qu'une culture de soja, deux fois plus que le pois et quatre fois plus que le blé (Barker et *al.*, 1990 ; Cook, 1999).

Ces plantes fourragères sont souvent utilisées dans les systèmes de rotation « céréales-Luzerne » (Fyad-Lameche., Yahia, 1993). Elles améliorent la fertilité et reconstituent le taux de matière organique du sol.

La luzerne fixe l'azote atmosphérique mais elle utilise préférentiellement l'azote nitrique présent dans le sol dont la concentration diminue d'année en année lors d'une culture de luzerne. Elle permet donc de récupérer et de soustraire au lessivage les surplus de nitrates dans le sol, protégeant ainsi les nappes phréatiques (Moreau et *al.*, 2007).

En raison de sa composition chimique exceptionnelle, la luzerne constitue une plante médicinale de choix, elle est tonique et reminéralisante, luttant contre l'acidification. Elle a des effets purifiants et désintoxiquant pour les tissus. Enfin elle prévient et combat l'excès de cholestérol. Elles entrent aussi dans la composition d'une boisson diététique appréciée par les athlètes (Grahamnet Vance, 2003 ; Gepts et *al.*, 2005).

6. Les espèces du genre *Medicago*

3.1. *Medicago polymorpha*

C'est l'espèce la plus polymorphe et la plus ubiquiste, on peut la trouver aussi bien dans des sols acides, sur des prairies basses et salées du bord de la méditerranée que dans les garrigues les plus arides. Elle est considérée comme précoce et relativement sensible au froid.

La plante est glabre (lisse), de port et de vigueur variables (demi-prostré à prostré). L'inflorescence porte de 2 à 6 fleurs. Elle produit les gousses relativement milles de 3 à 12 mm de diamètre, de 1 à 6 spires non jointives, souvent à forte épines, cependant de formes sans épines peuvent exister ce qui limite grandement sa dissémination naturelle puisque la gousse est habituellement transportée par les animaux dans leur pelages. Le poids de 1000 graines est compris entre 1,8 et 6,5g. Elle est diploïde ($2n=14$) et autogame (Prosperi, 1995) (Figure 5).

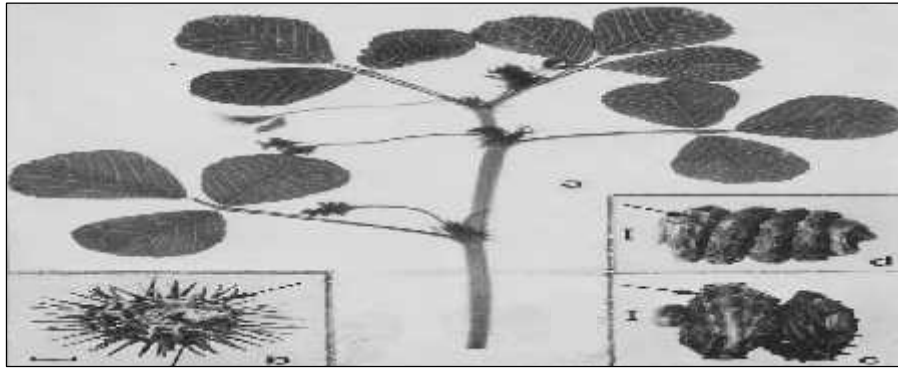


Figure 5: *Medicago polymorpha*.

3.2. *Medicago minima*

C'est une plante annuelle la plus largement distribuée. Elle pousse principalement dans les sols secs, sur les coteaux rocheux ainsi que dans le sable (Urban, 1873). La plante est entièrement pubescente et en particulier à folioles veloutées- hispides sur leur deux faces. Les fleurs sont très petites (3-4 mm) et sur un pédoncule aristé assez court. Les gousses sont de 3-4 mm sans les épines, à aiguillons très denses, filiformes et dressés (Quezel et santa, 1962).

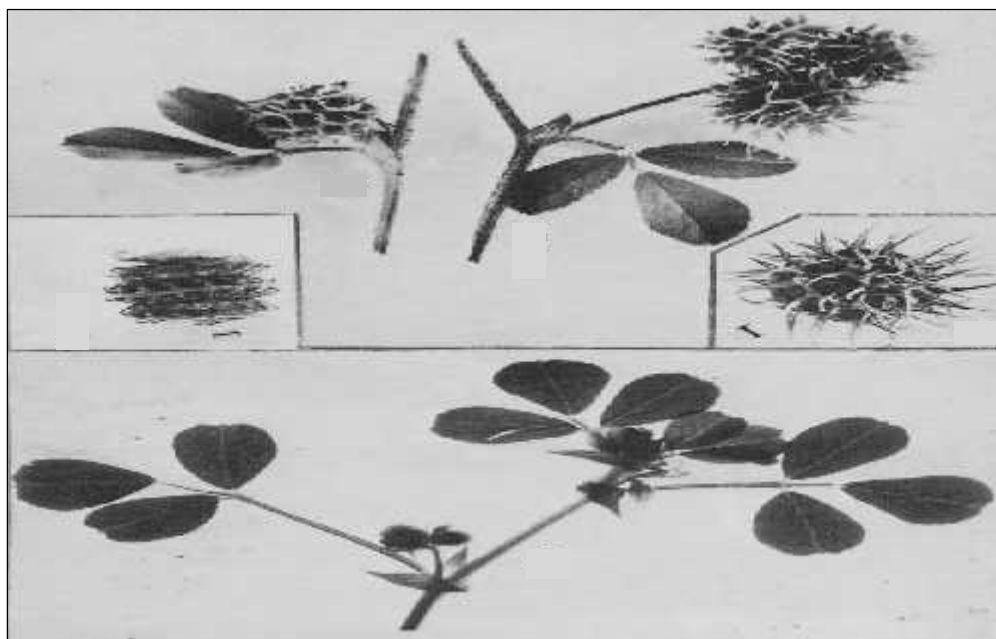


Figure 6: *Medicago minima*.

3.3. *Medicago littoralis*

La luzerne du littoral, ou luzerne des grèves (*Medicago littoralis*) est l'une des nombreuses luzernes à fleurs jaunes (3-7 fleur) qui poussent en région méditerranéenne. On la rencontre surtout sur les sables du littoral et sur les coteaux rocheux. Plante généralement rampante, on la

distingue des espèces voisines par ses stipules à dents pointues et par ses gousses cylindriques de 3-6 mm de diamètre avec une suture dorsale portant les épines, non ou à peine saillante, jamais entourée de sillons. (Quezel et santa, 1962).

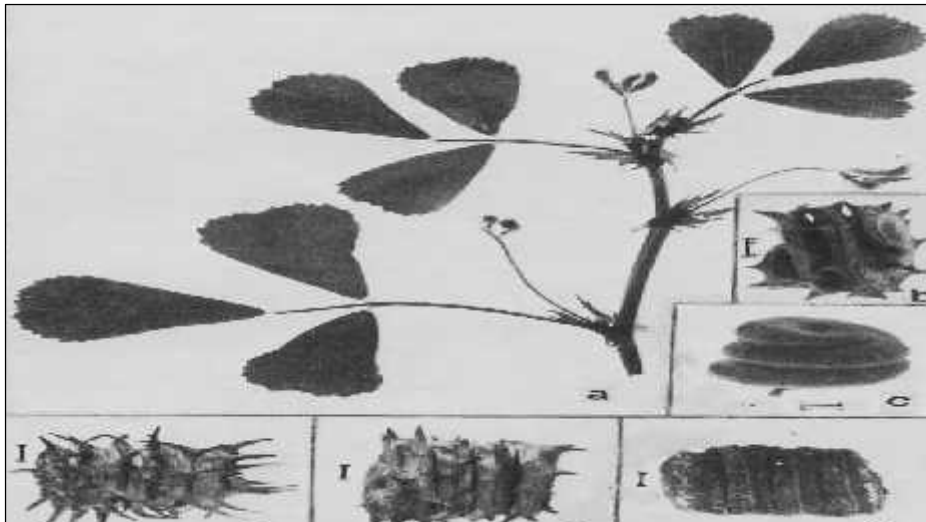


Figure 7: *Medicago littoralis*.

3.4. *Medicago italica*

C'est une plante annuelle glabrescente très variable, avec gousses internes, contournées en hélice à fleurs nombreuses (10-25) en grappes denses, rarement par 3-5 (Quezel et santa, 1962).



Figure 8: *Medicago italica*.

7. La diversité génétique

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages

ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité (Parizeau, 1997).

L'étude de la diversité génétique est une des applications les plus répandues pour les marqueurs. Selon le but de l'étude, on peut être intéressé à mesurer la diversité génétique entre des espèces (niveau interspécifique) ou encore entre divers individus ou populations au sein d'une même espèce (niveau intra-spécifique).

L'étude de la diversité ou polymorphisme génétique est liée au développement de la biologie qui a permis le développement de plusieurs marqueurs.

8. Les marqueurs génétiques

Les marqueurs génétiques sont des caractéristiques héréditaires qui renseignent sur le génotype de l'individu qui les porte (de Vienne, 1998). Trois types sont largement utilisés pour l'évaluation de la variabilité génétique, à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires.

Le choix d'un bon marqueur par le chercheur est aussi basé sur la technicité et le coût de l'expérience qui doivent être abordables en vue d'une manipulation à grande échelle.

5.1. Les marqueurs morphologiques

Dans les programmes de sélection des plantes, les caractères morphologiques sont les premiers à être observés. Ces caractères intéressent diverses parties de la plante, par exemple longueur des tiges, surface foliaire, initiation de la floraison (Cui et al. 2001 ; Gomez et al. 2004). Ces caractères sont utilisés de même pour estimer la variation intra- et inter-populations. Ils sont généralement limités en nombre de caractères relevés et directement influencée par l'environnement. Néanmoins, ils fournissent des informations utiles pour décrire et identifier le matériel biologique (Andersson et al. 2006).

5.2. Les marqueurs moléculaires

Basés sur l'ADN (RFLP, RAPD, AFLP, SSRs, etc.), ils ont été beaucoup utilisés pour identifier, maintenir, caractériser et évaluer les ressources génétiques avec plusieurs espèces de plantes. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), les marqueurs moléculaires ne sont pas influencés par les fluctuations de l'environnement et sont indépendants de l'organe analysé et du stade de développement de la plante. Parmi ces marqueurs, les microsatellites sont les outils les plus polymorphes et informatifs. Des marqueurs moléculaires liés à des caractères d'intérêt ou quantitative traits loci (QTL)

présentent l'avantage d'être indépendants à l'environnement d'où la possibilité de les caractériser à différents stades de développement de la plante.

5.3. Les marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs utilisés pour étudier la variabilité génétique en œuvre (Harry, 2001). En 1966 deux avancées, l'une conceptuelle et l'autre technologique, ont permis d'appréhender pour la première fois la variabilité génétique. En effet l'étude des gènes pouvait être faite de façon indirecte au travers de l'étude de la séquence des acides aminés codés par ces gènes, en partant du principe que toute variation de la séquence d'acide aminé reflète une variation au niveau du gène codant pour cette protéine. L'avancée technologique repose sur la mise au point de l'électrophorèse des protéines (Harry, 2001).

6. Les protéines des légumineuses

Les végétaux représentent une source importante de protéines, qui sont essentiellement les prolamines, glutélines, les globulines et les albumines. Les aliments qui procurent le plus de protéines dans une alimentation végétarienne sont les légumineuses.

Pour le bon développement des embryons, les végétaux assurent à ces derniers un apport en protéines de réserve, il s'agit chez les angiospermes des cotylédons et de l'albumen.

Les protéines de réserve des organes végétatifs des légumineuses ne serviraient pas exclusivement de réserve azoté pendant des phases spécifiques de leur développement, mais elles pourraient également jouer un rôle adaptatif dans la protection de ces plantes contre des stress de type abiotique (basse température) et biotique (attaque par des pathogènes) (Avice.J ; 2003). Les graines comme tout autre organe végétal, renferment un très grand nombre de protéines différentes (protéines de structure, protéines biologiquement actives et protéines de réserve).

En 1924, Osborne, fut le premier à les avoir classés selon leur solubilité dans des solvants différents, et ces fractions de protéines sont les suivantes :

- Albumine : soluble dans l'eau.
- Globulines : solubles dans les solutions salines.
- Prolamines : solubles dans l'éthanol aqueux
- Glutélines : résidus insolubles.

Les protéines des légumineuses sont essentiellement constituées de fractions solubles donc essentiellement d'albumines et de globulines.

Les albumines représentent (10 à 20%) des fractions protéiques des légumineuses. La protéine précurseur est composée de trois sous-unités, d'environ 14, 24 et 46 KDa liées par des ponts disulfures (shewry et al, 1995), relativement riches en acides aminés soufrés et en lysines. D'après l'étude de Salmanowicz (2000) leurs poids moléculaire varie de 4000 Da à 7000 Da et de 8000 Da à 11000 Da.

Blagrove et Gillespie (1978) ont montré que les albumines contiennent les plus hauts niveaux de plusieurs acides aminés essentiels y compris la cystine et particulièrement la méthionine par rapport aux globulines. La fraction albumine contient la plupart des enzymes présents dans les graines (Applewhite, 1989). Elles contiennent également d'autres protéines solubles telles que les lectines et les inhibiteurs de protéase (Lqari et *al*, 2004). Les albumines sont des molécules ayant un rôle fonctionnel dans la cellule.

MATERIEL ET METHODES

1. Présentation du matériel végétal

L'objectif principal visé à travers cette étude est l'évaluation de la variabilité génétique des protéines de type albumines des légumineuses du genre *Medicago* collectées au Nord Algérien avec un total de 81 accessions (Tableau 2). Cette collection a été collectée durant l'année 2012-2013. Les accessions originaires de différentes régions d'Algérie appartiennent à 5 groupes d'espèces du genre *Medicago* en fonction de leurs caractères morphologiques :

- *Medicago polymorpha* var. *polymorpha* (*hispidula*)
- *Medicago polymorpha* var. *vulgaris*
- *Medicago minima*
- *Medicago littoralis*
- *Medicago italica*

L'étude des caractères morphologiques des 5 espèces du genre *Medicago* a été déroulée au laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales de l'Université des Frères Mentouri Constantine (Medoukali et al, 2015). Certains caractères biométriques ont été choisis pour étudier les similarités entre les espèces : la taille des graines (longueur et largeur), nombre de graines par gousse, taille des gousses (longueur et largeur), poids de 30 gousses, poids de 1000 graines, rapport poids des graines/poids des gousses, date d'émergence des cotylédons, longueur de la première feuille, largeur de la première feuille et surface de la première feuille.

3. Méthodes

3.1. Extraction des albumines

Le « fractionnement d'Osborne » a constitué très rapidement la référence des méthodes d'extraction et de purification des protéines des plantes. Cette procédure, décrite par Osborne en 1924, assemble différentes méthodes d'extraction en un fractionnement séquentiel. Elle s'applique à tout matériel de graines broyées et s'appuie sur les différentes propriétés de solubilité des familles de protéines de plantes.

L'extraction des albumines a été réalisée à partir de graines de différentes accessions des cinq groupes d'espèces du genre *Medicago*.

Tableau 2 : liste des accessions et leur origine géographique

N°	Régions	Accessions	ALT	Pm	Tm	TM	Q2
1	Mila	Mp1,2	757	568	2,5	31,3	67,65
2	Constantine1	Mp3, Mh1	429	704	3,2	31,4	85,63
3	Constantine2	Mp4, Mmin1, Mh2	850	558	3	32,2	65,55
4	Constantine3	Mp5, Mh3	584	624	3,3	32	74,58
5	Oum Bouaghi1	Mp6	883	462	0,4	31,3	51,28
6	Oum Bouaghi2	Mp7	795	454	1,9	31,7	52,26
7	Oum Bouaghi3	Mp8, Mmin2	1010	492	0,4	30,8	55,51
8	Tipaza	Mmin3, Mh17, Mlit1, Mit2,3	196	626	8,4	30,1	98,95
9	Bourdj bouariridj1	Mp9, Mmin4	907	368	1,6	33,4	39,69
10	Bourdj bouariridj2	Mp10, Mmin5	997	495	0,2	31,1	54,95
11	Sidi Belabbes	Mh18	465	450	4,8	29,7	61,99
12	Bouira	Mp12, Mh12	537	506	0,2	30,9	56,53
13	Akhdaria	Mp11, Mh13	144	711	5,9	31,9	93,80
14	Boumerdès	Mh19	20	739	6,8	30,8	105,62
15	Tizi Ouzou	Mh16	129	896	6,2	32	119,12
16	Alger1	Mh7	120	707	8,1	28,5	118,87
17	Alger2	Mh8	3	670	7,6	29,8	103,52
18	Alger3	Mit1, Mlit2	1	666	8,4	28,3	114,79
19	Alger4	Mh9, Mmin6	172	762	6,9	28,4	121,57
20	Blida	Mh15	70	791	7	30,9	113,52
21	Mostaganem	Mh14, Mp13, Mmin7, Mlit3	94	347	8,3	27,8	61,04
22	Ain Defla1	Mp15, Mh4	396	593	6	33,5	73,96
23	Ain Defla 2	Mmin8, Mh5, Mp16,	257	593	6	33,5	73,96

		Mit5						
24	Ain Defla 3	Mp17, Mh6	382	593	6	33,5	73,96	
25	Relizane	Mmin9, Mh20	58	348	6,8	31,1	49,12	
26	Chlef	Mp14, Mh21	135	405	6,6	32,6	53,43	
27	Mascara	Mh22, Mp18	281	368	7,5	29	58,71	
28	Medea	Mmin10, Mp19, Mh23	385	736	2,5	30,6	89,84	
29	Tissemsilt	Mh24, Mp20, Mmin11	575	609	1,1	30,1	72,03	
30	Guelma	Mp21, Mh25	798	564	1,9	32,1	64,06	
31	Annaba	Mh26, Mp22	132	712	8,2	28,1	122,72	
32	Akbou	Mh10	207	659	6,2	31,3	90,05	
33	Tichy	Mh11	2	856	8,7	28,9	145,35	
34	Sétif 1	Mp23, Mmin12	1022	482	1	31,3	54,56	
35	Sétif2	Mmin13	1062	473	0,3	31,7	51,67	
36	Batna	Mh27, Mp24	946	335	0,7	32,6	36,02	
37	Jijel1	Mp25	166	818	8,2	29,3	132,97	
38	Jijel2	Mp26	132	818	8,2	29,3	132,97	
39	Jijel3	Mlit4	9	818	8,2	29,3	132,97	
40	Oran	Mh28, Mp28, Mmin14	87	383	8,2	26,6	71,40	
41	Skikda1	Mlit5	11	767	7,1	28,5	122,94	
42	Skikda2	Mp27, Mmin15	32	767	7,1	28,5	122,94	
43	Skikda3	Mit4	159	794	5,7	29,6	113,95	

3.1.1. Préparation des échantillons

La procédure appliquée consiste à extraire séquentiellement les protéines à partir des graines finement broyées à l'aide d'un mortier. La farine obtenue est récupérée dans des tubes eppendorf (l'équivalent de 10 mg de farine par tube).

3.1.2. Delipidation de la farine

10 mg de farine sont mélangés avec environ 300 µl de *n*-hexane. Après 30 min d'agitation à température ambiante, ce mélange est centrifugé, le *n*-hexane contenu dans le surnageant est évacué et décanté et le culot est séché.

3.1.3. Extraction des Albumines

Le résidu delipidé est mélangé avec 250 µl d'une solution d'eau distillée, pH 8, contenant 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ et 1 mM PMSF et agité pendant 30 min à 4°C avant d'être centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. L'opération est répétée deux fois à partir du culot obtenu après centrifugation. Le surnageant contenant les albumines est récupéré.

3.1.4. Préparation des extraits pour l'électrophorèse

Les Albumines extraites sont précipitées en y ajoutant de l'acétone froide. Après 1 heure de contact à -20°C, les protéines précipitées sont récupérées après centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min puis portées à 37°C pendant 15 min. Les culots protéiques sont mis en suspension dans 100 µl de tampon de charge Tris-HCl pH 6.8 contenant 2% SDS, 40% glycérol, 0.02% bleu de bromophénol. Enfin, les échantillons sont agités puis incubés à 65°C pendant 30 min. avant d'être séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

3.2. Electrophorèse monodimensionnelle en gel de polyacrylamide

Après l'étape d'extraction, la composition protéique en albumine est caractérisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide de 1.5 mm d'épaisseur en conditions dénaturantes (présence de SDS), avec un système vertical. L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de Laemmli (1970) modifiée par Singh et al, 1991. Le gel de séparation contient 12.56% de polyacrylamide et le gel d'alignement 2.88%. Les marqueurs de masse moléculaire utilisés couvrent une gamme variant de 10 KDa à 250 KDa. Les échantillons sont déposés à raison de 30 µl par puits. La migration est effectuée à 40 mA par gel dans un tampon Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1.4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS. Une fois la migration électrophorétique achevée, le gel est révélé au moyen d'une coloration au Bleu de Coomassie à 12% (p/v) de TCA et 5 % (v/v) de solution mère de Bleu de Coomassie R250 à 1 % dans l'éthanol pendant toute la nuit. Les gels sont colorés toute la nuit avec la solution de coloration. Ils sont enfin décolorés dans de l'eau de robinet.

3.3. Lecture des électrophoregrammes

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation. Afin de déterminer le poids moléculaire de chaque protéine, un marqueur de taille a été utilisé.

3.4. **Analyse statistique**

Le traitement des données d'électrophorèse a fait appel à des méthodes statistiques. Les fréquences des bandes protéiques sont calculées pour l'ensemble des accessions de toutes les espèces de légumineuses du genre *Medicago*. La distance génétique est calculée pour chaque espèce en fonction de la matrice des diagrammes types des accessions. Les dendrogrammes sont confectionnés en utilisant le logiciel Statistica-6.

RESULTATS ET DISCUSSION

II. Analyse de la diversité intra-et interspécifique des espèces du genre *Medicago*

5. Analyse des profils électrophorétiques

Pour le fractionnement des albumines, la technique d'électrophorèse utilisée est celle décrite par Laemmli, 1970 et modifiée par Singh et al, 1991. C'est une technique qui permet d'obtenir l'ensemble des protéines. La lecture des diagrammes nous permet de révéler la mobilité de chacune des bandes protéiques réparties dans le gel, en mesurant la distance parcourue par chaque protéine dans le gel de séparation.

5.1. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez *Medicago hispida*

Les diagrammes électrophorétiques des albumines des différentes accessions analysées renferment de 4 à 22 bandes protéiques avec des mobilités variant entre 0.46 et 16.39 cm (Figure 9). Nous avons dénombré 58 bandes protéiques de mobilités différentes.

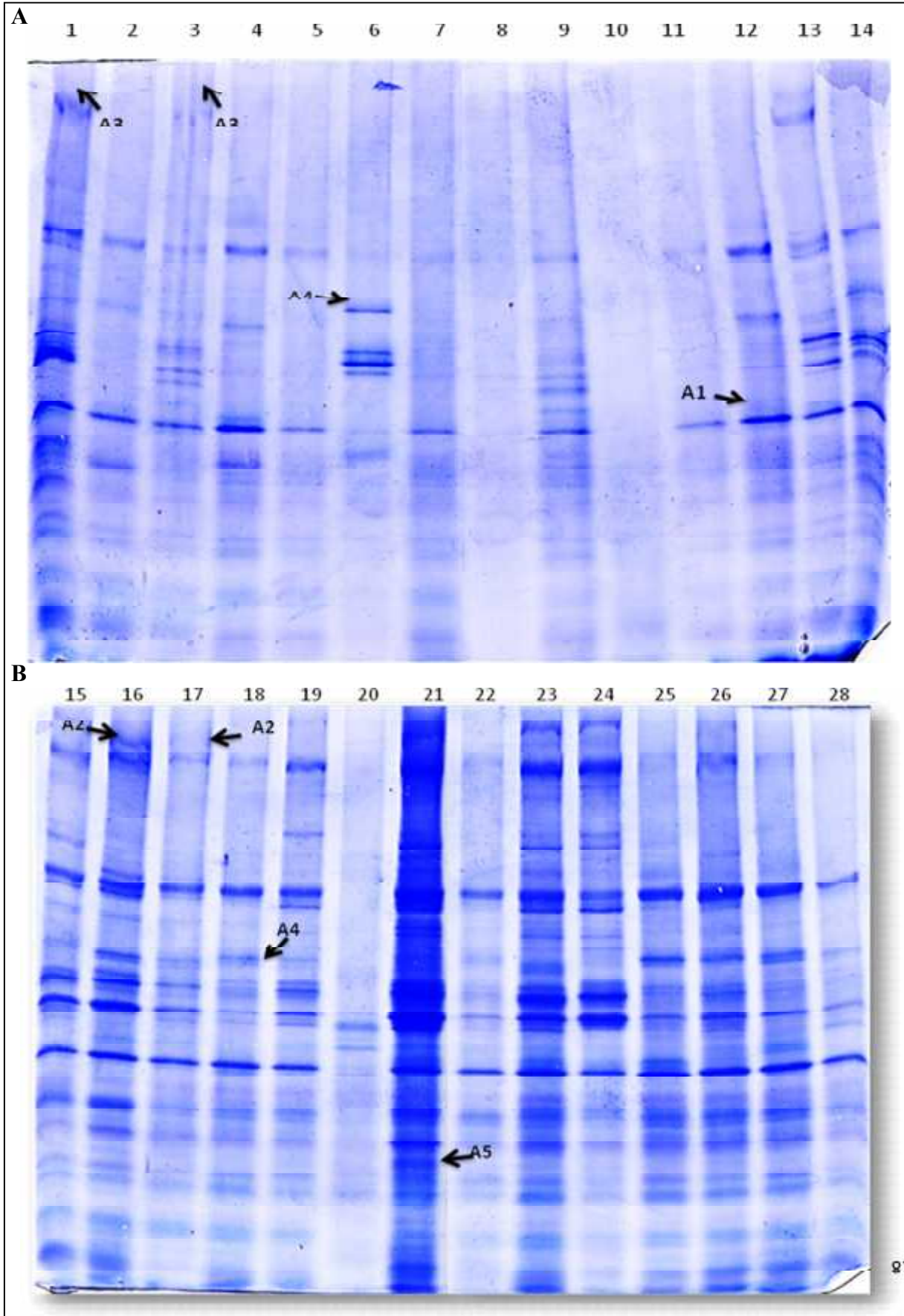
L'étude de ces profils électrophorétiques des différentes accessions de *Medicago hispida* révèle des variations dans la composition protéique. En effet les différences résident dans les bandes protéiques A1, A2, A3, A4, A5 qui sont les plus variables qualitativement (Figure 9).

La variation de ces dernières est représentée dans le tableau 3.

Tableau 3 : variation des bandes protéiques A1, A2, A3, A4 et A5.

	A1	A2	A3	A4	A5
MH1	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MH2	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)	P(+)
MH3	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MH4	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MH5	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MH6	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MH7	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH8	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
MH9	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH10	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
MH11	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH12	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH13	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH14	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH15	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)
MH16	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)	A(0)
MH17	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)	A(0)
MH18	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)
MH19	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MH20	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH21	P(+)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH22	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MH23	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH24	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MH25	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)

MH26	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MH27	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MH28	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)



**Figure 9: profils électrophorétiques des albumines de *M. hispida* révélées par SDS/PAGE.
A: 1-14 : accessions de *M. hispida*. B : 15-28 : accessions de *M. hispida*.**

D'abord, la comparaison entre les accessions montre que la bande A1 est présente uniquement chez l'accession MH21, la bande A2 présente chez deux accessions MH16 et MH17 et la bande A3 présente chez 5 accessions (MH 1, 2, 3, 4, 5), alors qu'elles sont absentes dans le reste des échantillons. En revanche, la bande A4 est présente aussi chez les accessions précédentes (MH 2, 16, 17) ainsi que les accessions MH (6, 18, 19, 22, 25, 26, 27, 28). Ensuite la comparaison entre les profils montre que la bande A5 est presque omniprésente (absente uniquement chez trois accessions).

Ainsi, ces fluctuations observées entre les accessions de l'espèce *Medicago hispida* sont probablement dues à des facteurs géographiques.

5.2. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez *Medicago polymorpha*

Les diagrammes électrophorétiques des accessions analysées renferment de 3 à 27 bandes décelables qui se répartissent dans tout le gel avec des mobilités allant de 0.75 à 16.35 cm. Nous avons identifié 53 bandes protéiques. L'analyse de la composition protéique en albumines des différentes accessions de *Medicago polymorpha* démontre des variations résidant dans les bandes B1, B2, B3, B4, B5 (Figure 10) qui sont les plus variables qualitativement. La variation de ces bandes protéiques est représentée dans le tableau 4.

Tableau 4 : variation des bandes protéiques B1, B2, B3, B4 et B5.

	B1	B2	B3	B4	B5
MP1	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)	P(+)
MP2	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)	A(0)
MP3	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP4	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP5	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP6	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP7	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP8	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP9	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP10	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP11	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP12	P(+)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP13	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP14	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)	P(+)
MP15	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP16	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MP17	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP18	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP19	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP20	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP21	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP22	A(0)	A(0)	A(0)	A(0)	P(+)
MP23	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)

MP24	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MP25	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MP26	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MP27	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)
MP28	A(0)	A(0)	P(+)	A(0)	P(+)

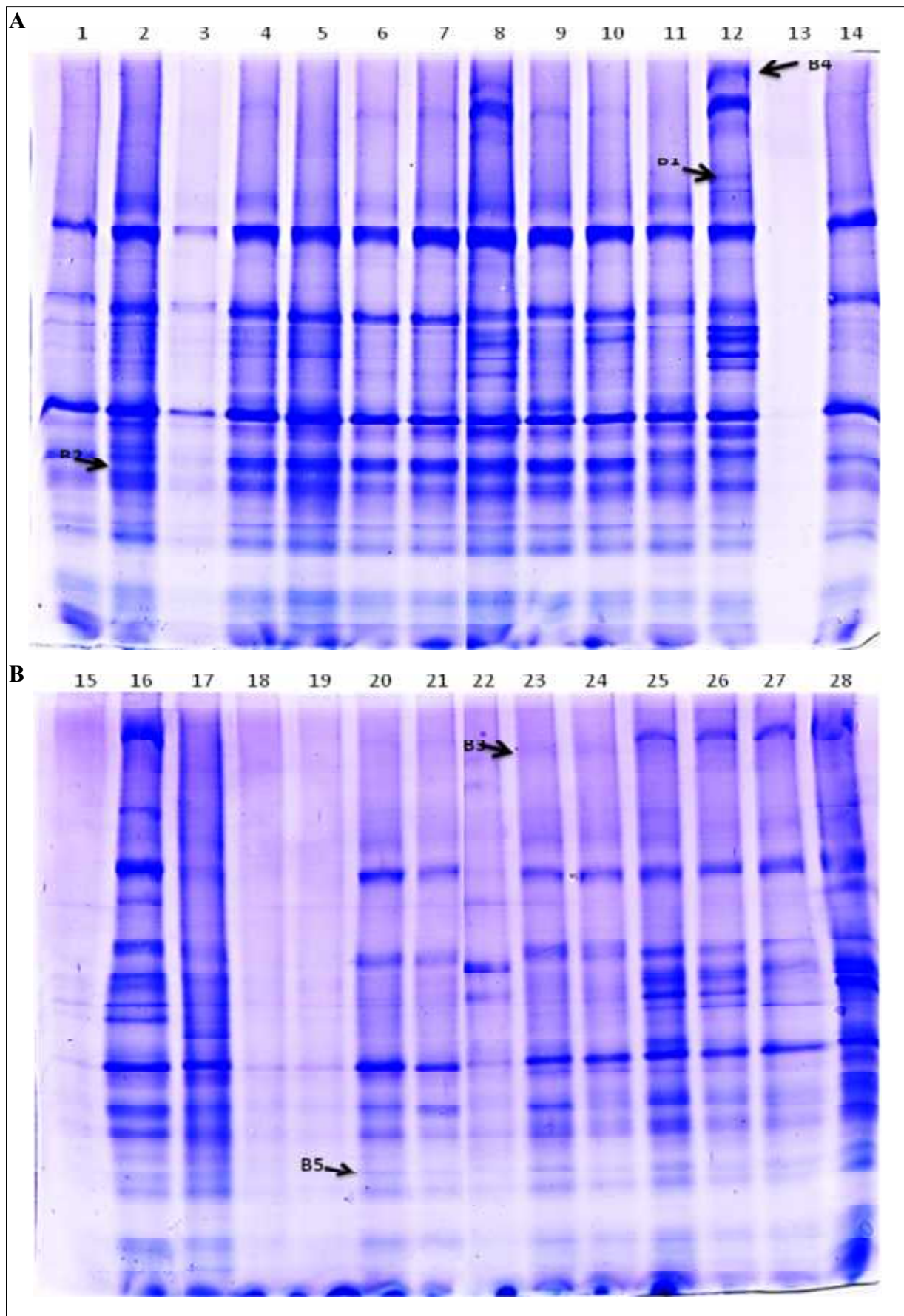


Figure 90: profils électrophorétiques des albumines de *M. polymorpha* révélées par SDS/PAGE.
 A: 1-14 : accessions de *M. polymorpha*. B : 15-28 : accessions de *M. polymorpha*

La comparaison entre les accessions montre que la bande B1 est absente dans toutes les accessions alors qu'elle est présente uniquement chez MP12. Par contre la bande B5 absente chez MP2 est présente dans le reste des accessions. Quant à la bande B2, bien qu'elle soit présente chez MP1 de même que chez MP2, elle est absente dans le reste des accessions. En effet la bande B3 est présente chez 7 accessions, d'autre part la bande B4 est présente chez 12 accessions.

Ainsi, ces différences observées entre les accessions de l'espèce *Medicago polymorpha* sont probablement dues à des facteurs géographiques et écologiques

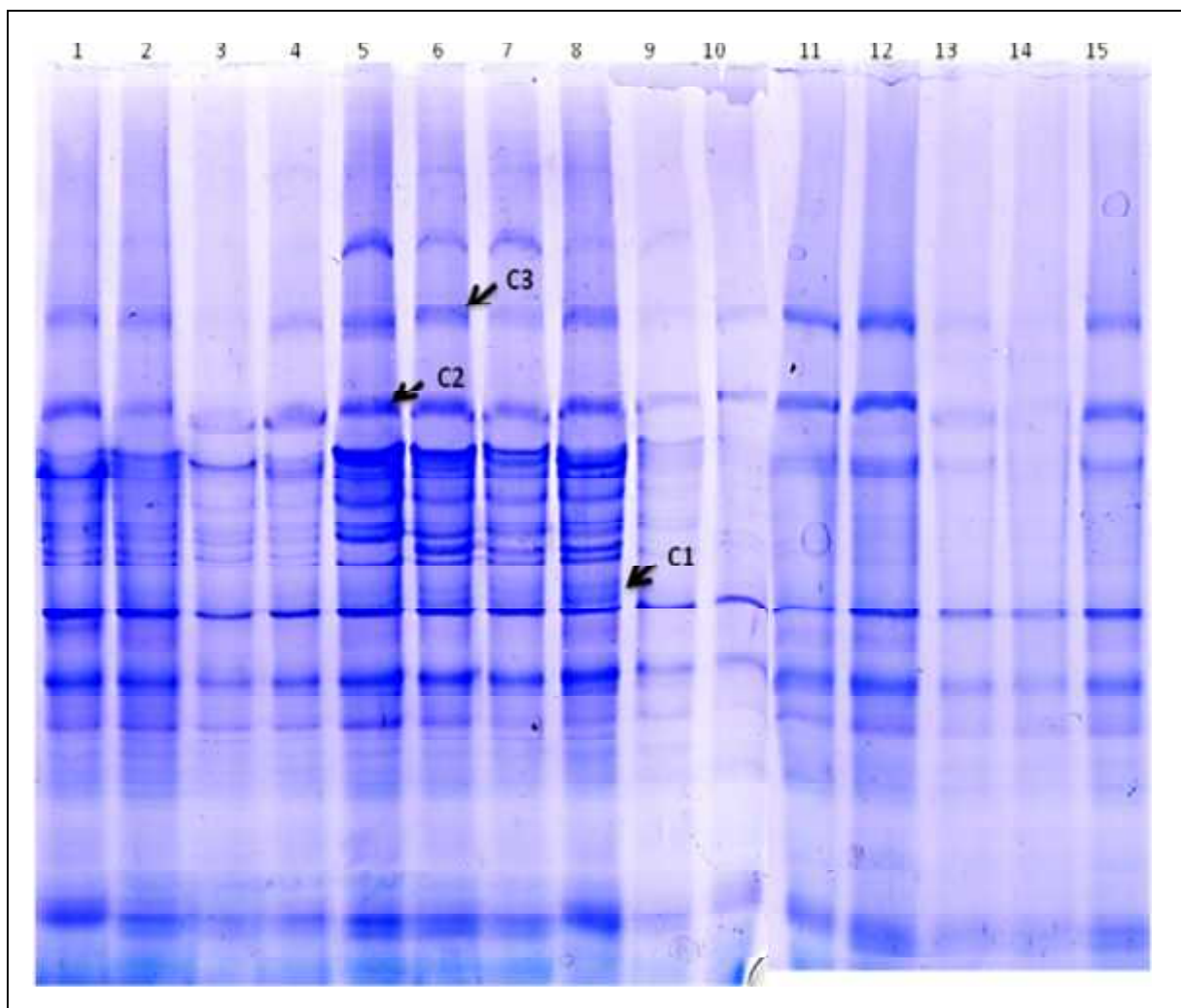
5.3. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez *Medicago minima*

Les diagrammes électrophorétiques des accessions analysées renferment de 11 à 27 bandes protéiques avec des mobilités variant entre 4.2 à 16.43 cm. Nous avons dénombré 56 bandes protéiques de mobilité différentes.

L'observation des profils électrophorétiques des albumines des accessions de *Medicago minima* révèle des variations dans la composition protéique. En effet, les différences résident dans les bandes C1, C2, C3 (Figure 11) représentant les bandes les plus variables qualitativement. La variation de ces bandes protéiques est représentée dans le tableau 5.

Tableau 5 : variation des bandes protéiques C1, C2 et C3.

	C1	C2	C3
Mmin1	A(0)	P(+)	P(+)
Mmin2	A(0)	A(0)	P(+)
Mmin3	A(0)	A(0)	P(+)
Mmin4	A(0)	P(+)	P(+)
Mmin5	A(0)	P(+)	P(+)
Mmin6	A(0)	P(+)	P(+)
Mmin7	A(0)	P(+)	P(+)
Mmin8	P(+)	P(+)	P(+)
Mmin9	A(0)	P(+)	P(+)
Mmin10	A(0)	P(+)	P(+)
Mmin11	A(0)	A(0)	P(+)
Mmin12	A(0)	A(0)	P(+)
Mmin13	A(0)	A(0)	P(+)
Mmin14	A(0)	A(0)	P(+)
Mmin15	A(0)	A(0)	P(+)



**Figure 101: profils électrophorétiques des albumines de *M. minima* révélées par SDS/PAGE.
1-15 : accessions de *M. minima*.**

D'abord la comparaison entre les accessions montre que la bande C1 est présente chez une seule accession Mmin8, cependant on notera son absence dans le reste des accessions. En revanche la bande C2 est absente chez les accessions Mmin2, 3, 11, 12, 13, 14, 15 mais elle est présente dans le reste des accessions. Quant à la bande C3, elle est omniprésente. Ainsi, ces différences observées entre les profils électrophorétiques des accessions sont probablement dues à des facteurs tels que les facteurs géographiques et écologiques.

5.4. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez *Medicago littoralis*

Les diagrammes électrophorétiques des accessions analysées renferment de 24 à 26 bandes protéiques décelables avec des mobilités variant entre 0.42 et 16.17 cm. Nous avons dénombré 31 bandes protéiques de mobilités différentes (Figure 12).

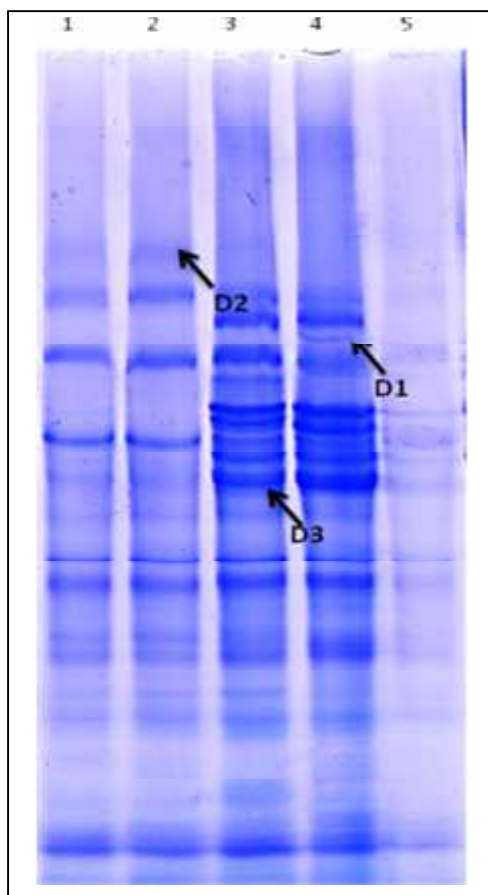


Figure 112: profils électrophorétiques des albumines de *M. littoralis* révélées par SDS/PAGE.
1-5 : accessions de *M. littoralis*.

L'évaluation des profils électrophorétiques des albumines de *Medicago littoralis* fait apparaître des fluctuations dans les bandes D1, D2, D3 (Figure 12) qui sont les plus variables qualitativement. La variation de ces dernières est représentée dans le tableau 6.

Tableau 6: variation des bandes protéiques D1, D2 et D3.

	D1	D2	D3
Mlit1	A(0)	P(+)	p(+)
Mlit2	A(0)	P(+)	p(+)
Mlit3	A(0)	A(0)	p(+)
Mlit4	P(+)	A(0)	p(+)
Mlit5	A(0)	A(0)	p(+)

La comparaison entre les accessions de *Medicago littoralis* montre que la bande D1 et D2 sont présentes uniquement chez une accession (Mlit4) et deux accessions (Mlit1, Mlit2), respectivement, alors qu'elles sont absente dans le reste des accessions. En revanche, la bande D3 est omniprésente. Ainsi, ces différences observées entre les accessions de la même espèce sont probablement dues à des facteurs tels que les facteurs géographiques et écologiques.

5.5. Analyse des albumines fractionnées par SDS-PAGE chez *Medicago italica*

Les diagrammes électrophorétiques des accessions analysées renferment de 23 à 26 bandes avec des mobilités allant de 0.95 à 15.7 cm. Nous avons identifiés 30 bandes protéiques.

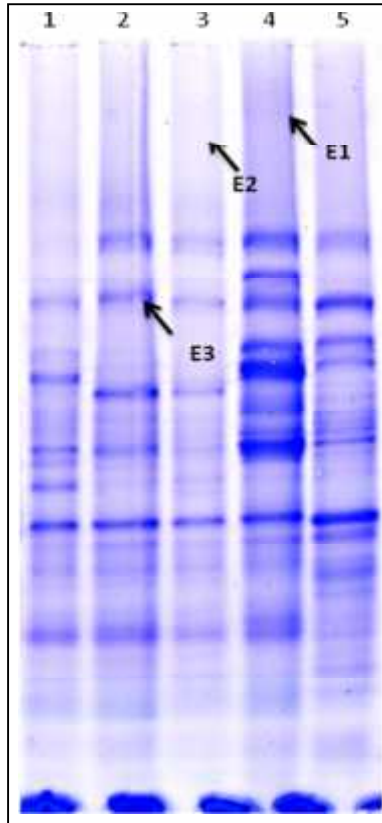


Figure 123: profils électrophorétiques des albumines de *M. littoralis* révélées par SDS/PAGE.
1-5 : accessions de *M. littoralis*.

La comparaison des profils électrophorétiques des accessions de l'espèce *Medicago italica* révèle des variations dans la composition protéique ou les différences résident dans les bandes E1, E2 et E3 (Figure 13) représentant les bandes les plus variables qualitativement. La variation de ces bandes protéiques est représentée dans le tableau 7.

Tableau 7: variation des bandes protéiques E1, E2 et E3.

	E1	E2	E3
Mit1	A(0)	P(+)	P(+)
Mit2	A(0)	A(0)	P(+)
Mit3	A(0)	P(+)	P(+)
Mit4	P(+)	A(0)	P(+)
Mit5	A(0)	P(+)	P(+)

La comparaison entre les accessions montre que la bande E1 est absente dans toutes les accessions alors qu'elle présente uniquement chez Mit4. Par contre la bande E2 absente chez Mit4 est présente chez trois accessions (Mit1, Mit3, Mit5). Quant à la bande E3, elle est présente chez toutes les accessions

Ainsi, ces différences observées entre les accessions de l'espèce *Medicago italica* sont probablement dues à des facteurs géographiques et écologiques.

6. Etude de la variabilité des albumines du genre *Medicago*

Le genre *Medicago* renferme plusieurs espèces donnant naissance à des groupes d'accessions botaniques aux caractéristiques phénologiques, morphologiques et physiologiques particulières. A travers cette étude, nous avons estimé la variabilité génétique des albumines dans une collection de 81 accessions de légumineuses appartenant à 5 espèces du genre *Medicago* collectés au Nord Algérien.

6.1. Etude de la variabilité des albumines chez *Medicago hispida*

Dans ce groupe de 28 accessions de *M. hispida*, 58 bandes protéiques sont détectées (Tableau 8).

Tableau 8 : variabilité des albumines chez *M. hispida*

Bandes	Mobilités (cm)	Accessions	Fréquences %
1	0,46	Mh(15,19,21,23,24,26)	21
2	0,64	Mh(1,2,3,4,5)	18
3	0,86	Mh(13,14)	7
4	0,96	Mh(16,17)	7
5	1,48	Mh(1,3,13)	4
6	1,58	Mh(15,16,17,18,22,26,27)	25
7	1,77	Mh(19,21,23,24)	14
8	2,39	Mh(15,23,24)	11
9	2,66	Mh(21,23)	7
10	3,54	Mh(1)	4
11	3,66	Mh(15,19,23,24)	14
12	4,31	Mh(15,21,23,24)	14
13	4,04	Mh(16,21)	7
14	4,31	Mh(1,4)	7
15	4,45	Mh(1,14,16,21,23,24,25,26,27)	32
16	4,81	Mh(1,2,13)	11
17	5,14	Mh(15,16,17,28)	14
18	5,36	Mh(3,6,7,8,9,11,12,13,18,19,21,22,23,24,25,26,27,28)	64
19	5,5	Mh(15,16,17)	11
20	5,9	Mh(15,19,21,23,24,26)	21
21	6,08	Mh(1,13,16,17,18,21,23,24)	29
22	6,27	Mh(19,21,23,24,26)	18
23	6,56	Mh(14)	4

24	6,95	Mh(15,23,24)	11
25	7,01	Mh(1,14)	7
26	7,06	Mh(2,6,16,17,18,19,22,25,26,27,28)	39
27	7,24	Mh(3,12,13)	11
28	7,43	Mh(1,4,9)	11
29	7,62	Mh(1,13,14,15,20)	18
30	7,78	Mh(1,12,13,14,15,16,20)	25
31	8,04	Mh(16,17,18,19,21,25)	21
32	8,22	Mh(1,3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14)	43
33	8,48	Mh(1,6,9,14,18,19,21,22,23,24,26)	39
34	8,66	Mh(6,12,13)	11
35	8,74	Mh(2,3,6,9,15,16,17,18,28)	32
36	8,93	Mh(3,8,12,14,19,20,21,22,23,24,25,26,27)	46
37	9,24	Mh(18,19,20,21,23,24,26)	25
38	9,82	Mh(12)	4
39	10,28	Mh(15,16,17,28)	14
40	10,37	Mh(1,2,3,4,5,7,9,11,12,13,14)	39
41	10,58	Mh(18,19,20,21,22,23,24,25,26,27)	36
42	11,2	Mh(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14)	46
43	11,38	Mh(1,6,9,15,16,20,23,24,25,26,27)	39
44	11,6	Mh(1,2,4,9,13,14,17,18,19,21,23,24,27)	46
45	10,89	Mh(4,5,6,7,8,9,10)	25
46	12,54	Mh(15,16,17)	11
47	13,28	Mh(1,2,3,4,5,6,7,9,11,12,13,14,19,20,21,22,23,24,25,26,27)	75
48	13,55	Mh(15,16,21,28)	14
49	13,7	Mh(1,2,3,4,5,6,7,9,11,12,13,14,17,18,19,20,21,22,27)	68
50	13,81	Mh(15,16,17,28)	14
51	14,04	Mh(1,2,3,4,5,6,7,12,13,14,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	75
52	14,97	Mh(15,16,17)	11
53	15,16	Mh(4,7,9,18,19,22,23,24,25,26,27,28)	43
54	15,32	Mh(1,2,3,4,5,7,11,12,13,14)	36
55	15,48	Mh(4,5,7)	11
56	15,99	Mh(1,2,10,13,14)	18
57	16,28	Mh(3,4,5,7,9)	18
58	16,39	Mh(15,16,21,23,24,25,26,27,28)	32

D'après le tableau ci dessus, on constate une grande variabilité des albumines. L'observation de ces dernières dans l'ordre décroissant des fréquences, démontre, que la bande protéique 47 dont la mobilité est de 13.28 cm, est la plus fréquente avec un taux de 75 %, ce qui implique sa dominance. Elle est présente chez 21 accessions. Suivie de la bande protéique 49, dont la mobilité est de 13.7 cm présente chez 19 accessions, avec un taux de 68 %. Puis, on retrouve les bande protéique 36, 42 et 44 dont les mobilités sont de 8.93 cm, 11.2 cm et 11.6 cm respectivement présentes chez 13 accessions chacune. Elles sont moins fréquentes que les précédentes, avec un pourcentage moyen de 46 %. Enfin, on retrouve les bandes protéiques 5, 10, 23 et 38 dont les mobilités sont respectivement 1.48, 3.54, 6.56, 9.82 cm avec une fréquence minimale de 4 %, présente chacune dans une seule accession.

6.2. Etude de la variabilité des albumines chez *Medicago polymorpha*

Les différentes albumines observées dans ce groupe de 28 accessions de *M. polymorpha* sont au nombre de 58 avec des mobilités différentes (Tableau 9).

Tableau 9 : variabilité des albumines chez *M. polymorpha*

Bandes	Mobilités (cm)	Accessions	Fréquences%
1	0,75	MP(1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14)	43
2	0,57	MP(15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	50
3	1,18	MP(8,14)	7
4	1,29	MP(2,4,6,8,9,10,11,12,14,15,16,17,20,21,25,26,27,28)	64
5	1,69	MP(16,23,24,25,26,27,28)	25
6	1,98	MP(16,17,18,20,21,22,26,27,28)	32
7	2,35	MP(2,8,12)	11
8	2,56	MP(16,17,18,19,20,21)	21
9	2,75	MP(16,17,22,23,24,28)	21
10	3,65	MP(12)	4
11	3,98	MP(12,14)	7
12	4,52	MP(2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	79
13	4,96	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,14,16,17,21,28)	57
14	5,14	MP(16,17,21,28)	14
15	5,72	MP(20,23,24,25,26,27)	21
16	5,97	MP(1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14)	43
17	6,05	MP(15,16,17,18,19,20,21,22,23,27,28)	39
18	6,74	MP(2,3,4,5,6,8,9,10,11,12,)	36
19	6,81	MP(1,2,3,11,12,14,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	68
20	7,17	MP(15,16,17,27,28)	18
21	7,53	MP(4,5,6,7,8,9,10,11,12,18,19,20,21,23,24,25,26)	61
22	7,72	MP(1,2,14,15,16,22,27,28)	29
23	8,01	MP(4,5,6,7,8,9,10,11,12,16,17,25,26,27,28)	54
24	8,24	MP(15,16,17,19,20,21)	21
25	8,3	MP(2,3,4,5,6,8,9,10,12,14)	36
26	8,55	MP(1,2,3,4,5,12,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27)	71
27	8,84	MP(6,7,8,9,10,15,16,19,23,25,26,27,28)	46
28	9,14	MP(1,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12)	39
29	9,37	MP(2,4,5,11,17,20,21,23,25)	35
30	9,57	MP(6,7,8,9)	18
31	9,89	MP(16,17,26,28)	14
32	10,11	MP(1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12)	39
33	10,44	MP(2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	93
34	10,75	MP(16,17,20,21,22,23,24,25,26)	32
35	10,84	MP(1,2)	7
36	11,13	MP(4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,28)	39
37	11,26	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,16,17,25,28)	46
38	11,51	MP(3,4,5,7)	14
39	11,81	MP(20,21,23,24)	14
40	12,07	MP(1,2)	7
41	12,32	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14)	46
42	12,58	MP(4,5,6,7,8,9,10,11,12,16,17,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	71
43	13,05	MP(1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12)	39
44	13,06	MP(15,16,17,18,20,22,23,25,26,27)	36

45	13,51	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	96
46	13,71	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14)	46
47	14,08	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26)	82
48	14,86	MP(18,28)	7
49	15,31	MP(1,2,4,5,6,7,8,9,11,14)	36
50	15,34	MP(16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	46
51	15,66	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14)	46
52	15,92	MP(2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28)	89
53	16,35	MP(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,14)	43

D'après le tableau ci-dessus, on note une variabilité importante des albumines de *M. polymorpha*. L'observation de ces dernières dans l'ordre décroissant des fréquences, montre, que la bande protéique 45 dont la mobilité est de 13.51 cm est la plus fréquente avec un pourcentage maximum de 96 %, ce qui implique sa dominance. Elle est présente chez 27 accessions. Suivie de la bande protéique 33, dont la mobilité est de 10.44 cm, qui se trouve chez 26 accessions avec un pourcentage de 93 %. Ensuite vient un groupe de bandes de mobilités différentes avec une fréquence similaire moyenne de 46% retrouvées chez 13 accessions. Ce sont les bandes : 27, 37, 41, 46, 50 et 51 dont les mobilités sont : 8.84, 11.26, 12.32, 13.71, 15.34 et 15.66 cm, respectivement. Puis, on retrouve les bandes protéiques 8 et 24 de mobilité respectives 2.56 et 8.24 cm, qui sont moins fréquentes que les précédentes avec un taux de 21% répertoriées chez 6 accessions. Enfin, la plus faible fréquence se situe au niveau de la bande protéique 10 de mobilité 3.65 cm avec une fréquence de 4%, présente chez une seule accession (Tableau 9).

6.3. Etude de la variabilité des albumines chez *Medicago minima*

La détermination de la variabilité des albumines des 15 accessions de *M. minima*, révèle la présence de 56 protéines de mobilités différentes (Tableau 10).

Tableau 10 : variabilité des albumines chez *M.minima*

Bandes	Mobilité (cm)	Accessions	Fréquences%
1	0,79	Mmin(5,6,7,8)	27
2	1,91	Mmin(4,5,6,7,8)	33
3	3,4	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	67
4	4,2	Mmin(11,12,15)	20
5	4,23	Mmin(4,5,6,7,8)	33
6	4,7	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15)	100
7	5,36	Mmin(11,12,13,14,15)	33
8	5,36	Mmin(6)	7
9	5,76	Mmin(11,12)	13
10	5,9	Mmin(5,6,7,8)	27

11	6,34	Mmin(11,12)	13
12	6,41	Mmin(1,2,5,6,7,8,9,10)	53
13	6,41	Mmin(13,14,15)	20
14	6,63	Mmin(3,4)	13
15	6,63	Mmin(12,15)	13
16	6,88	Mmin(1,2,5,6,7,8,9)	47
17	7,14	Mmin(2,3,4,5,6,7,9)	47
18	7,32	Mmin(4,5,6)	20
19	7,43	Mmin(1,2,9,10,11,12,13,14,15)	60
20	7,5	Mmin(3,4,12,15)	27
21	7,72	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9)	60
22	8,01	Mmin(11,12,13,14,15)	33
23	8,3	Mmin(8,11,12,13,14,15)	40
24	8,48	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,10,12,13,14,15)	87
25	8,84	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9)	60
26	8,91	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9)	60
27	9,06	Mmin(1,2,3,4,11,12,13,14,15)	60
28	9,24	Mmin(8)	7
29	9,53	Mmin(2,4,5,6,7)	33
30	9,71	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8)	53
31	9,97	Mmin(11,12,13,14,15)	33
32	10,4	Mmin(11,12,13,14,15)	33
33	10,84	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	67
34	11,2	Mmin(11,12,13,14,15)	33
35	11,56	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9)	60
36	11,64	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	67
37	11,93	Mmin(12,13,14,15)	27
38	12,22	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8)	53
39	12,47	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15)	100
40	12,83	Mmin(11)	7
41	13,12	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10)	67
42	13,27	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,11,12,13,14,15)	87
43	13,41	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,11,12,13,14,15)	87
44	13,89	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8)	53
45	14,5	Mmin(11,12,13,14,15)	33
46	14,87	Mmin(1,2,4,5,6,7,8,10)	53
47	15,05	Mmin(11,12)	13
48	15,16	Mmin(1,8)	13
49	15,37	Mmin(15)	7
50	15,48	Mmin(11,15)	13
51	15,66	Mmin(1,2,3,4,5,6,7,8,9)	60
52	15,92	Mmin(1)	7
53	15,88	Mmin(11,15)	13
54	15,99	Mmin(11)	7
55	16,17	Mmin(12,13,14,15)	27
56	16,43	Mmin(12,13,14,15)	27

D'après le tableau ci dessus, on distingue un grand polymorphisme des albumines. Les bandes protéiques 6 et 38 dont les mobilités sont respectivement 4.7 cm et 12.22 cm, sont les plus fréquentes avec un pourcentage maximum de 100 %, ce qui implique leur dominance. Suivies des bandes 24, 42 et 43 de mobilités 8.48, 13.27 et 13.41 cm présentes chez 13 accessions avec une fréquence de 87%. La bande protéique 23, dont la mobilité est de 8.3 cm, est moins fréquente que les précédentes, avec un pourcentage moyen de 40 %. Enfin, on retrouve les bandes protéiques 8, 28, 40, 49, 52 et 54 de mobilités 5.36, 9.24, 12.83, 15.37, 15.92 et 15.99 cm respectivement, présente chacune dans une seule accession et qui sont très faiblement fréquentes avec un pourcentage minime de 7 % (Tableau 10).

6.4. Etude de la variabilité des albumines chez *Medicago littoralis*

Les différentes albumines observées dans ce groupe de 5 accessions de *M. littoralis* sont au nombre de 31 avec des mobilités différentes (Tableau 11).

Tableau 11 : variabilité des albumines chez *M. littoralis*

bandes	Mobilités (cm)	Accessions	Fréquences%
1	4,2	Mlit(1,2)	40
2	4,92	Mlit(1,2,3,4,5)	100
3	5,36	Mlit(1,3,4,5)	80
4	5,76	Mlit(4)	20
5	5,94	Mlit(5)	20
6	6,34	Mlit(3,4,5)	60
7	6,63	Mlit(2)	20
8	6,88	Mlit(1,2,3,4,5)	100
9	7,21	Mlit(4,5)	40
10	7,5	Mlit(1,2,3,4,5)	100
11	7,9	Mlit(1,2,3,4,5)	100
12	8,3	Mlit(1)	20
13	8,48	Mlit(1,2,3,4,5)	100
14	8,84	Mlit(1,2,3,4,5)	100
15	9,5	Mlit(1,2,3,4,5)	100
16	10,4	Mlit(1,2,3,4,5)	100
17	10,84	Mlit(1,2,3,4,5)	100
18	11,64	Mlit(1,2,3,4,5)	100
19	11,93	Mlit(1,2,3,4,5)	100
20	12,22	Mlit(1,2,3,4,5)	100
21	12,83	Mlit(1,2,3,4,5)	100
22	13,12	Mlit(1,2,3,4,5)	100
23	13,67	Mlit(1,2,3,4,5)	100
24	13,89	Mlit(1,2,3,4,5)	100

25	14,5	Mlit(1,4,5)	60
26	14,87	Mlit(2,4)	40
27	15,05	Mlit(3)	20
28	15,37	Mlit(1,2,3,4)	80
29	15,92	Mlit(1,2,3,4,5)	100
30	15,99	Mlit(1,2,3,4,5)	100
31	16,17	Mlit(1,2,3,4,5)	100

D'après le tableau ci dessus, on constate des fluctuations des albumines. Les bandes protéiques 2, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 29, 30 et 31 de mobilité respectives 4,92, 6.88, 7.5, 7.9, 8.48, 8.84, 9.5, 10.4, 10.84, 11.64, 11.93, 12.22, 12.83, 13.12, 13.67, 13.89, 15.92, 15.99 et 16.17 cm présentent une fréquence de 100%. Elles sont omniprésentes. Suivies des deux bandes 3 et 28 dont la mobilité est de 5.36 et 15.37cm, avec un taux de 80 %, présentes chez 4 accessions. Viennent après les bandes 6 de mobilité 6.34 cm et 25 de mobilité 14.5 présentant une fréquence de 60% et les bandes 1, 9 et 26 de mobilités respectives de 4.2, 7.21 et 14.87 cm qui se trouvent moins fréquentes que les précédentes avec un taux de 40 %. Enfin, la plus faible fréquence se situe au niveau des bandes protéiques 4, 5, 7, 12 et 27 de mobilité 5.76, 5.94, 6.63, 8.3 et 15.05 cm retrouvées chez une accession avec une fréquence de 20%.

6.5. Etude de la variabilité des albumines chez *Medicago italica*

La mesure de la variabilité des albumines des 5 accessions de *M. italica*, indique la présence de 30 protéines de mobilités différentes (Tableau 12).

Tableau 12 : variabilité des albumines chez *M. italica*

Bandes	Mobilité (cm)	Accessions	Fréquences %
1	0,96	Mit(4)	20
2	1,51	Mit(4)	20
3	3,65	Mit(1,2,3,4,5)	100
4	4,38	Mit(1,2,3,4,5)	100
5	5,25	Mit(1,2,3,4,5)	100
6	5,79	Mit(1,2,3,4,5)	100
7	6,3	Mit(1,2,3,4,5)	100
8	6,81	Mit(1,2,3,4,5)	100
9	7,17	Mit(2,3,4,5)	80
10	7,42	Mit(1,3,5)	60
11	7,71	Mit(1,2,3,4,5)	100
12	8,19	Mit(4,5)	40
13	8,37	Mit(1,2,3)	60
14	8,73	Mit(1,2,3,4,5)	100

15	8,98	Mit(1,2,3,4,5)	100
16	9,27	Mit(1,2,4)	60
17	9,53	Mit(3,4,5)	60
18	9,82	Mit(1,2)	40
19	10,74	Mit(1,2,3,4,5)	100
20	11,05	Mit(1,2,3,4,5)	100
21	11,81	Mit(1,2,3,4,5)	100
22	12,18	Mit(5)	20
23	12,54	Mit(1,2,3,4,5)	100
24	13,01	Mit(1,2,3,4,5)	100
25	13,56	Mit(1,2,3,4,5)	100
26	13,99	Mit(1,2,3,4,5)	100
27	14,13	Mit(1,2,3,4,5)	100
28	14,61	Mit(1,2,3,4,5)	100
29	15,37	Mit(1,2,4,5)	80
30	15,7	Mit(1,2,3,4,5)	100

L'observation du tableau ci dessus, révèle un polymorphisme des albumines. Les bandes 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 15, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28 et 30 sont les plus fréquentes de mobilités différentes présentes dans l'ensemble des accessions avec une fréquence de 100%. Viennent ensuite les bandes 9 et 29 de mobilité 7.17 et 15.37 cm avec une fréquence de 80% retrouvées chez 4 accessions. Enfin, on retrouve les bandes protéiques 1, 2 et 22 présentes chez une accession dont les mobilités sont de 0.96, 1.51 et 12.18 cm qui sont très faiblement fréquentes avec un pourcentage minime de 20% (Tableau 12).

7. Classification hiérarchique des albumines du genre *Medicago*

Le dendrogramme ou représentation sous forme d'arbre hiérarchique est réalisée à partir des comparaisons de la composition protéique des différentes accessions.

Les regroupements effectués à chaque pas de l'algorithme de classification hiérarchique rassemble des éléments qui sont plus ou moins proche entre eux, plus nous avançons dans le regroupement plus nous rapprochons du sommet de l'arbre. Cette représentation matérialise bien le fait que les classes formées au cours du processus de classification constituent une hiérarchie indiquée de classe partiellement emboîtées les unes dans les autres.

7.1. Dendrogramme des albumines des espèces du genre *Medicago*

Les similarités intra spécifiques qui existent entre les espèces du genre *Medicago* sont présentées dans le dendrogramme ci dessous. L'analyse en cluster (Figure 14) révèle deux groupes à la distance 8, le premier montre que l'espèce *Medicago hispida* constitue un groupe

à part et elle est différente des autres espèces d'un point de vue génétique et morphologique. Le second est divisé à son tour en deux sous groupes : le premier est composé d'une seule espèce *Medicago polymorpha* tandis que le second contient les trois espèces *Medicago minima*, *M. littoralis* et *M. italica*. Ces deux dernières étant très liées morphologiquement (Figure 14).

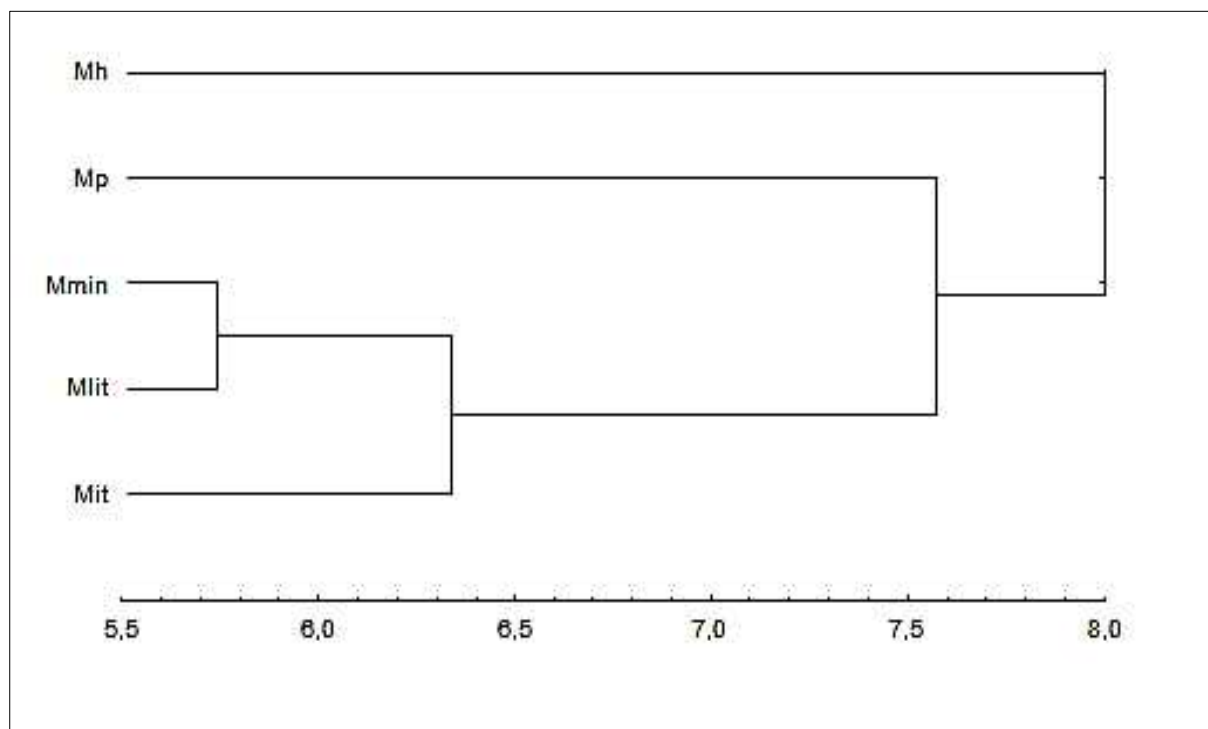


Figure 14 : Dendrogramme des albumines des espèces du genre *Medicago*

3.2. Dendrogramme des albumines de l'espèce *Medicago hispida*

Le dendrogramme (Figure 15) obtenu à partir des distances génétiques révèle de nombreux groupes. Le premier groupe est composé de trois accessions seulement (Mh15, 16, 17) qui sont différentes des autres accessions. Au niveau de la distance 4.4, toutes les accessions sont divisées en deux groupes, le premier est divisé à son tour en deux sous groupes : le premier contient trois accessions (Mh21, 22, 23) avec des niveaux élevés de similarité, tandis que le second est divisé en deux sous groupes: le premier comprend une seule accession (Mh28), tandis que le deuxième est divisé à son tour en deux sous groupes, l'un comprend une seule accession (Mh20) et l'autre contient six accessions de *M. hispida*. Le deuxième groupe est divisé également en deux sous groupes : le premier contient trois accessions (Mh1, 14, 13),

tandis que le second est divisé aussi en deux sous groupes: l'un comprend une seule accession (Mh2) et l'autre contient le reste des accessions de *M. hispida*.

La valeur moyenne des distances est de 3.0 (figure 15); à cette distance, le dendrogramme révèle un degré élevé de similitude de la diversité génétique des albumines de presque toutes les accessions

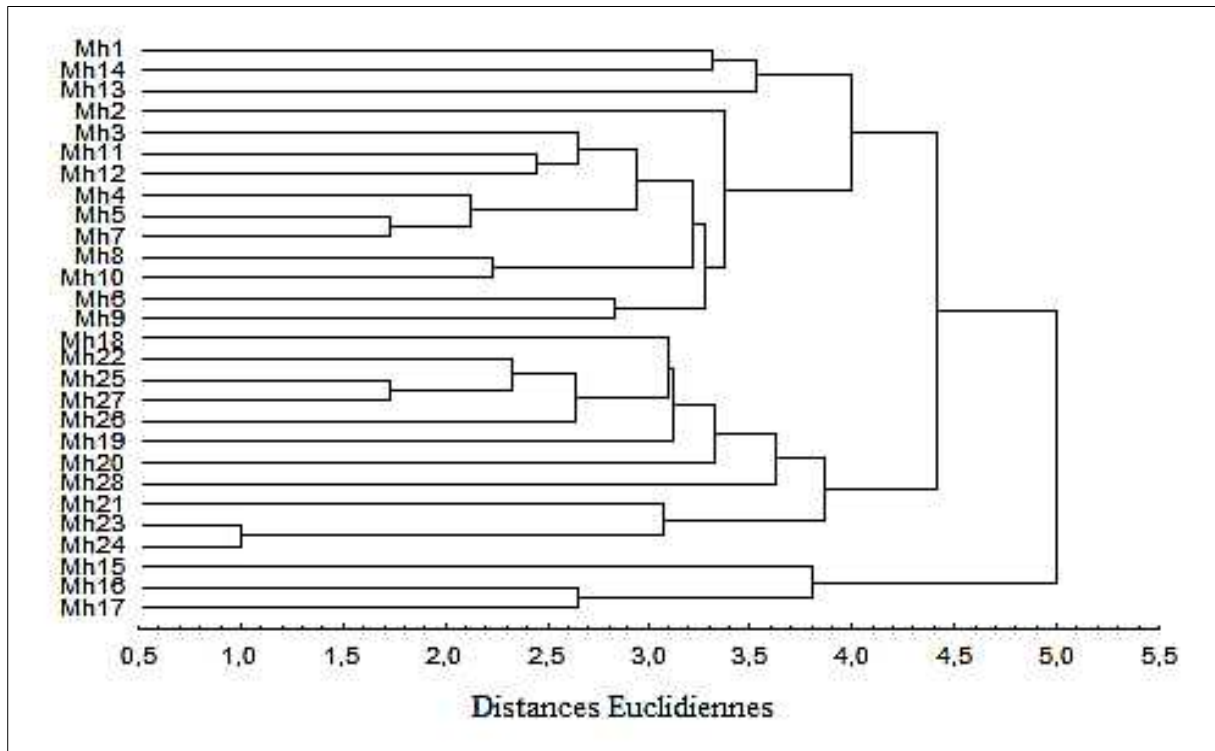


Figure 15 : Dendrogramme des albumines de *Medicago hispida*.

Le tableau 2 (origines géographiques des accessions) et les résultats des analyses en cluster (Figure 15) montre qu'il n'existe aucune relation entre la variation en albumines et la distribution géographique des accessions analysées. Par exemple, les deux accessions Mh1 et M14 du même groupe à la distance 3.3 n'ont pas la même origine géographique et sont issues de climats géographiques complètement différents: l'une est distribuée à Beni Hemiden-Constantine (Mh1), l'autre est issue de Mostaganem (Mh14). Un autre exemple qui concerne les deux accessions: Mh4 et Mh6 qui sont très distantes de point de vue génétique (composition en albumines) mais qui sont collectées des mêmes sites (Ain Defla).

3.3. Dendrogramme des albumines de l'espèce *Medicago polymorpha*

La figure 16 nous montre deux principaux groupes, le premier groupe (Mp1) est constitué d'une seule accession qui présente un profil protéique qui lui est propre et différent des autres qui fait qu'elle est génétique et éloigné alors que le second groupe est très polymorphe est renferme le reste des accessions avec des degrés de similarité très élevés.

La distribution géographique des accessions et les résultats des analyses en cluster ne sont pas corrélées, c'est-à-dire que certaines accessions sont regroupées malgré les différences entre elles et vis versa. Les accessions Mp2 et Mp14 forment un clade et appartiennent au même groupe malgré qu'elles soient collectées de sites différents. Il s'agit de l'accession Mp2 qui est de Bab Tronche-Mila et l'autre accession Mp14 qui est de Chlef. Un autre exemple concerne les accessions Mp4, Mp 5 et Mp 6 qui ont la même origine géographique (Constantine) et ne sont pas dans le même groupe (Figure 16).

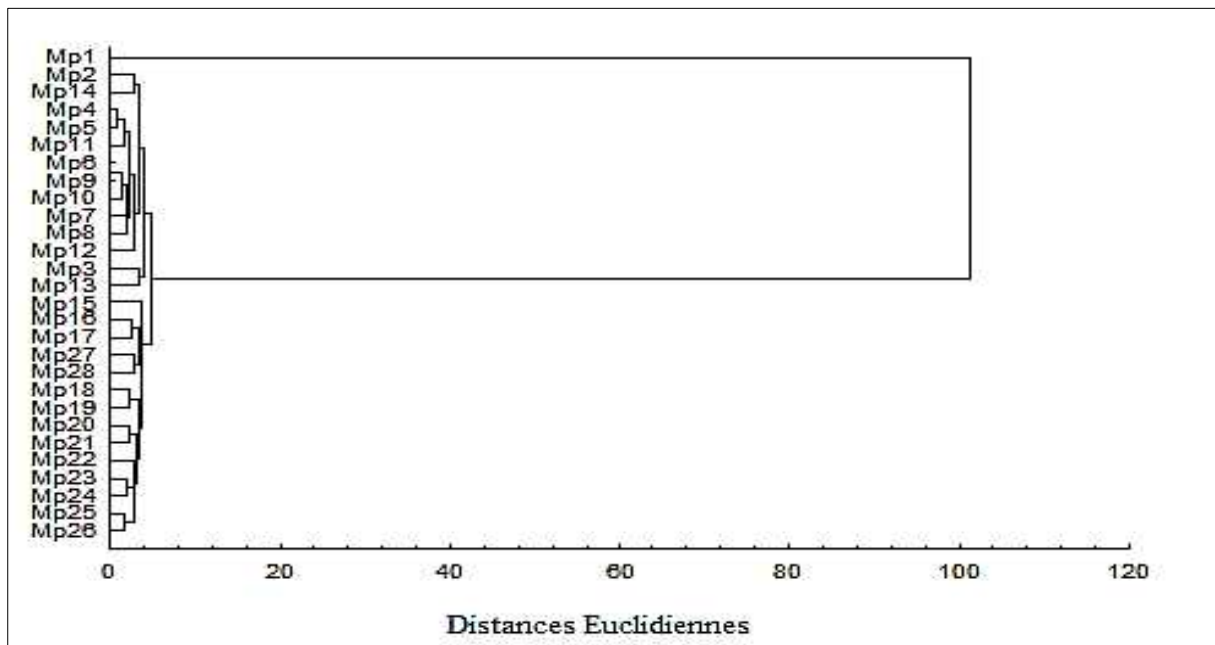


Figure 16 : Dendrogramme des albumines de *Medicago polymorpha*.

3.4. Dendrogramme des albumines chez *Medicago minima*

A la distance 5.7 (Figure 17), l'ensemble des accessions est divisé en deux groupes : le premier groupe est divisé à son tour en deux sous-groupes : le premier inclus l'accession Mmin11, tandis que le second groupe est fractionné en deux sous- groupes, Mmin12 dans un groupe a part et le deuxième contient trois accessions Mmin13, Mmin14 et Mmin15 qui forment entre elles un clade (avec des niveaux de similarités élevés). Le deuxième sous-

groupe est divisé en 2 le premier contient plusieurs accessions et le deuxième contient une seule accession Mmin10.

La valeur moyenne des distances d'agrégations est 3 (figure 17), dans cet intervalle, le dendrogramme révèle un degré de similitude de la composition en albumines de quelques accessions. Les accessions Mmin13, Mmin14 et Mmin15 appartiennent au même groupe et forment un clade malgré la divergence géographique qui existe entre elles. En effet, l'accession Mmin13 est de Sétif, Mmin14 de Oran et Mmin15 de Skikda (Figure 17).

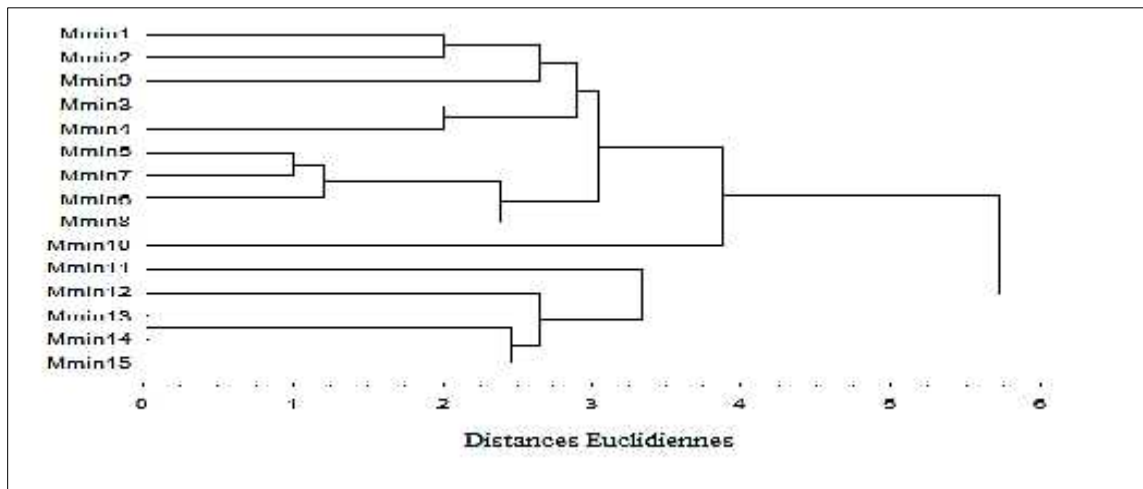


Figure 17 : Dendrogramme des albumines de *Medicago minima*

3.5. Dendrogramme des albumines chez *Medicago littoralis*

L'analyse en cluster (Figure 18) montre trois groupes à la distance 2.11 dont deux sont composés de deux accessions chacun très liées génétiquement avec des niveaux de similarités élevés, à savoir: Mlit1 et 3 et Mlit4 et 5. L'autre groupe comprend l'accession Mlit2 seulement.

Nous constatons que les accessions Mlit4 et Mlit 5 forment un même groupe alors qu'elles sont géographiquement éloignées : l'accession Mlit4 est de Jijel alors que Mlit5 est de Skikda.

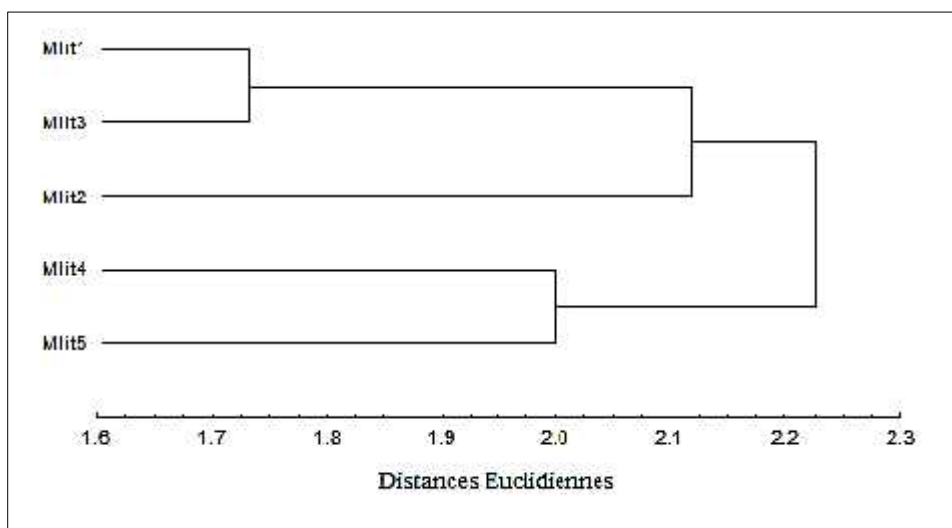


Figure 18 : Dendrogramme des albumines de *Medicago littoralis*

3.6. Dendrogramme des albumines chez *Medicago italica*

A la distance 2.6, le dendrogramme est divisé en deux groupes (Figure 19). Le premier est composé des deux accessions Mit 1 et 2 présentant des similarités dans la composition protéique malgré leurs sites géographiques qui sont différents (Mit1 est d'Alger alors que Mit2 est de Tipaza). Le deuxième groupe renferme le reste des accessions où la Mit4 seule forme un sous groupe à part. Mit3 et 5 constituent ensemble le deuxième sous groupe. Il est à noter que les deux accessions Mit2 et Mit3 qui sont génétiquement éloignées proviennent de la même région (Tipaza).

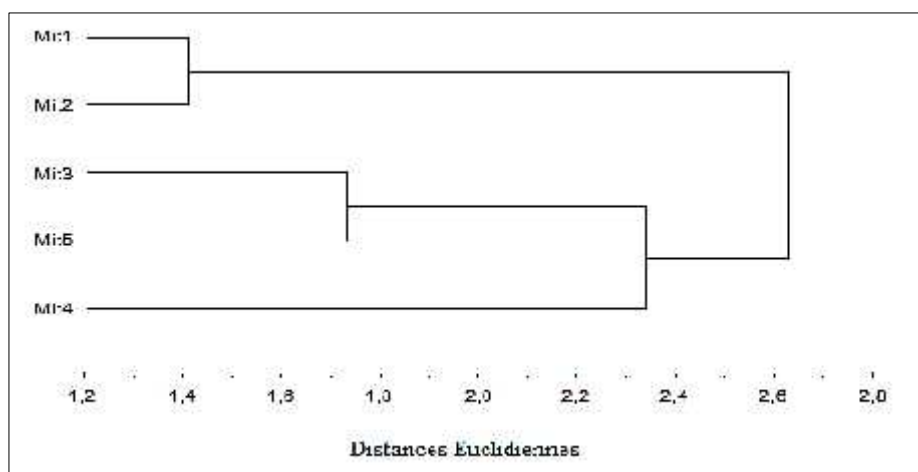


Figure 19 : Dendrogramme des albumines de *Medicago italica*

A la lumière des résultats de l'analyse en cluster, nous pouvons constater que l'origine géographique et la distribution écologique ne peuvent pas avoir des répercussions sur la composition protéique et ou génétique des accessions.

8. Distance génétique des albumines des espèces du genre *Medicago*

Pour quantifier l'analogie ou la dissemblance entre les accessions en estimant le degré de différence entre les diagrammes protéiques des accessions considérées deux à deux, on établit d'abord les diagrammes types qui permettent de conserver une image réelle des gels pouvant servir comme base de données pour l'identification et de calculer les distances génétiques.

Les distances génétiques intra et interspécifiques sont calculées pour les 5 espèces du genre *Medicago* et les accessions appartenant à chaque espèce. Elles sont représentées sous forme de matrice dans les tableaux 13, 14, 15, 16, 17 et 18.

Des valeurs faibles signifient que les diagrammes protéiques apparaissent très voisins et que les espèces sont génétiquement proches les unes des autres. Inversement, les valeurs élevées signifient que les diagrammes protéiques présentent de nombreuses dissemblances et que les espèces sont génétiquement éloignées. La plupart des échantillons reste différenciables car leurs diagrammes présentent au moins une différence significative.

8.1. Distance génétique interspécifiques des espèces du genre *Medicago*

Les distances génétiques ont été effectuées pour les 5 espèces de *Medicago*. Elles sont représentées sous forme de matrice dans le tableau 18. Il en ressort que la distance génétique se situe entre 5.74 et 8.66 (Tableau 13).

Tableau 13 : distances génétiques interspécifiques des espèces du genre *Medicago*

	Mh	Mp	Mmin	Mlit	Mit
Mh	0,00	8,66	8,31	7,62	7,42
Mp		0,00	8,37	7,14	7,21
Mmin			0,00	5,74	6,93
Mlit				0,00	5,74
Mit					0,00

Des valeurs faibles signifient que les espèces présentent des diagrammes protéiques avec de nombreuses ressemblances comme le cas des espèces *M. minima* et *M. littoralis* (DG=5.74), ainsi que les espèces *M. littoralis* et *M. italica*. Inversement, lorsque les valeurs des distance génétiques sont élevées, les espèces sont génétiquement éloignées tels que *M. hispida* et *M. polymorpha* présentant une distance génétique maximale de 8.66, suivie de la DG=8.37 observée entre les espèces *M. polymorpha* et *M. minima*. Une valeur moyenne de 6.93 est aussi observée entre les espèces *M. minima* et *M. italica*. De ce fait, ces différentes espèces présentent des diagrammes proches, avec autant de ressemblances que de dissemblances.

8.2. Distances génétiques intra spécifiques de l'espèce *Medicago hispida*

Le calcul des distances génétiques des 28 accessions de *M. hispida* montre que les valeurs de varient entre 1.73 et 5.92 (Tableau 14).

Les valeurs de DG les plus élevées pour cette espèce sont de 5.92 et 5.66. Ces dernières sont présentes entre les accessions Mh1 et Mh15, Mh1 et Mh16, respectivement. Ces accessions sont donc génétiquement éloignées (différences dans la composition protéique en albumines). Une valeur de 5 est observée entre quelques accessions, comme les accessions Mh1 et Mh25, Mh5 et Mh21, Mh9 et Mh23, Mh10 et Mh23, Mh14 et Mh21. De ce fait, ces différentes accessions présentent des diagrammes avec autant de dissemblances que de ressemblances dans la composition protéique en albumines.

Une valeur moyenne de 3.0 est aussi observée entre certaines accessions, comme les accessions Mh2 et 5, Mh2 et 11, Mh7 et 12, Mh20 et 27.....

Des valeurs moins élevées (DG=2.83) sont aussi présentes et concernent les accessions Mh6 et 9, Mh6 et 7, Mh19 et 22, Mh22 et 26, Mh24 et 26. De ce fait, ces différentes accessions présentent des diagrammes proches, avec autant de ressemblances que de dissemblances, ce qui fait penser que la composition protéique est presque la même.

La valeur la plus faible (DG=1.73) concerne les accessions Mh25 et 27. Ce sont les accessions les plus proches génétiquement (même composition protéique).

Tableau 14 : distances génétiques intraspécifiques de *M. hispida*.

	Mh 1	Mh 2	Mh 3	Mh 4	Mh 5	Mh 6	Mh 7	Mh 8	Mh 9	Mh1 0	Mh1 1	Mh1 2	Mh1 3	Mh1 4	Mh1 5	Mh1 6	Mh1 7	Mh1 8	Mh1 9	Mh2 0	Mh2 1	Mh2 2	Mh2 3	Mh2 4	Mh2 5	Mh2 6	Mh2 7	Mh2 8
Mh1	0,0	3,7	4,2	3,8	4,1	4,4	4,4	4,8	4,2	4,47	4,12	4,36	3,61	3,32	5,92	5,66	5,57	5,10	5,48	4,36	5,48	4,90	5,57	5,48	5,00	5,29	4,90	5,39
Mh2		0,0	3,1	3,3	3,0	3,4	3,4	3,8	3,7	3,16	3,00	3,61	3,61	3,61	5,39	5,10	4,36	4,00	4,47	3,87	5,10	3,74	5,39	5,29	4,12	4,69	4,00	4,12
Mh3			0,0	0,0	2,6	3,4	2,8	3,3	3,4	3,74	2,65	2,65	3,61	3,87	5,57	5,48	4,80	4,24	4,47	3,87	4,90	3,74	5,20	5,10	4,12	4,69	4,00	4,36
Mh4				0,0	2,0	3,8	2,2	3,7	3,0	3,61	3,16	3,74	4,24	4,00	5,83	5,74	5,10	4,58	4,80	4,24	5,39	4,12	5,48	5,39	4,47	5,00	4,36	4,47
Mh5					0,0	3,3	1,7	3,1	3,3	3,00	2,45	3,16	4,00	3,74	5,48	5,39	4,69	4,36	4,58	3,74	5,00	3,87	5,29	5,20	4,24	4,80	4,12	4,24
Mh6						0,0	3,1	3,0	2,8	3,16	3,00	3,32	4,12	4,12	5,20	4,90	4,36	4,00	3,61	4,69	3,16	4,80	4,69	3,61	4,00	3,46	3,87	
Mh7							0,0	3,0	2,8	3,16	2,24	3,00	3,87	3,87	5,57	5,48	4,80	4,00	4,24	3,87	4,90	3,46	5,00	4,90	3,87	4,47	3,74	3,87
Mh8								0,0	3,3	2,24	2,45	3,16	4,24	4,00	4,90	4,80	4,24	3,87	4,12	3,46	4,58	3,32	4,69	4,58	3,46	4,12	3,61	3,46
Mh9									0,0	3,46	3,00	3,87	4,36	4,12	5,39	5,29	4,80	4,00	4,47	4,12	5,10	3,74	5,00	4,90	4,12	4,47	4,00	4,36
Mh1 0										0,00	2,65	3,61	4,12	3,87	4,80	4,69	3,87	3,74	4,24	3,32	4,69	3,46	5,00	4,90	3,87	4,47	3,74	3,61
Mh1 1											0,00	2,45	3,46	3,46	5,10	5,00	4,24	3,87	4,12	3,46	4,58	3,32	4,90	4,80	3,74	4,36	3,61	3,74
Mh1 2												0,00	3,16	3,46	5,48	5,39	4,90	4,36	4,36	3,46	4,80	3,61	5,10	5,00	4,00	4,58	3,87	4,24
Mh1 3													0,00	3,46	5,66	5,57	5,10	4,58	5,00	4,00	5,20	4,36	5,48	5,39	4,69	5,20	4,58	4,69
Mh1 4														0,00	5,66	5,57	5,29	4,80	4,80	3,74	5,00	4,12	5,29	5,20	4,47	4,80	4,36	4,90
Mh1 5															0,00	3,61	4,00	5,20	5,39	4,69	5,39	5,20	4,90	4,80	5,10	5,00	5,00	4,24
Mh1 6																0,00	2,65	4,47	5,48	4,80	5,10	4,90	5,57	5,48	4,36	4,90	4,47	3,87
Mh1 7																	0,00	3,61	4,80	4,47	5,20	4,12	5,66	5,57	4,47	5,00	4,36	3,74

Mh1
8
Mh1
9
Mh2
0
Mh2
1
Mh2
2
Mh2
3
Mh2
4
Mh2
5
Mh2
6
Mh2
7
Mh2
8

0,00	3,16	3,61	4,00	2,45	4,36	4,24	3,32	3,46	3,16	3,61
0,00	3,61	3,16	2,83	3,32	3,16	3,32	é	3,46	4,12	
0,00	4,12	3,00	4,24	4,12	3,16	3,61	3,00	4,00	4,58	
0,00	4,00	3,00	3,16	3,87	3,46	4,00	2,83	2,00	3,32	
0,00	4,12	4,00	2,65	2,83	2,00	3,32				
0,00	1,00	3,74	3,00	3,87	4,69					
0,00	3,61	2,83	3,74	4,58						
0,00	2,65	1,73	3,16							
0,00	2,45	3,87								
0,00	3,32									
0,00										

8.3. Distances génétiques intra spécifiques de l'espèce *Medicago polymorpha*

Le calcul des distances génétiques des 28 accessions de *M. polymorpha* montre que les valeurs varient entre 1.0 et 101.47 (Tableau 15). Les valeurs élevées sont de 101.36 à 101.47 observées entre les accessions Mp1 et le reste des accessions, suivies de la valeur moyenne 5.57 observée entre quelques accessions comme les Mp5 et Mp16, Mp7 et Mp17, Mp8 et Mp17. De ce fait, ces différentes accessions présentent des diagrammes proches, avec autant de ressemblances que de dissemblances, ce qui fait penser que la composition protéique est presque la même.

Tableau 15: distances génétiques intraspécifiques de *M. polymorpha*.

	Mp1	Mp2	Mp3	Mp4	Mp5	Mp6	Mp7	Mp8	Mp9	Mp10	Mp11	Mp12	Mp13	Mp14	Mp15	Mp16	Mp17	Mp18	Mp19	Mp20	Mp21	Mp22	Mp23	Mp24	Mp25	Mp26	Mp27	Mp28	
Mp1	0,0	101,36	101,38	101,39	101,39	101,39	101,39	101,40	101,39	101,40	101,38	101,40	101,40	101,38	101,43	101,47	101,47	101,43	101,43	101,46	101,46	101,43	101,46	101,44	101,45	101,46	101,46	101,47	
Mp2	0,0	0	3,6	3,0	3,1	3,3	3,7	3,7	3,3	3,6	2,8	3,6	4,5	3,0	4,8	5,3	5,3	5,1	5,0	5,1	5,0	4,9	5,2	5,1	4,9	5,2	5,2	5,3	
Mp3	0	0	0	0	6	2	4	4	2	1	3	1	8	0	0	9	9	0	0	0	0	0	9	0	0	0	0	9	
Mp4	0,0	0	0,0	0	3,4	3,3	3,7	3,6	4,1	3,7	3,7	3,6	3,7	3,4	3,4	4,4	5,1	4,9	4,1	4,0	4,8	4,6	4,3	4,8	4,3	4,5	4,6	5,0	
Mp5	0	0	0	0	0	2	4	1	2	4	4	1	4	6	6	7	0	0	2	0	0	9	6	0	6	8	9	0	
Mp6	0	0	0	0	1,0	2,2	2,6	2,0	2,4	1,7	2,8	4,6	3,7	5,1	5,4	5,2	5,2	5,1	5,0	4,9	5,0	5,2	5,0	4,5	4,9	5,3	5,4		
Mp7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Mp8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mp19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Mp 20	0,0	2,2	2,8	2,8	3,1	2,8	3,0	3,7	4,3
Mp 21	0	4	3	3	6	3	0	4	6
Mp 22		0,0	3,3	3,3	3,3	3,6	3,7	4,1	4,2
Mp 23		0	2	2	2	1	4	2	4
Mp 24			0,0	2,8	2,8	3,1	3,0	3,4	3,6
Mp 25			0	3	3	6	0	6	1
Mp 26				0,0	2,4	3,0	3,4	4,1	4,1
Mp 27				0	5	0	6	2	2
Mp 28					0,0	2,8	3,0	3,7	4,1
					0	3	0	4	2
						0,0	1,7	3,1	3,8
						0	3	6	7
							0,0	3,0	3,4
							0	0	6
								0,0	3,0
								0	0
									0,0
									0

Des valeurs moins élevées sont par contre observées entre les patients Mp4 et 6, Mp23 et 24, Mp4 et 5 avec 2.0 et 1.0, respectivement. Ainsi, les diagrammes de ces différentes accessions présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique. Suivies de la valeur 0.00 qui signifie une similarité de 100% dans la composition en albumines, observée entre les accessions Mp6 et 9 qui sont très voisines (Tableau 15).

8.4. Distances génétiques intra spécifiques de l'espèce *Medicago minima*

Les distances génétiques effectuées pour les 15 accessions de *M. minima* varient dans l'intervalle de 00.00 et 6.40 (Tableau 16). A titre d'exemple : la valeur élevée est de 6.40 observées entre Mmin5 et Mmin15, Mmin6 et Mmin15, suivies de la valeur 6.32 observée entre quelques accessions comme Mmin5 et Mmin12, Mmin6 et Mmin12, Mmin7 et Mmin15, puis la valeur 4.00 entre les accessions Mmin3 et Mmin10. De ce fait, ces différentes accessions présentent des diagrammes différents, avec autant de dissemblances que de ressemblances, ce qui fait penser que la composition protéique n'est la même et sont génétiquement éloignées.

Les accessions Mmin5 et Mmin7, Mmin6 et Mmin7 présentent une valeur de distance génétique moins élevée de 1.00. Ainsi, les diagrammes de ces différentes accessions présentent une légère dissemblance, ce qui implique une forte similarité dans la composition protéique. Mmin13 et Mmin14 sont identique et très proches génétiquement avec une valeur de distance génétique maximale de 00.00.

Tableau 16 : distances génétiques intraspécifiques de *M. minima*

	Mmin1	Mmin2	Mmin3	Mmin4	Mmin5	Mmin6	Mmin7	Mmin8	Mmin9	Mmin10	Mmin11	Mmin12	Mmin13	Mmin14	Mmin15
Mmin1	0,00	2,00	2,65	3,32	3,32	3,32	3,16	3,00	2,83	3,61	5,66	5,74	5,29	5,29	5,83
Mmin2		0,00	2,24	2,65	2,65	2,65	2,45	3,32	2,45	3,61	5,66	5,74	5,29	5,29	5,83

Mmin3	0,00	2,00	2,83	3,16	3,00	3,46	3,00	4,00	5,92	5,83	5,57	5,57	5,92
Mmin4		0,00	2,45	2,83	2,65	3,46	3,61	4,24	6,08	6,00	5,74	5,74	6,08
Mmin5			0,00	1,41	1,00	2,45	3,32	4,24	6,24	6,32	5,92	5,92	6,40
Mmin6				0,00	1,00	2,45	3,32	4,24	6,24	6,32	5,92	5,92	6,40
Mmin7					0,00	2,24	3,16	4,12	6,16	6,24	5,83	5,83	6,32
Mmin8						0,00	3,61	4,24	6,08	6,16	5,74	5,74	6,24
Mmin9							0,00	2,65	5,48	5,57	5,10	5,10	5,66
Mmin10								0,00	4,80	4,90	4,36	4,36	5,00
Mmin11									0,00	3,00	3,46	3,46	3,46
Mmin12										0,00	2,65	2,65	2,65
Mmin13											0,00	0,00	2,45
Mmin14												0,00	2,45
Mmin15													0,00

8.5. Distances génétiques intra spécifiques de l'espèce *Medicago littoralis*

Les distances génétiques ont été calculées pour les 5 accessions de *M. littoralis* (tableau 17). Il en ressort que les DG se situent entre 1.73 et 2.65

La valeur élevée est de 2.65 observée entre Mlit25 et Mlit5, suivie de la valeur 2.00 observée entre quelques accessions comme Mlit15 et Mlit2, Mlit3 et Mlit4, Mlit3 et Mlit5, Mlit4 et Mlit5. De ce fait, ces différentes accessions présentent des diagrammes différents, avec autant de ressemblances que de dissemblances, ce qui fait penser que la composition protéique est presque la même. La valeur la moins élevée est de 1.73 observée entre Mlit1 et Mlit3. Ce sont les accessions les plus similaires.

Tableau 17 : distances génétiques intraspécifiques de *M. littoralis*

	Mlit1	Mlit2	Mlit3	Mlit4	Mlit5
Mlit1	0,00	2,00	1,73	2,24	2,24
Mlit2		0,00	2,24	2,24	2,65
Mlit3			0,00	2,00	2,00
Mlit4				0,00	2,00
Mlit5					0,00

8.6. Distances génétiques intra spécifiques de l'espèce *Medicago italica*

Les distances génétiques des 5 accessions montrent que les valeurs varient entre 1.41 et 3.00 (Tableau 18). La valeur élevée est et 3.00 observée entre Mit1 et Mit4, suivie de la valeur 2.24 observée entre les accessions Mit1 et Mit3, Mit2 et Mit3, Mit4 et Mit5, puis vient la valeur 1.41 présente entre Mit1 et Mit2. De ce fait, ces différentes accessions présentent autant de ressemblances que de dissemblances dans la composition protéique en albumines.

Tableau 18 : distances génétiques intraspécifiques de *M. italica*

	Mit1	Mit2	Mit3	Mit4	Mit5
Mit1	0,00	1,41	2,24	3,00	2,83
Mit2		0,00	2,24	2,65	2,83
Mit3			0,00	2,45	1,73
Mit4				0,00	2,24
Mit5					0,00

A la lumière de tous ces calculs de distances génétiques intra et interspécifiques, nous concluons que quelque soit l'espèce étudiée, il existe une similitude élevée entre certaines accessions présentant naturellement une ressemblance dans leur composition protéique (albumines) et/ou leurs morphologie et origine géographique. Ce sont généralement les accessions ou espèces présentant les valeurs les moins élevées et/ou faible de la distance génétique. A l'inverse d'autres accessions ayant une origine génétique éloignée et une différence dans leur composition protéique en albumines montrent des valeurs de distance génétique élevées.

Cette comparaison des profils des albumines obtenus par électrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS peut être fiable pour grouper un certain nombre d'accessions.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de recherche avait pour objectif d'une part la valorisation des ressources phylogénétiques et d'autre part l'appréciation de la variabilité génétique des légumineuses du genre *Medicago* (la luzerne) par l'analyse du polymorphisme des marqueurs biochimiques (albumines) de différentes accessions appartenant aux groupes d'espèces du même genre, par l'utilisation de l'analyse électrophorétique.

Notre première préoccupation est d'obtenir la meilleure expression possible des albumines de ces légumineuses. Ceci nous a conduit à réaliser une extraction qui permet d'avoir toutes les albumines. Ces dernières sont séparées par la méthode SDS/PAGE décrite par Laemmli, 1970 et modifiée par Singh et al, 1991.

Par conséquent, l'utilisation de cette dernière pour le fractionnement des albumines nous a fourni des diagrammes satisfaisants et nous a permis :

- d'apprécier la diversité intra et interspécifique des albumines,
- de comparer les profils électrophorétiques des différentes accessions et/ ou espèces du genre *Medicago* et de remarquer que chacune des accessions et/ ou espèce possède un profil protéique qui lui est propre et qui peut ressembler ou pas à celui d'une autre accession et/ou espèce par l'absence ou la présence d'une ou plusieurs protéines,
- de révéler les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques présentes sur le gel,
- de dénombrer des bandes protéiques communes entre les différentes accessions,
- et enfin de distinguer les différences dans la composition protéique des accessions et des espèces.

En outre, l'analyse statistique effectuée en calculant les fréquences, les distances génétiques, et également la classification hiérarchique a permis d'apprécier numériquement la diversité des albumines chez le genre *Medicago*.

L'analyse électrophorétique des albumines réalisée, révèle l'existence d'un polymorphisme intra et interspécifique qui pourra aider à la différenciation des espèces du genre *Medicago* notamment entre cinq espèces qui présentent beaucoup de ressemblances morphologiques. L'analyse de ces profils électrophorétiques a permis de déceler 58 bandes protéiques de mobilité différentes pour les l'espèce *M. hispida*. Pour l'espèce *M. polymorpha*, 53 bandes protéiques de mobilités différentes sont répertoriées. Pour l'espèce *M. minima*, 56 bandes protéiques de mobilités différentes sont dénombrées. Enfin 31 et 30 protéines de mobilités différentes sont observées pour les espèces *M. littoralis* et *M. italica*, respectivement.

Une nette différence intra spécifique est observée entre le profil de certaines accessions des espèces du genre *Medicago*. Environ 5 albumines communes entre les différentes accessions (A1, A2, A3, A4 et A5) pour *Medicago hispida*, 5 albumines (B1, B2, B3, B4, et B5) pour *Medicago polymorpha* et 3 albumines (C1, C2 et C3), (D1, D2 et D3), (E1, E2 et E3) pour *Medicago minima*, *Medicago littoralis* et *Medicago italica*, respectivement, sont les plus variables qualitativement et sont soit absentes ou présentes d'intensité égale ou différente.

La comparaison interspécifique des profils électrophorétiques a montré quatre exemples de protéines exprimées que chez certaines espèces et absentes totalement chez d'autres ; A1, A2 et A3 présentes chez *M. hispida* et absentes chez les autres espèces. Un autre exemple, des albumines exprimées chez *M. polymorpha*, les B1 et B3. Un autre exemple concerne les albumines C1 exprimée que chez *M. minima* et E1 exprimée que chez *M. italica*.

L'application des techniques d'électrophorèse monodimensionnelle nous a fourni des résultats satisfaisants mais cette méthode ne nous a pas permis de différencier d'une manière approfondie les accessions de la même espèce. Pour cela nous avons jugé à court terme, que l'emploi de l'électrophorèse bidimensionnelle devrait accroître encore nos possibilités de trouver une ou plusieurs albumines spécifiques en prenant en compte certains facteurs géographiques, climatiques et morphologiques.

Au terme de cette étude, il se dégage des données nouvelles quant à la variabilité génétique du genre *Medicago* où d'autres approches et d'autres méthodes seraient nécessaires et complémentaires pour:

- Mieux apprécier cette diversité et confirmer les résultats obtenus.
- Etudier les effets des différents facteurs sur le profil protéique.
- Essayer de comprendre les mécanismes d'adaptation de ce groupe de plantes.
- Essayer de corréliser cette diversité protéique avec les performances de fixation des sols, de régénération et de bio fertilisation.
- Approfondir les connaissances sur ce genre pour une meilleure valorisation dans les domaines de l'écologie et l'agriculture.
- Elargir le champ d'application de la technique de l'électrophorèse-SDS PAGE, et étudier d'autres genre et d'autres espèce pour la préservation de la diversité biologique et des ressources génétiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- **Adem L. 1974.** Etude du comportement des luzernes annuelles (écotypes locaux et populations étrangères) dans les régions de Sétif, Médéa, Tiaret et Alger. Mémoire Ing. *INA. Alger.* 95p.
- **Andersson M.S, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano C.E. 2006.** Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research* 96: 387-406.
- **Applewhite T.H. 1989.** Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs. *The American oil chemists society.*
- **Avicé.J-c. 2003.** Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation, *Canadian journal of Botany*, pb: *NRC Research Press.* 81:1198-1212
- **Barker D.G, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Génier G, Guy G, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T. 1990.** *Medicago truncatula*, a model²² plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Mol. Biol. Rep.* 8: 40-49.
- **Blagrove, Gillespie. 1978.** comparative studies on the proteines from seeds of *Lupinus angustifolius* L. *journal of plant physiology.* 5: 651-663.
- **Brumont F. 2008.** Prés et pâturages en Europe occidentale. *Ed. Presses. Univ. Du Mirail.* 292p.
- **Cook DR. 1999.** *Medicago truncatula*-a model in the making. *Curr Opin Plant Biol.* 2 : 301-304.
- **Cui Z, Carter TE, Jr, Burton JW, Wells R. 2001.** Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *Crop Sci.* 41: 1954-1967.
- **Dalechamps J. 1587.** *Historia generalis plantarum in librosXVII.* Ed. ApudG. Rovillium. Lugduni. 1094p.
- **Derek Munro B, Ernest S. 1997.** Les légumes du Canada. *NRC Research Press.* 2: 279-280.
- **Doyle j. j, Chapill, j.A, Bailey, D.C and Kajita. T.** towards a comprehensive phylogenie of legumes: evidence from rbc L sequences and non-molecular data. In *advences in legume systematic.* (eds .P.S. Herendeen and A.Bruneau) Kew: *Royal Botanic Gardens*,(2000), 20:1-20.
- **Ernest S, Stephen R. D, Deborah S, Erica J, Heidi L. Z. 1998.** Multiple independent losses of the plastid *rpoC1* intron in *Medicago* (Fabaceae) as inferred from phylogenetic

analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Can. J. Bot.* 76: 791–803.

- **Fournier. 1961.** Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiol.* 148: 1985-1995.

- **Fyad-Lameche, Yahia. 1993.** Evaluation of cold tolerance variability in annual *Medicago* species at the seedling stage. *Société botanique de France, Lille.*14: 3-17.

- **Gepts P, Beavis W.D, Brummer E.C, Shoemaker R.C, Stalker H.T, Weeden N.F, Young N.D. 2005.** legumes as a model plant family. Genomics for food and report of the Cross-Legume Advances Through Genomics Conference. *Plant Physiol* 137: 1228-1235.

- **Génier G. Guy P, Prosperi J.M. 1992.** Les luzerns. In: Gallais A et Bannerot H (Eds): amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. *Ed. Quae.* 768p.

- **Gomez O.J, Blair M.W, Frankow-Lindberg B.E, Gullberg U. 2004.** Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sci.* 44: 1412-1418.

- **Graham PH, Vance CP. 2003.** Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131: 872-877.

- **Harry. 2001.** Génétique moléculaire et évolutive. *Editions Maloine, Paris.*

- **Heyn C. C. 1963.** The annual species of *Medicago*. Publication of Hebrew university. *Jerusalem.* 12: 145-154

- **Hireche Y. 2006.** Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère. Batna

- **Ildis. 2001.** in LOUIS.S ; 2004, diversité structurale et d'activité biologique des Albumines entomotoxiques de type 1b des graines de légumineuses. Thèse de doctorat. Institut national des sciences appliquées de lyon.

- **Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- **La pevronie A. 1982.** Les productions fourragères méditerranéennes. Eds. *Maisonneuve & Larose.* 445p.

- **La peyronie A. 1982.** Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et Production méditerranéenne. *Maisonneuve et Larose. Paris.*8 : 307-315.

- **Lesins K. A, Lesins I. 1979.** Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. *Plant ecology.* 50: 228- 229.

- **Lquari H, Pedroche J, Giron-Calle J, Vioque J et Millàn F. 2004.** Purification and partial characterization of storage proteins in *Lupinus angustifolius* seeds. *Grasas y aceites.* 5:364-369.
- **Medoukali I, Bellil I, Khelifi D. 2015.** Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Medicago* L. Prospected in Northern Algeria. *Not Bot Horti Agrobo,* 10:56-66
- **Mathieu M. 2003.** Luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. *France agricole.* 5 :11-16.
- **Moreau D, Salon C, Munier-Jolain N. 2007.** A model-based framework for the phenotypic characterization of the flowering of *Medicago truncatula*. *Plant Cell and Environment.* 30: 213-224.
- Osborne. 1924.** The Vegetable Proteins. Longmans Green, ed. London.
- **Ozenda. 1982.** in *Bouredja.n,* 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma* (boiss) : mémoire de magistère. UNIV.des sciences et de la technologie d’Oran MOHAMED BOUDIAF (U.S.T.O) Oran.
- **Parizeau. 1997.** La biodiversité. *Edition de boeck.*
- **Pousset J. 2002.** Engrais vert et fertilité des sols. *Ed. France. Agricole. Paris.* 303p.
- **Prolea D. 2002.** Espèces et utilisations, des ressources en protéines à redécouvrir : les plantes fourragères prairiales – la luzerne. Institut du Végétal et de l’Institut de l’Élevage. *GNIS. Paris.* 3 :4-7.
- **Prosperi J. M, Isabelle O, Angevain M, Génier G, Nansat P. 1993.** Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d’Amélioration des luzernes méditerranéennes. *INRA. Mauguio.* 4 : 1-5
- **Prosperi. 1995.** Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d’Amélioration des luzernes méditerranéennes. *INRA. Mauguio.* 4 : 1-5.
- **Quezel P, Santa S. 1962.** Nouvelle flore de l’Algérie et des régions désertiques Méridionales. *CNRS. Tome I.* 4:133-137.
- **Russelle M. 2001.** alfalfa. *Am .Sci.*7: 252-259.
- **Salmanowicz. 2000.** Capillary electrophoresis of seed 2S albumins from *Lupinus* species. *Journal of Chromatography A.* 894:297-310.
- **Shewry P. R, Napier J. A et Tatham A. S. 1995.** Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 945-956.

- **Schoutteten F. 2004.** La luzerne. Fiche technique agro-industrie. *Champagen-Ardenne*. 5:1-5.
- **Singh N.K, Shepherd K.W, Cornish G.B. 1991.** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin. *Journal of Cere al Science*. 14: 203-208.
- **Small E, Jomphe M. 1989.** A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canad. J. Bot.* 67: 3260 – 3294.
- **Spichiger, 2004 R.E, Salvlaimen V, Figeat M, Jammonob D. 2004.** Botanique systématique des plantes à fleurs .éd :press polytechnique et universitaire romande, 3 :203-206 in *Bouredje.n, 2005*, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés.
- **Unesco. 1960.** Recherches sur la zone aride - XIII-Les plantes médicinales des régions arides. *Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture*. place de Fontenoy, Paris-7e *Imprimeries Oberthur*, Rennes © Unesco 1960 NS.59/III.17/ 99p.
- **Urban. 1873.** *M. orbicularis* (Linné) Bartalini Fo. *canescens* Urban. *Verh. Bot. Ver. Brandenb.* 15 : 60-75
- **Vienne. 1998.** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. *INRA, Paris*.
- **Zhentien. 2005.** A Two- dimensional Electrophoresis Proteomic Reference Map and Systematic Identification of 1367 Proteins from a Cell Suspension Culture of the model Legume *Medicago truncatula*. *Molecular &Celluler Proteomics*.14:1812-1825

ANNEXES

Composition des gels d'électrophorèse

Gel de séparation : T : 12,52% C : 0,97%

- Acrylamide 40% 12,4ml
- Bis acrylamide 2% 2,4ml
- Eau permutée 8,6ml
- Tampon Tris-HCL pH 8,8 15,2ml
- SDS 10% 0,40ml
- APS 1% 1ml
- TEMED 0,020ml

Gel de concentration: T: 2, 88 % C : 1,42%

- Acrylamide 40% 1ml
- Bis acrylamide 2% 0,3ml
- Eau permutée 10,2ml
- Tampon Tris-HCL pH 6, 8 1,7ml
- SDS 10% 0,14ml
- APS 1% 0,70ml
- TEMED 0,014ml

