



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine 1

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية العلوم الطبيعة والحياة

قسم: الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

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 Alimentaires

Spécialité : Biochimie de la nutrition

Intitulé :

**Évaluation de la diversité génétique au sein de *Medicago truncatula* Algérienne par les marqueurs morphologiques et moléculaires**

Présenté et soutenu par : *AIMAR OUMNIA*

Le : 20/09/2020

*LANACEUR OUMNIA RANA*

**Jury d'évaluation :**

**Présidente :** MOUSSAOUI SAMIRA MCB - UFM Constantine

**Encadrante :** MEDOUKALI IMANE MCB - UFM Constantine

**Examinatrice :** GUENDOUZE ASSIA MCB - UFM Constantine

*Année universitaire  
2019 - 2020*

## ***REMERCIEMENTS***

*Avant tout, nous remercions « DIEU » Le tout-puissant de nous avoir donné le courage, la volonté, la patience et la santé durant toutes ces années et que grâce à lui ce travail a pu être réalisé.*

*Nous remercions aussi tout particulièrement notre encadrante Mme MEDOUKALI I .Maitre de conférences au département de biochimie et biologie cellulaire et moléculaire à l'université Constantine 1 pour l'orientation, sa confiance, sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nous exprimons toutes nos reconnaissances à Mme MOUSSAOUI S. Maitre de conférences « B » pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire et d'évaluer notre travail. Trouvez ici l'expression de nos respectueuses gratitude et de nos remerciements pour avoir bien voulu juger ce travail.*

*Nous tenons à remercier sincèrement avec plus grande gratitude et profonds respects à Mme GUENDOUZ A. Maitre de conférences « B » de l'honneur qu'elle nous fait d'avoir acceptée de se joindre à ce jury en tant qu'examinatrice et de nous consacrer son temps.*

*Nous désirons également exprimer nos remerciements au Professeur Mr KHLIFI D. le directeur du laboratoire de génétique biochimie et biotechnologies végétales de l'université Constantine 1, vous nous avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail.*

*Enfin, nous remercions toute personne qui nous a aidé de près ou de loin afin d'effectuer ce mémoire.*



*On remercie chaleureusement nos familles et nos amis.*

*Nous espérons être à la hauteur de votre confiance*

*Par Oumnia et Rana.*

# *Dédicace*

*A la mémoire de ma grande mère*

*A ma tendre mère,*

*Pour son amour, ses encouragements et ses sacrifices*

*A mon père,*

*Pour son soutien, son affection et la confiance qu'il m'a accordée*

*A mon rayon de soleil*

*Ma sœur jumelle Aya*

*A mes frères : Amine, Seif, Moncef*

*A ma belle-sœur Bassma et mes deux petits poussins Haitham et  
Yakine*

*Je leur souhaite tout le succès ... tout le bonheur*

*A ma chère binôme Oumnia Rana,*

*Pour son entente et sa sympathie*

*A mes chères amies,*

*Pour leurs aides et supports dans les moments difficiles*

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour que ce travail  
soit possible*

*Aimablement Aïmar Oumnia*

# *Dédicace*

*A la mémoire de mes grand pères et ma grande mère*

J'aurais tant aimé que vous soyez présents.

Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde

*A mes chers parents*

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être.

Je vous remercie pour tout le soutien, l'encouragement et l'amour que vous me portez depuis mon enfance.

*A ma sœur chérie Soundous Racha*

*A mon petit frère Abderahmane Rami*

Que je les aime

*A ma chère grande mère*

Qui m'a accompagné par ses prières.

Puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé.

*A ma chère douce binôme et sœur Oumnia*

Pour son soutien moral et sa patience

*A mes chères amies*

Pour leurs aides et leurs encouragements

*A mes entraineurs de judo Azouz, brahim*

*Et de handball Anis*

*À toutes les personnes qui portent le nom*

***LANACEUR et BELGUEDJ***

*Et a toute les personnes qui ont participé de loin ou de près*

*Aimablement **Oumnia Rana***

# Sommaire

Liste des abréviations	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Introduction.....	1

## CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités des légumineuses.....	3
2. Présentation générale du genre <i>Medicago</i> .....	4
2.1. Taxonomie et génétique.....	5
2.2. Morphologie du genre <i>Medicago</i> .....	5
2.3. Aire de répartition du genre <i>Medicago</i> .....	6
2.4. Espèces du genre <i>Medicago</i> rencontrées en Algérie.....	7
3. Présentation de l'espèce d'étude <i>M. truncatula</i> .....	8
3.1. Description botanique.....	8
3.2. Position systématique.....	9
3.3. Aire de répartition.....	10
3.4. <i>M. truncatula</i> plante modèle.....	11
3.5. Intérêt biologique.....	12
3.6. Intérêt agronomique.....	13
3.7. Intérêt génétique.....	13
4. Diversité génétique.....	13
5. Marqueurs génétiques .....	14
5.1. caractéristiques d'un bon marqueur .....	15
5.2. Marqueurs morphologiques.....	15
5.3. Marqueurs biochimiques.....	15
5.4. Marqueurs moléculaires.....	16
5.4.1. Microsatellites .....	16

## CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel végétal .....	18
2. Méthodes d'étude .....	20
2.1. Analyse morphologique.....	20
2.2. Analyse moléculaire .....	20
2.2.1. Préparation des échantillons.....	20
2.2.2. Analyse SSR.....	21
2.2.3. Amplification in vitro de l'ADN par PCR .....	21
a) Principe.....	21
b) Conditions d'amplification.....	22

c) Test d'amplification.....	23
2.3. Analyse statistique .....	23

<b>CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION</b>
---

1. Analyse de la diversité morphologique .....	24
1.1. Analyse en composantes principale des caractères biométriques (ACP).....	27
1.2. Analyse des liaisons inter-caractères.....	28
1.3. Corrélation entre les caractéristiques morphologiques et les paramètres écologiques.....	30
1.4. Analyse en composantes principales des accessions étudiées .....	33
2. Analyse de la diversité moléculaire .....	34
2.1. Lecture des profils électrophorétiques .....	34
2.2. Mobilité et fréquence des amplifiants.....	34
2.3. Analyse génétique.....	39
2.4. Distances génétiques.....	39
2.5. Classification ascendante hiérarchique (CAH) .....	42
3. Discussion .....	43
Conclusion et perspectives .....	48
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumés	

## ABBREVIATIONS

<b>ACP</b>	Principal Component Analysis
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AFL</b>	Aire de la première feuille
<b>AFLP</b>	Amplified Frangment Lengh Polymorphism
<b>ALT</b>	Attitude
<b>BFL</b>	Largeur de la première feuille
<b>CTAB</b>	Bromure de cétyl tri méthyl ammonium
<b>DCOT</b>	Date d'émergence des cotylédons
<b>dCTP</b>	Désoxycytidine triphosphate
<b>dGTP</b>	Désoxyguanosine triphosphate
<b>dNTP</b>	Désoxyribonucléoside triphosphate
<b>dTTP</b>	Désoxythymidine triphosphate
<b>ETS</b>	Expressed Sequence Tag
<b>HH</b>	Hyper-Humide
<b>ISSR</b>	Inter Simple Sequence Repeats
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LAT</b>	Latitude
<b>LFL</b>	Longueur de la première feuille
<b>LON</b>	Longitude
<b>LP</b>	Longueur des gousses
<b>LS</b>	Longueur des graines
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de magnésium
<b>N<sub>2</sub></b>	Azote atmosphérique
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>Pm</b>	La pluviométrie moyenne
<b>RAPD</b>	Randomly Amplified Polymorphism DNA
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RW</b>	Poids des gousses
<b>SH</b>	Subhumide

<b>SNP</b>	Single Nucleotide Polymorphism
<b>SP</b>	Nombre de graines par gousse
<b>SS</b>	Semi Sec
<b>SSR</b>	Simple Sequence Repeats
<b>STS</b>	Sequence Tagged site
<b>TBE</b>	Tris, acide borique, EDTA
<b>TM</b>	La température maximale
<b>Tm</b>	Moyenne de la température minimale du mois le plus froid
<b>UPGMA</b>	Unweighted Pair Group Method Arithmec Average
<b>WP</b>	Largeur des gousses
<b>WS</b>	Largeur des graines
<b>WTP</b>	Poids de 30 gousses
<b>WTS</b>	Poids de mille graines

## Liste des tableaux

### Partie 1 : Revue bibliographique

<b>Tableau 1.</b>	Composition des réserves de quelques graines d'espèces cultivées.....	4
<b>Tableau 2.</b>	Espèces annuelles et pérennes du genre <i>Medicago</i> rencontrées en Algérie.....	8
<b>Tableau 3.</b>	Distribution des populations de <i>M. truncatula</i> collectées dans différents pays et composant les collections mondiales existantes.....	11

### Partie 2 : Matériel et méthodes

<b>Tableau 4.</b>	Origines géographiques des 29 accessions étudiées, avec leur paramètres éco-géographique correspondants.....	19
<b>Tableau 5.</b>	Séquences et groupe de liaison de cinq amorces de microsatellites testées dans l'espèce <i>M. truncatula</i> des 29 accessions.....	21

### Partie 3 : Résultats et discussion

<b>Tableau 6.</b>	Données descriptives des caractères morphologiques et des paramètres écologiques des 24 populations de <i>M. truncatula</i> .....	25
<b>Tableau 7.</b>	Moyenne, écart type et coefficient de variation des 12 traits analysés pour les 24 accessions de <i>M. truncatula</i> .....	26
<b>Tableau 8.</b>	Matrice de corrélations entre les différents caractères morphologiques des 24 accessions étudiés.....	29
<b>Tableau 9.</b>	Matrice de corrélation entre les différents caractères morphologiques et les cinq paramètres écologiques.....	32
<b>Tableau 10.</b>	Matrice présence/absence, mobilités et fréquences pour l'amorce AFCT32 des 28 accessions de <i>M. truncatula</i> .....	38
<b>Tableau 11.</b>	Matrice présence/absence, mobilités et fréquences pour l'amorce AFctt1 des 28 accessions de <i>M. truncatula</i> .....	38
<b>Tableau 12.</b>	Nombre total des bandes amplifiées et polymorphisme dans les 28 accessions pour chaque marqueur SSR.....	39
<b>Tableau 13.</b>	Distances génétiques obtenues entre les 28 accessions de <i>M. truncatula</i> en se basant sur les données des amorces (AFct32/AFctt1).....	41

## Liste des figures

### Partie 1 : Revue bibliographique

<b>Figure 1.</b>	Classification des légumineuses de la famille des <i>Papilionoideae</i>	3
<b>Figure 2.</b>	Taxonomie du genre <i>Medicago</i>	5
<b>Figure 3.</b>	Les différentes parties du <i>Medicago truncatula</i>	6
<b>Figure 4.</b>	Carte géographique de la distribution de <i>Medicago</i> dans le monde	6
<b>Figure 5.</b>	Un rameau de <i>Medicago truncatula</i> ; fleur, gousse, graines	9
<b>Figure 6.</b>	Le cycle de vie de la plante modèle <i>Medicago truncatula</i> . A: stade plante B: stade feuille C: stade fleur D: stade gousse E: stade graine	9
<b>Figure 7.</b>	La détection d'un polymorphisme de répétition (SSR)	17

### Partie 2 : Matériel et méthodes

<b>Figure 8</b>	Localités géographiques des 29 accessions de l'espèce <i>M. truncatula</i> dans le Nord Algérien.	18
-----------------	---	----

### Partie 3 : Résultats et discussion

<b>Figure 9.</b>	Analyse en composantes principales de douze caractéristiques morphologiques	27
<b>Figure 10.</b>	Répartition des 24 accessions étudiées sur les plans 1/2 de l'ACP	30
<b>Figure 11.</b>	Analyse en composantes principales des caractères biométriques et leur relation avec les paramètres écologiques	33
<b>Figure 12.</b>	Profils électrophorétiques des bandes SSR de l'espèce <i>M. truncatula</i> révélés par l'amorce AFctt1	35
<b>Figure 13.</b>	Profils électrophorétiques des bandes SSR de l'espèce <i>M. truncatula</i> révélés par l'amorce AFct32	36
<b>Figure 14.</b>	Classification hiérarchique en UPGMA des 28 accessions de <i>M. truncatula</i> basée sur le polymorphisme des amorces : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe, 5) le cinquième groupe.	43

# Introduction

La biodiversité constitue le fondement nécessaire au fonctionnement de la planète terre et elle assure, en quelque sorte, sa pérennité. Elle ne se résume pas à un catalogue statique d'espèces mais au contraire, elle résulte de l'évolution et de la dynamique du monde vivant (Dajoz, 2003 ; Blondel, 2006). A l'échelle internationale, la diversité biologique s'appauvrit d'une manière considérable du fait des activités humaines. En effet, les efforts déployés pour assurer les besoins alimentaires ont engendré des menaces qu'il faut maintenant prendre en compte. En effet la mécanisation poussée pour le travail du sol, l'utilisation des pesticides et des engrais chimiques pour augmenter la production végétale, l'ajout des farines animales pour l'alimentation du cheptel, constituent autant d'entraves pour la pérennité de la vie dans les sols, une menace pour l'état sanitaire des végétaux, des animaux, une source d'altération de la qualité des produits et un problème de santé humaine.

L'Algérie est réputée par une large diversité des conditions naturelles, de son relief, de sa géologie, de ses sols et de son climat, a fini par forger une grande diversité biologique. Elle a défini des biotopes variés permettant la coexistence de nombreuses espèces végétales et animales, souvent adaptées à des conditions abiotiques extrêmes ainsi qu'à de fortes pressions biotiques. Le nombre d'espèces végétales en Algérie est de 3 139, réparties en 5 402 taxons (Quézel et Santa, 1962).

Les légumineuses, par leurs intérêts agronomique, alimentaire et écologique, se trouvent actuellement au centre des préoccupations des instances internationales. Leur importance est due entre autres à leur contribution, chaque année, à la fixation d'environ 65 millions de tonnes d'azote atmosphérique intégrés dans la biosphère (Graham et Vance, 2003). Mais le problème persistant est que la plupart des légumineuses sont difficiles à étudier parce qu'elles ont un grand génome (Barker et al., 1990 ; Handberg et Stougaard, 1992). A ce effet L'espèce *M. truncatula*, au vu, entre d'autre, de son génome relativement petit, s'est vue attribuer le statut de plante modèle au niveau génomique et moléculaire pour les études biologiques sur les légumineuses (Thoquet et al., 2002 in Ellwood, 2006 ; Young et al., 2003 ; Kulikova et al., 2001 ; Ané et al., 2008). C'est une légumineuse annuelle originaire du pourtour méditerranéen (Blondon et al., 1994), sa biodiversité est caractérisée par une forte variabilité morphologique et génétique intra- et interpopulation par une importante homozygotie au niveau individuel (Bonnin et al., 1996).

L'objectif de cette étude est d'évaluer la diversité génétique de différents écotypes de l'espèce *M. truncatula*, qui ont été récoltés à travers plusieurs régions géographiques selon un gradient bioclimatique dans le Nord Algérien, et cela par des marqueurs morphologiques (caractères biométriques) et moléculaires (microsatellites), on se basant sur la technique PCR et l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Le présent travail est structuré en trois parties. A partir d'une revue bibliographique, une première partie fera tout d'abord le point sur la présentation de la famille des légumineuses, leur intérêt et leur situation en Algérie avec une présentation du genre *Medicago* L. et plus particulièrement l'espèce modèle *M. truncatula*. Ensuite, un aperçu sur la diversité génétique, son intérêt et son étude par les marqueurs génétiques et morphologiques.

La deuxième partie décrit le matériel végétal ainsi que les techniques utilisées pour la réalisation de notre objectif.

La troisième partie décrit les étapes suivies dans l'exploitation des résultats ainsi que leurs discussions. Une conclusion générale et des perspectives sont données.

**REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses (Fabacées) représentent une famille importante et variée des Angiospermes. Il s'agit de la troisième plus grande famille chez les plantes supérieures composées de plus de 650 genres et 18 000 espèces allant de la luzerne, espèce herbacée aux arbres composant les forêts tropicales (Cronk *et al.*, 2006). et la deuxième plus importante pour les pâturages d'intérêt agricoles, après les poacées (graminées) qui incluent la canne à sucre et les céréales tels maïs, riz, blé, orge, avoine, seigle et millet (Young *et al.*, 2003 ; De Faria *et al.*, 1989).

Cette famille est répartie en 3 sous-familles en se basant, principalement, sur les différences morphologiques de leurs fleurs (Allen et Allen, 1981): *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* et *Papilionoideae* (Doyle et Luckow, 2003). La sous famille des *Papilionoideae* regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement : le soja (*Glycine max*,  $2n = 4x = 40$ ), le haricot (*Phaseolus vulgaris*,  $2n = 2x = 22$ ), le pois (*Pisum sativum*,  $2n = 2x = 14$ ), la luzerne (*Medicago sativa*,  $2n = 4x = 32$ ), l'arachide (*Arachis hypogaea*,  $2n = 4x = 40$ ), le pois chiche (*Cicer arietinum*,  $2n = 2x = 16$ ), et la fève (*Vicia faba*,  $2n = 2x = 16$ ). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés Galegoïdes et Phaseoloïdes (Figure 1), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Broughton *et al.*, 2003).

La spécificité de ces plantes est leur aptitude à fixer l'azote en symbiose avec des microorganismes du sol, et elles sont donc d'excellents colonisateurs des environnements pauvres en azote (De Faria *et al.*, 1989).

Le partenaire bactérien de cette symbiose, appartenant à la famille des Rhizobiacées peuvent infecter les racines des légumineuses entraînant la formation de structures appelés nodosités ou nodules, le processus de la fixation, lui-même, consiste en la réduction de l'azote atmosphérique  $N_2$  sous forme ammoniacale. Cette réaction est catalysée par un complexe enzymatique appelé Nitrogénase d'origine bactérienne (Downie, 2005). L'activité de cette enzyme est inhibée par l'oxygène d'où la présence dans les nodules fonctionnels de la leghémoglobine régulant les taux d'oxygène libre. L'intérêt agronomique des légumineuses a son origine dans cette fixation symbiotique de l'azote qui leur permet de produire en abondance des protéines en l'absence de fertilisation azotée.

Les graines de légumineuses sont plus riches en protéines et moins riches en glucides que celles de céréales (Tableau 1) : on distingue les espèces à graines riches en protéines et en huile, sans amidon, classées comme oléagineux (soja, arachide) et les espèces à graines riches en protéines, classées comme protéagineux (pois, féverole) ou légumes secs (haricot, lentille, pois chiche) (Lazrek-Ben Friha, 2008). Graham et Vance (2003) estiment que les légumineuses fournissent pour l'Homme environ le 1/3 des protéines alimentaires.

**Tableau 1.** Composition des réserves de quelques graines d'espèces cultivées. D'après Bewley et Black (1994).

	Composition moyenne en %		
	Protéines	Huiles	Carbohydrates (amidon)
<b>Céréales</b>			
Orge	12	3	76
Maïs	10	5	80
Avoine	13	8	66
Seigle	12	2	76
Blé	12	2	75
<b>Légumineuses</b>			
Haricot	23	1	56
Petit pois	25	6	52
Arachide	31	48	12
Soja	37	17	26

Les légumineuses fourragères représentent une autre source de protéines pour l'alimentation du bétail (luzerne, trèfle). Elles sont à la base de la production de lait et de viande (Russelle, 2001). La luzerne représente le fourrage le plus répandu dans les zones à climat tempéré (Russelle, 2001). Cette plante apporte de nombreux éléments à la ration donnée aux animaux. Elle leur fournit d'abord une part importante des protéines nécessaires à leur croissance, de la Bétacarotène et des fibres indispensables à la digestion chez le ruminant.

## 2. Présentation générale du genre *Medicago*

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*. Le nom anglais et espagnol alfalfa proviendrait du nom arabe al-fac-façah, qui signifie « le père des aliments » car il servait de fourrage aux chevaux. Quant au nom vernaculaire, il est emprunté à l'occitan *luserna*, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante (Pierre, 2008).

## 2.1. Taxonomie et génétique

Le genre *Medicago* appartient à l'ordre des Fabales, superfamille des légumineuses, famille des *Fabaceae* et sous-famille des *Faboideae*. Le genre *Medicago* est placé dans la tribu des *Trifolieae* qui comprend la majorité des légumineuses fourragères tempérées comme la luzerne cultivée et le trèfle, et qui est phylogénétiquement proche de la tribu des *Vicieae* incluant les légumineuses à graines comme le pois (*P. sativum*) et la féverole (*Vicia faba*) (Doyle et Luckow, 2003 ; Choi *et al.*, 2004).

Il est particulièrement proche des genres *Melilotus* et *Trigonella* et a été classé en quatre sous-genres sur la base de la morphologie des gousses et des graines : *Lupularia*, *Medicago*, *Orbicularia* et *Spirocarpos* (figure 2) (Lesins and Lesins, 1979). Ces sous-genres comprennent au total 55 espèces dont 21 sont pérennes, 33 sont annuelles. Le sous-genre *Spirocarpos* est composé de 29 espèces annuelles (médics) et comporte quatre sections : *Intertextae*, *Leptospirae*, *Pachyspirae* et *Rotatae*.

Quatre nombres chromosomiques existent dans ce genre :  $2n = 2x = 14, 16, 32$  et  $48$  ; deux nombre de base  $x = 7, x = 8$  et trois niveaux de ploïdie : diploïdes ( $2n = 2x = 14$  et  $2n = 2x = 16$ ) qui représentent la majorité des espèces, tétraploïdes ( $2n = 4x = 32$ ) et hexaploïdes ( $2n = 6x = 48$ ) (Quiros and Bauchan 1988). Les formes annuelles sont réputées comme étant autogames, tandis que les tétraploïdes sont allogames (Abdelkafi et Marrakchi, 1998).

## 2.2. Morphologie du genre *Medicago* L.

Selon Heyn (1963) toutes les espèces du genre *Medicago* présentent des feuilles trifoliées composées de trois folioles et un pétiole inséré à la tige en un point où se trouvent deux stipules incisées. Les folioles sont sous différentes formes : rondes, obovées, largement ou étroitement obovées, elliptiques ou obcordées et ovées. Les folioles portent des dents qui peuvent être émoussées ou pointues selon les espèces. Elles présentent ou non des poils sur les faces inférieures et des taches sur les faces supérieures.

La fleur se compose d'un calice, une corolle, 10 étamines (9+1) et d'un pistil dont le tube a la forme d'une cloche avec 5 dents subégales. La corolle est papilionacée avec un étendard de différentes formes (arrondie, obovée, ovée ...) dont l'extrémité peut être jaune ou violette et deux pétales sous forme d'ailes de longueur supérieure, inférieure ou égale à la carène, sa couleur est généralement jaune (foncé ou clair) sauf chez *M. sativa* et *M. daghestanica* ou elle est violette. Selon les espèces, le pédoncule est soit inférieur soit égal au

pétiole et la présence ou l'absence de l'arête dépend aussi de l'espèce (Lesins et Lesins, 1979).

L'inflorescence chez *Medicago* d'après Heyn (1963) est une grappe avec un grand nombre de fleurs, ce nombre peut être réduit jusqu'à 1 ou 2 fleurs. 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).

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), présentent une couleur variable allant du jaune paille au noir ; Ses gousses peuvent être lâches, dures ou moyennes, et de diverses formes (ronde, ovale, cylindrique, en tonneau, discoïde, oblongue elles sont soit poilues (poils simples ou glanduleux), soit glabres. Les gousses sont enroulées en spires d'un nombre variable et présentent un réseau d'anastomoses de nervures ; Chaque spire porte des épines de nombre variable et insérées selon des angles différents. Dans chaque tour de spire on trouve des graines d'un nombre, de taille et de couleur variables (Figure 3) (Heyen, 1963).

### **2.3. Aire de répartition 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.

D'après Prosperi *et al.*, (1995, 2000), les aires d'origine de toutes les espèces du genre comme étant « le croissant fertile » recouvrant les pays ou régions actuelles de Turquie, d'Iran, d'Irak, du Sud du Caucase et du pourtour méditerranéen.

Les travaux de Mathieu (2003) et Hireche (2006) affirment qu'au cours de XIX siècle, Les luzernes ont conquis l'ensemble de la zone méditerranéenne, plusieurs luzernes annuelles ont été distinguées (Prosperi *et al.*, 1993), ensuite elles ont envahi d'autres parties du monde, en particulier les continents américain et australien à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine.(Figure 4).

Les espèces de *Medicago* annuelles ont été également introduites dans d'autres régions du monde surtout dans les régions qui ont un climat ressemblant au bassin méditerranéen par exemple l'Afrique du sud et le Chili.

Les luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides (Lapeyronie, 1982). Les *Medicago* arbustives sont originaire de la Grèce et des Iles. Actuellement, elles sont spontanée sur l'ensemble du pourtour Méditerranée, néanmoins elles se limitent aux zones Méditerranéennes chaudes car elles sont sensibles aux gelés importants (températures inférieure à -10°C) (prosperi *et al.*, 1995 ; abdelgherfi et Marrakchi, 2000).

#### **2.4. Espèces du genre *Medicago* rencontrées en Algérie**

En Algérie les espèces du genre *Medicago* sont largement distribuées dans des étages bioclimatiques variés. Elles présentent un important potentiel agropastoral notamment dans les zones steppique arides ou semi arides. Les deux espèces les plus connues du genre sont *M. ciliaris*(L) *M. intertexta* (L), ont une répartition à tendance allopathique. La première dans le Nord-Ouest, montre une tolérance vis-à-vis de la sécheresse ; la seconde se rencontre essentiellement dans le Nord-Est (Laouar et Abdelguerfi, 2003). Elle se localise dans les zones de pluviométrie annuelle, préfère les sols lourds humides et les sols faiblement basiques à neutres de texture fine et très fine (Abdelguerfi *et al.*, 1988a, 1988).

Les espèces pérennes sont *M. falcata*(L), *M. lupulina*L. ,*M. marina* L., et *M. sativa*L. Ce dernier taxon, très bien adapté au pâturage, est fréquent en Algérie orientale dans les régions d'altitudes.

Le genre *Medicago* est représenté en Algérie par de nombreuses espèces annuelles et pérennes spontanées (Tableau 2).

**Tableau 2.** Espèces annuelles et pérennes du genre *Medicago* rencontrées en Algérie (Hireche., 2006).

Espèces	Caractéristique et aire de répartition en Algérie
<i>M. sativa</i>	plante vivace rencontré un peu partout
<i>M. falcata</i>	plante vivace très résistante au froid
<i>M. lupulina</i>	dite lupuline ou minette: plante annuelle ou bisannuelle
<i>M. marina</i>	plante vivace, elle pousse sur les sables maritimes
<i>M. scutellata</i>	dite luzerne à écusson: plante annuelle, se rencontre sur les sols argileux du Tell.
<i>M. ciliaris</i>	rencontré surtout dans les pâturage et prairies du Tell à sol semi salin
<i>M. truncatula</i>	plante annuelle très commune dans le Tell.
<i>M. minima</i>	plante annuelle, est souvent rencontré sur les sols pauvres.
<i>M. arabica</i>	plante annuelle.
<i>M. lanciniata</i>	plante annuelle.
<i>M. hispida</i>	plante annuelle.

### 3. Présentation de l'espèce d'étude *M. truncatula*

Appelée communément luzerne tronquée ou encore luzerne sauvage, fait partie des espèces annuelles surnommées « Medics ». Espèce végétale herbacée des régions méditerranéennes.

#### 3.1. Description botanique

Selon Heyn (1963), *M. truncatula* a été décrit la toute première fois en 1791 par Gaertner (Gaertn.) dans le De Fruct. 2 : 350. Ensuite, il a été présentée en 1792 dans le Lam Encycl. Method 3 : sous le nom de *M. tribuloides*. Enfin, Urban en 1873 a apporté des modifications à la description faite par Gaertner dans Verh. Bot ver. Brandenb : 67.

C'est une plante fourragère annuelle herbacée, de 15 à 80 cm de long. Selon Heyn (1963), les ramifications commencent près de la base, à port variable, souvent prostré, parfois érigé. Les feuilles y sont trifoliolées et les folioles sont généralement tronquées, cunéaires à

obovales, ou lancéolées et rarement incisées l'inflorescence porte 1 à 5 fleurs jaunes. Ses petites fleurs jaunes donnent après autofécondation des gousses cylindriques très dures, en forme de vrilles renfermant 4 à 6 graines. Les spires jointives de la gousse portent des épines recourbées perpendiculaires au plan des spires. Les graines de cette plante ont une durée de vie importante supérieure à 40 ans, et une dormance qui peut être levée facilement (Lesins et Lesins, 1979) (Figure 5).

Divers sous espèces *Medicago truncatula* ont été déterminées en se basant particulièrement sur la morphologie de la gousse : taille, nombre de spires et forme des épines. Heyn (1963), les a classées en trois variétés : *Medicago truncatula* var. *truncatula*, *Medicago truncatula* var. *longispina* et *Medicago truncatula* var. *tricycla*.

C'est une espèce diploïde ( $2n=16$ ), autogame, très proche de la luzerne cultivée (*Medicago sativa*), avec un très petit génome de 500-550 (Mpb), c'est-à-dire 03 fois à 04 fois supérieur à celui l'*Arabidopsis thalianae* qui valent à celui du riz. Le *M. truncatula* produit des graines en abondance avec un temps de génération de 10 à 12 semaines (de graine à graine). C'est également une plante apte à la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (Chabaud *et al.*, 2003) et à la régénération par embryogenèse somatique (Thomas *et al.*, 1992 ; Chabaud *et al.*, 1996). Selon Lesins et Lesins (1979), *M. truncatula* a un cycle de vie court qui varie de 2 à 3 mois (figure 6). C'est une espèce prolifique puisque chaque plante produit 500 à 1000 graines. Elle peut être également multipliée aisément par bouturage.

### 3.2. Position systématique

Règne : *Plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille : *Papilionoideae*

Tribu : *Trifolieae*

Genre : *Medicago*

Espèce : *Medicago truncatula*

### **3.3. Aire de répartition**

Selon Heyn (1963), Lesins et Lesins (1979), *M. truncatula* serait présent au Portugal, en Espagne, en Corse, en Sardaigne, en Italie, en Yougoslavie, en Grèce et au niveau de ses Archipels, en Turquie, à Chypre, en Syrie, au Liban, en Palestine, à l'île de Madère (Portugal), aux îles Canaries, au Maroc, en Algérie, en Tunisie, en Egypte et dans la région du Caucase. *M. truncatula* est considéré comme étant une plante adventice dans une partie du centre et du nord de l'Europe.

Tutin *et al.*, (1968), pour leur part, ont noté que son aire de présence est la région méditerranéenne avec des foyers dans l'Ouest de la France et au Portugal. Jafri et El Gadi (1980) ont également signalé qu'il a une distribution méditerranéenne en plus d'une présence dans les régions saharo-arabes jusqu'en Syrie.

Quezel et Santa (1962) ont rencontré l'espèce sur les sables maritimes et de l'intérieur et dans le tell. Selon Adem (1974), *M. truncatula* aurait été trouvé dans les zones assez arides notamment les zones steppiques. Enfin, Nègre (1956) a déclaré que *M. truncatula* est une espèce commune dans le Maghreb et possède une large répartition en Algérie. Ce qui explique qu'elle ait été prospectée dans toutes les zones agroclimatiques du territoire national (Abdelguerfi *et al.*, 1988).

**Tableau 3.** Distribution des populations de *M. truncatula* collectées dans différents pays et composant les collections mondiales existantes. (Source : *Medicago truncatula* handbook, version Novembre 2006).

Pays	<i>M.truncatula</i>
Algérie	755
Tunisie	951
Maroc	909
Lybie	413
Egypte	2
Jordanie	38
Israël	296
Iran	3
Syrie	3
Türk	50
Cyprès	424
Malta	6
Grèce	355
Italie	292
France	142
Spain	226
Portugal	110
Canarie & Médira	13
Turkménistan et Azerbaïdjan	3
Russie	1
Est de l'Europe	7
Éthiopie	1
Amérique	3
Australie	612
Sud d'Afrique	17
Total	5632

### 3.4. *M. truncatula* plante modèle

Les légumineuses ont des caractéristiques génétiques (taille et complexité du génome) et biologiques (difficulté à la transformation par *Agrobacterium*) qui les ont rendues difficiles à étudier et à améliorer. Pour contourner ces limitations, *Lotus japonicus* et *Medicago truncatula* ont été sélectionnés comme plantes modèles pour représenter respectivement les légumineuses dont les nodosités ont une croissance déterminée (comme le soja ou le haricot) et indéterminée (comme le pois ou la luzerne) (Popp et Ott, 2011). La capacité de *Medicago truncatula* à former des nodosités à croissance indéterminée fait d'ailleurs de cette plante un modèle de la biologie du développement végétal, notamment pour l'étude des fonctions méristématiques (Holmes *et al.*, 2008).

*Medicago truncatula* présente des caractéristiques permettant et facilitant les analyses génétiques et moléculaires : autogamie, faible niveau de ploïdie, génome de petite taille, temps de génération graine à graine est relativement court (10 à 12 semaines), aptitude à la culture en laboratoire, répond au greffage, à l'embryogénèse somatique et à la transgénération, transformation par *Agrobacterium tumefaciens*, ainsi qu'une bonne aptitude à entrer en symbiose avec *sinorhizobium* ou dans la symbiose endomycorhizienne (Denarie et Gamas, 2001) ; elle est également hôte pour un grand nombre d'agents pathogènes (bactéries, champignons et virus) qui attaquent les légumineuses cultivées (Tivoli *et al.*, 2006 ; Rose, 2008), ce qui lui donne une place centrale dans l'étude des relations croisées entre parasitisme et mutualisme. De plus *M. truncatula* présente une grande syntonie avec certaines légumineuses cultivées tels que le trèfle (Gimeno, 2009), le Pois (Kaléet *al.*, 2004), la luzerne pérenne (Zhu *et al.*, 2005) et la lentille (Phan *et al.*, 2007).

Grâce à cette plante modèle toutes les informations acquises peuvent être transférées vers ces légumineuses. Alors ces atouts sont mis à profit pour des études de génomique fonctionnelle et structurale dans le but d'identifier les gènes d'intérêt agronomique, en plus des études des interactions légumineuses et agents pathogènes et les interactions symbiotiques (Ameline-Torregrosa *et al.*, 2008).

### 3.5. Intérêt biologique

Selon Lesins et Lesins (1979), *M. truncatula* a un cycle de vie court qui varie de 2 à 3 mois. C'est une espèce prolifique puisque chaque plante produit 500 à 1000 graines. Elle peut être également multipliée aisément par bouturage. Cette espèce possède un habitat variable. Elle prédomine au niveau des stations sèches, des sols lourds, marneux ou argileux. Comme toutes les légumineuses sa principale caractéristique biologique est la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique.

L'intérêt fut focalisé sur *M. truncatula* comme système pour examiner la grande richesse de production de métabolites secondaires par les légumineuses (Gepts *et al.*, 2005) et la résistance aux maladies (Frugoli et Harris, 2001). Cette plante est aussi largement étudiée pour analyser le déterminisme des symbioses endomycorhiziennes lui permettant de prélever le phosphore du sol (Journet *et al.*, 2001).

### 3.6. Intérêt agronomique

Les *Medicago* annuelles, par leur richesse en protéine, peuvent contribuer, d'une manière significative, à améliorer le régime alimentaire humain et animal. La production de métabolites secondaires spécifiques tels que (les flavonoïdes, les acides phénoliques, les terpénoïdes, les alcaloïdes...) impliqués dans la signalisation symbiotique, dans les réactions de défense, présentent un intérêt pharmaceutique (Dixon, 2004). D'autres classes de métabolites secondaires sont utilisés comme anti herbivore (Papadopoulou *et al.*, 1999), l'introduction de ces substances allelopathiques dans la gestion de l'agriculture réduit l'utilisation des herbicides (Waller *et al.*, 1993). On peut utiliser certains métabolites dans le domaine de l'agriculture pour avoir des cultures bio, anti-microbe (Broeckling *et al.*, 2004), anti-insecte (Tava *et Odoardi*, 1996).

Elles possèdent un intérêt agronomique majeur pour la production fourragère en zone sèche et pour la suppression ou la diminution de l'épandage d'engrais azotés. Leur intérêt est étroitement lié à leur capacité à se ressemer naturellement d'une année à une autre. Cette propriété peut aboutir à une installation pérenne adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes diminuant ainsi le phénomène d'érosion des sols. Par ailleurs, de nombreuses espèces et sous-espèces de *Medicago* présentent aussi des caractères d'intérêt agronomique, qu'il serait souhaitable d'introduire dans la luzerne cultivée, tels que la tolérance au pâturage (capacité d'enracinement et de repousse), la résistance à la sécheresse, à la salinité et aux maladies.

### 3.7. Intérêt génétique

*M. truncatula* est une plante apte à la transformation par *Agrobacterium tumefaciens* (Chabaud *et al.*, 2003) et à la régénération par embryogenèse somatique (Thomas *et al.*, 1992; Chabaud *et al.*, 1996). Elle forme de petites graines permettant leur culture dans des tubes à essais. Le partenaire bactérien de cette plante modèle est le plus étudié parmi les bactéries rhizobiales et le séquençage du génome de la souche de référence de *S. meliloti* 1021 a été achevé (Capela *et al.*, 2001). *M. truncatula* a permis d'identifier un grand nombre de gènes reliés à la symbiose dont certains ont déjà été isolés, séquencés et leur expression étudiée (Gamas *et al.*, 1996; Ane *et al.*, 2002; Amor *et al.*, 2003; Lévy *et al.*, 2004).

## 4. Diversité génétique

La biodiversité a été remarquée dès l'Antiquité. Lorsqu'on observe le monde vivant, on constate que les êtres sont différents les uns des autres (Gouyon, 1994).

Le terme diversité biologique signifie la variabilité des organismes de toute origine y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie ; cela comprend la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes (Extraits de la Convention sur la diversité biologique (PNUE, 5 juin 1992) ; Cela inclut la diversité au sein des espèces et entre espèces ainsi que celle des écosystèmes. La biodiversité couvre les trois niveaux d'organisation biologique : génétique, taxonomique et écologique. Elle comprend aussi les relations et interactions existant à l'intérieur et entre ces trois niveaux hiérarchiques.

La biodiversité est dynamique : la composition génétique des espèces change au cours du temps en réponse aux pressions de la sélection naturelle et humaine ; la présence et l'abondance relative d'espèces dans les communautés écologiques sont modifiées sous l'effet de facteurs physiques et écologiques.

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). C'est la diversité intraspécifique (polymorphisme génétique) qui représente le potentiel et la capacité à répondre aux changements environnementaux, à la fois sur le court terme (faculté d'adaptation) et sur le long terme (potentiel d'évolution). La richesse des espèces est la mesure d'évaluation de la biodiversité la plus largement utilisée (Lewin, 1992).

### **5. Marqueurs génétiques**

Selon De vienne (1998) un marqueur génétique est un marqueur polymorphe qui renseigne sur : le génotype de l'individu qui le porte (en génétique des populations), le génotype d'un (de) locus voisin(s) (les applications vont ici du clonage positionnel à la sélection assistée par marqueurs).

Les plus courants de ces marqueurs génétiques sont, selon une terminologie consacrée, les marqueurs morphologiques, les marqueurs moléculaires (au niveau de l'ADN) et les marqueurs biochimiques (isozymes, protéines). Toutefois, le terme de marqueur biochimique peut également désigner selon le contexte un stade de différenciation ou un état physiologique.

### 5.1. Caractéristiques d'un bon marqueur

Selon De vienne (1998) un marqueur génétique "idéal" doit être polymorphe (la matière première du généticien est la variabilité), multiallélique : c'est-à-dire possédant plusieurs allèles (donc des séquences d'ADN différentes) sur un même locus (Plomion, 2003); codominant : l'hétérozygote présente simultanément les caractères des deux parents homozygotes, il peut être distingué de chacun des homozygotes parentaux ; non épistasique (son génotype peut être "lu" à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus) ; neutre : les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques (et donc éventuellement sélectifs) que ceux qui permettent de déterminer son génotype et insensible au milieu : le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu.

### 5.2. 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).

### 5.3. Marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (Harry, 2001). Les isoenzymes présentent un polymorphisme basé sur des différents poids moléculaires de protéines ayant une activité enzymatique, généralement codominants, ils sont les produits de différents allèles d'un ou de plusieurs gènes. Isoenzymes ont un faible niveau de polymorphisme et dépend souvent de stade de développement physiologique de la plante (Tanksley et Orton, 1983).

La diversité génétique d'espèces annuelles de pois chiche a été étudiée par (Labadi *et al.*, 1996) à l'aide de marqueurs enzymatiques. Ces marqueurs ont également été utilisés en combinaison avec des marqueurs morphologiques pour comparer la structuration de la diversité génétique chez *M. sativa* (Jenczewski *et al.*, 1999).

Le faible niveau de polymorphisme révélé par les marqueurs biochimiques et sa variabilité en fonction des conditions environnementales, il est souvent nécessaire d'utiliser les marqueurs moléculaires pour compléter l'évaluation et l'étiquetage des ressources génétiques.

#### **5.4. Marqueurs moléculaires**

Les marqueurs moléculaires sont constitués de séquences d'ADN caractéristiques d'un individu ou groupe d'individus. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et biochimiques), ils ne sont pas influencés par l'environnement et sont observable à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe. Directement issus du polymorphisme existant au niveau d'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans le programme d'amélioration des plantes.

Parmi les marqueurs moléculaires : les marqueurs pouvant être révélés en grand nombre (AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism ; RAPD : Randomly Amplified polymorphism DNA ; ISSR : Inter Simple Sequence Repeat) ne requièrent pas d'information préalable sur les génomes, sont nombreux mais peu informatifs car dominant et difficilement transposable d'un croisement à un autre ou d'une espèce à une autre. Tandis que les marqueurs spécifiques du locus (RFLP : Restriction fragment length polymorphism ; microsatellites SSR : Simple Sequence Repeats ; STS : Sequence Tagged site ; SNP : Single Nucleotide Polymorphism), sont révélés individuellement, coûteux à mettre au point mais très informatifs, ils sont généralement codominants et transposables entre croisements et espèce proche (Julier et Barre, 2005).

##### **5.4.1. Microsatellites**

Les microsatellites sont généralement utilisés pour de nombreux projets génétiques en raison de leur grande reproductibilité et de la facilité d'identifier des allèles.

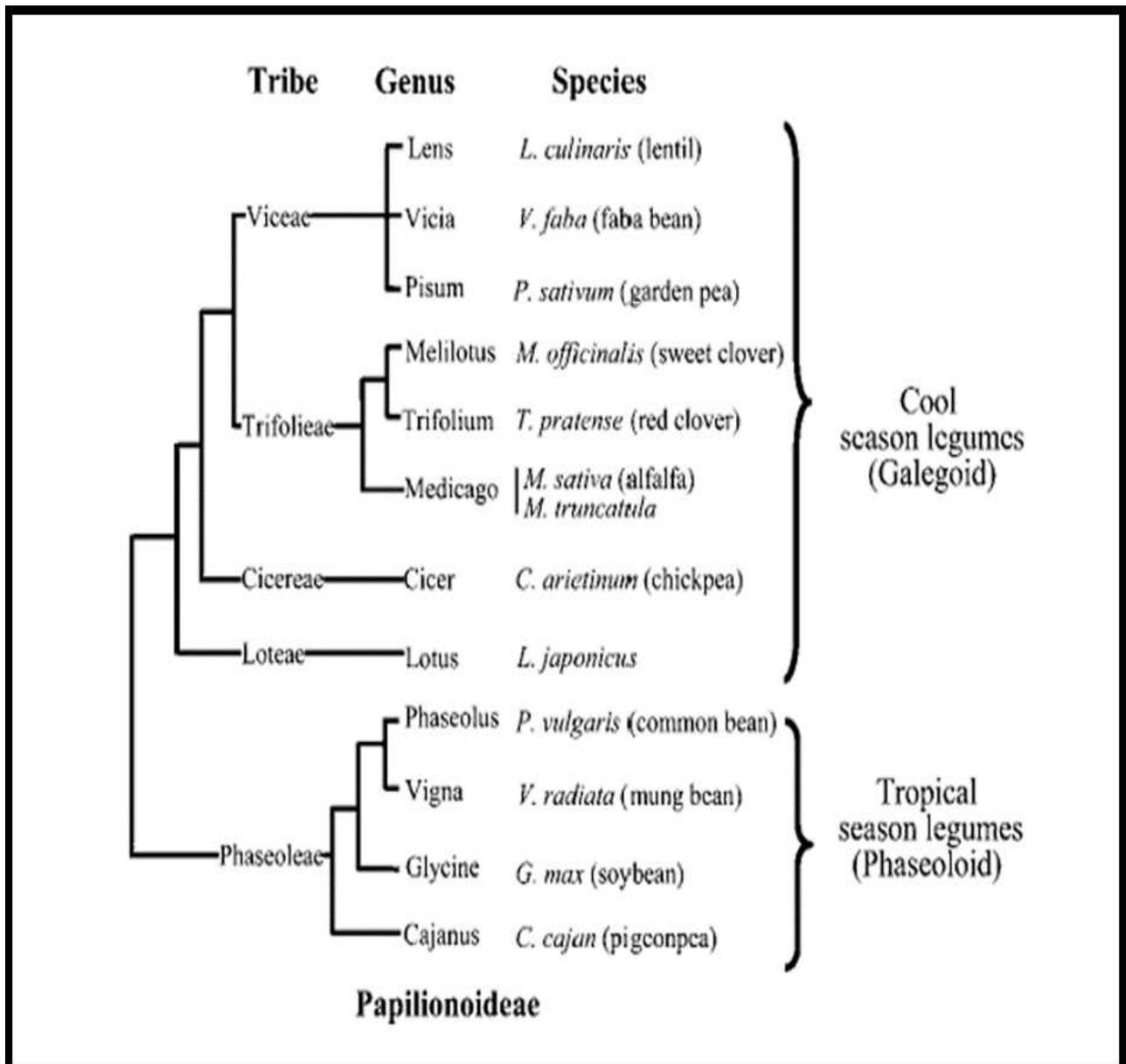
Les microsatellites ou SSR sont polymorphes constitués de séquences répétées en tandem (1-6 bp). La variation du nombre de répétitions du motif de base qui émane des erreurs survenues lors de la réplication d'ADN (Jarne et Lagoda, 1996), ce qui constitue la base du polymorphisme. Leur distribution sur l'ensemble du génome, ce qui fait l'intérêt des microsatellites en génétique c'est leur polymorphisme extrêmement élevé. Ce polymorphisme ne réside pas dans la séquence proprement dite mais dans le nombre de répétitions de ces motifs simples (Decroocq, 2003). Il s'agit ici donc d'un polymorphisme de nombre d'unités.

Les SSR sont ``ubiquitaires` `chez les procaryotes et les eucaryotes et sont présents même dans les génomes bactériens les plus petits (Field and wills, 1996 ; Hancock, 1996). Ils peuvent être présents au niveau des séquences non codantes et aussi codantes. La technique SSR (Figure 7) se base sur l'amplification par PCR de l'ADN génomique moyennant des amorces spécifiques flanquant les séquences répétées et la séparation des amplifias par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les SSR se sont révélés des marqueurs moléculaires très utiles dans la sélection assistée par marqueurs, l'analyse de la diversité génétique et l'analyse de la génétique des populations chez plusieurs espèces (Gupta, 2000 ; Budak *et al.*, 2003). En plus, ce sont de marqueurs multialléliques d'où leur usage dans les études phylogénétiques et de l'évolution des espèces.

Chez les légumineuses, des marqueurs microsatellites ont été massivement mis au point chez *Medicago truncatula* et *Lotus japonicus*, deux espèces modèles des légumineuses, en utilisant des données de séquences produites dans des programmes de séquençages d'EST (fragment des gènes exprimés) ou d'ADN génomique. Dans le genre *Medicago* le nombre de marqueurs microsatellites disponibles dépasse le millier (Diwan *et al.*, 2000 ; Baquerizo-Audiot *et al.*, 2001; Eujayl *et al.*, 2004 ; Chu *et al.*, 2009). Mun *et al.*, (2006) ont trouvé que sur 1236 microsatellites testés sur l'espèce *M. truncatula* les motifs (AT)<sub>n</sub>, (AG)<sub>n</sub> et (AAT)<sub>n</sub> étaient ceux qui révélaient une plus grande diversité allélique.

Mun *et al.*, (2006) ont classé les microsatellites en deux catégories selon leurs longueurs, la classe I était supérieure ou égale à 20 paires de bases (pb), la seconde avait une taille comprise entre 12 et 19 pb. Il explique cela par la corrélation positive entre le taux de mutation et la longueur des SSR (Ellegren, 2004 in Mun *et al.*, 2006). Les SSR dont la taille est supérieure à 20 pb sont fortement sujets aux mutations (Temnykh *et al.*, 2001 in Mun *et al.*, 2006) tandis que les microsatellites dont la taille est comprise entre 12 et 19 pb sont modérément sujets aux mutations (Pupko et Graur, 1999 in Mun *et al.*, 2006).



**Figure 1.** Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae

(Zhu et al., 2005).

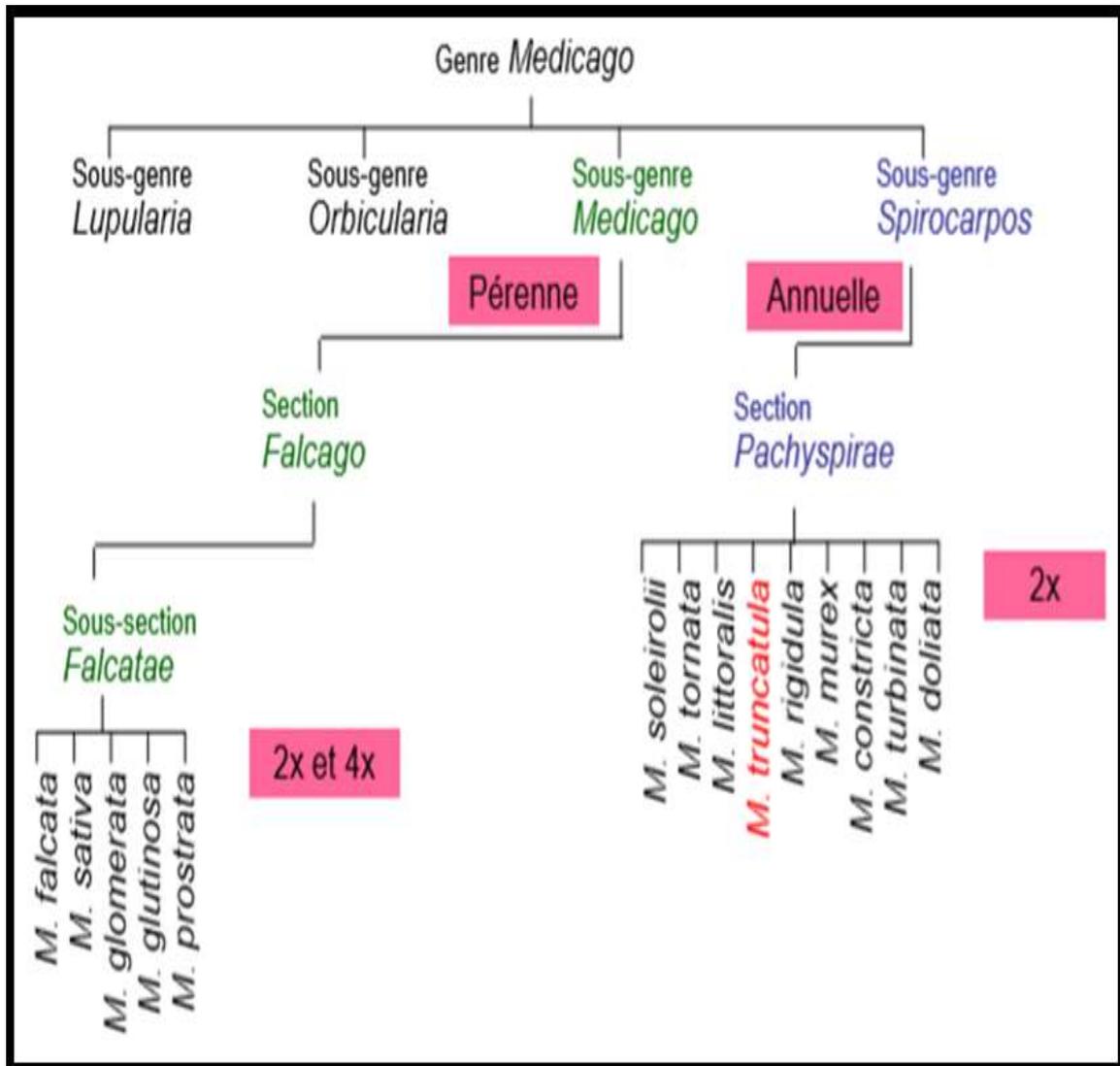
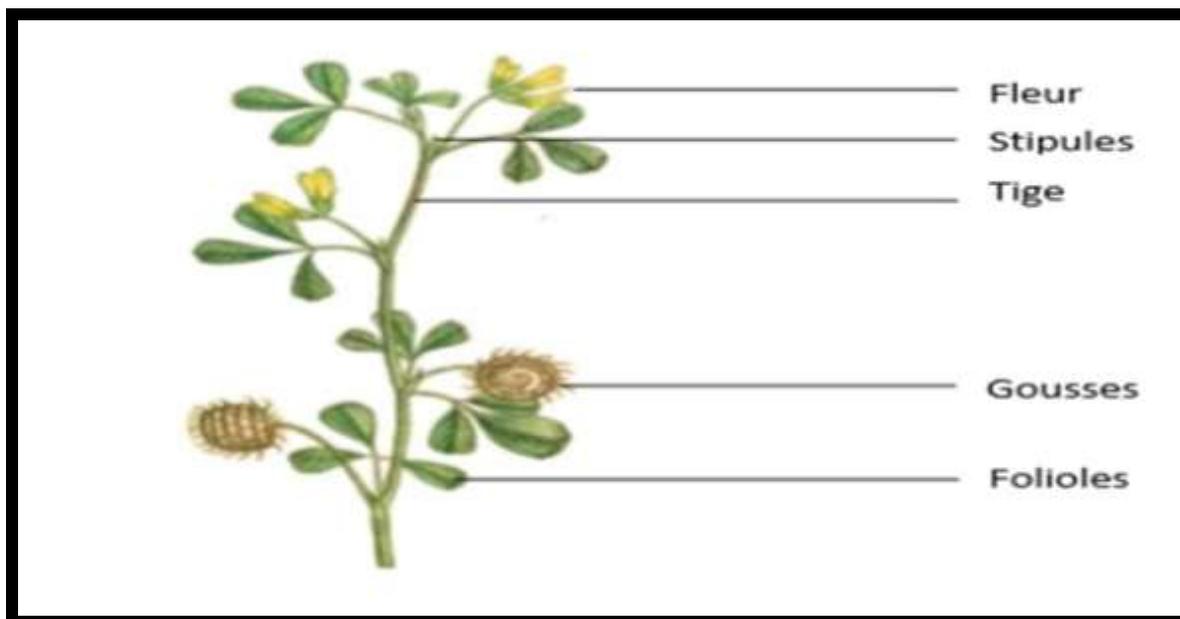
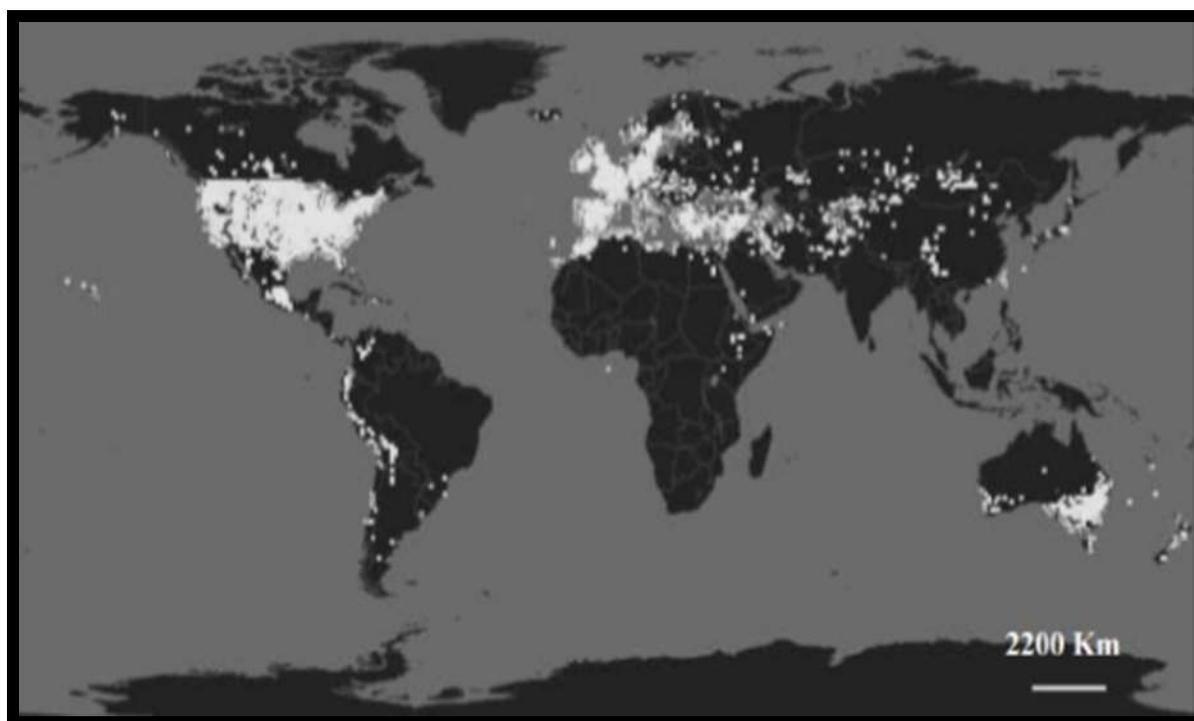


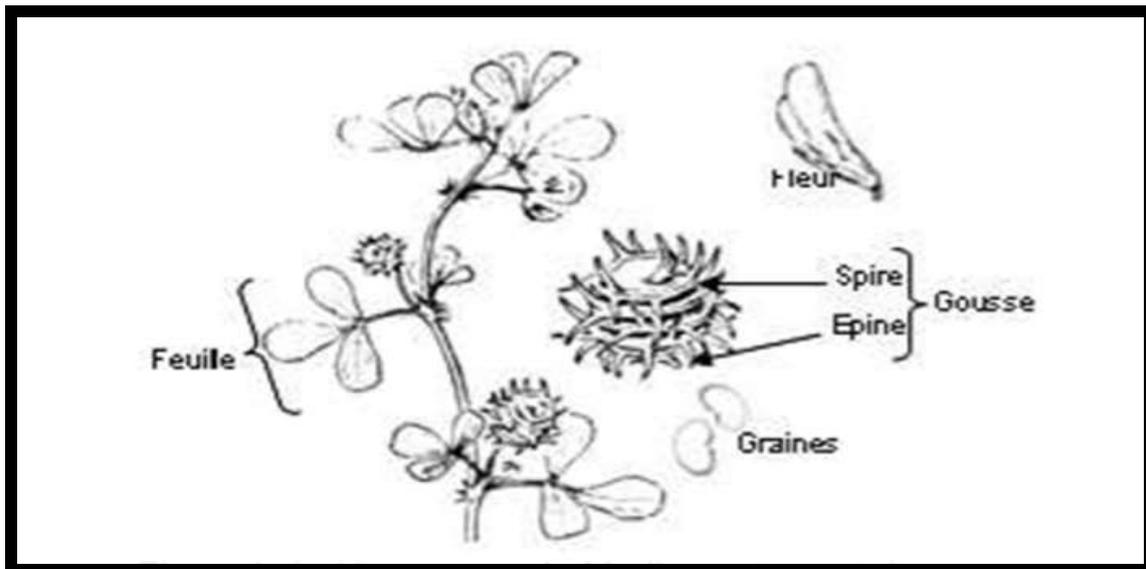
Figure 2. Taxonomie du genre *Medicago* (Pierre, 2008).



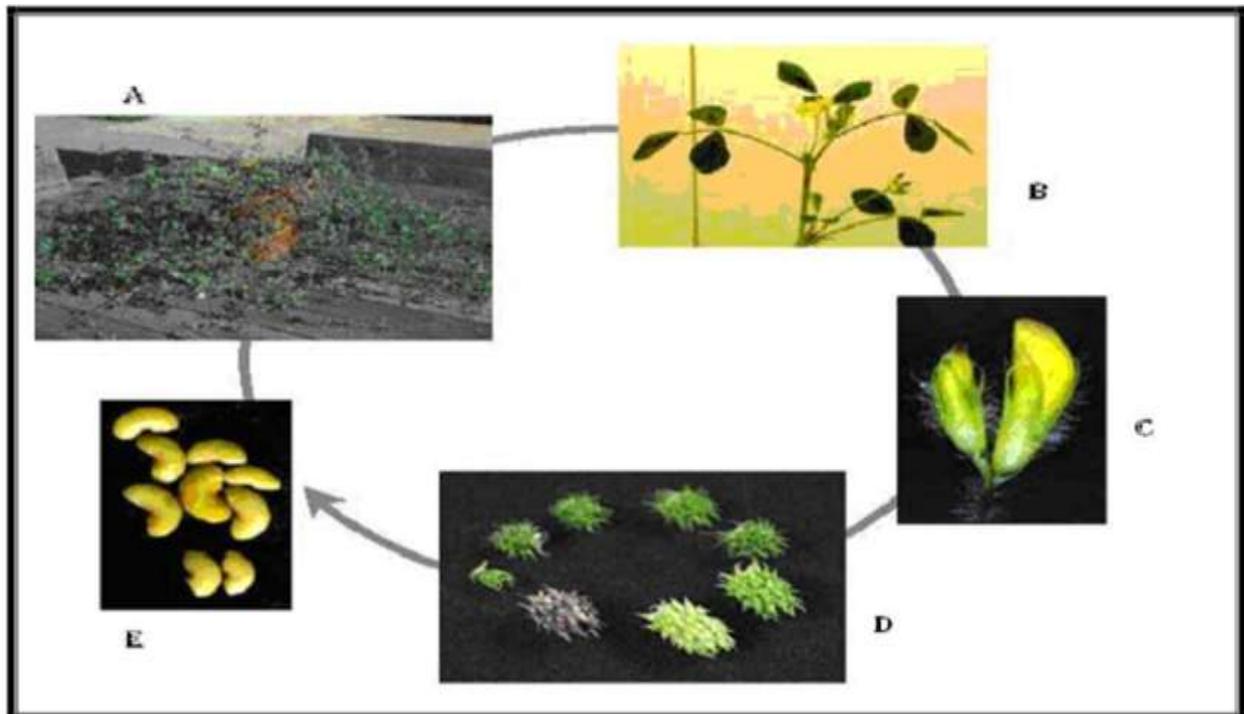
**Figure 3.** les différentes parties du *Medicago truncatula* (Ramakrishna et al., 2006)



**Figure 4.** Carte géographique de la distribution de *Medicago* dans le monde (Halimi, 2010)

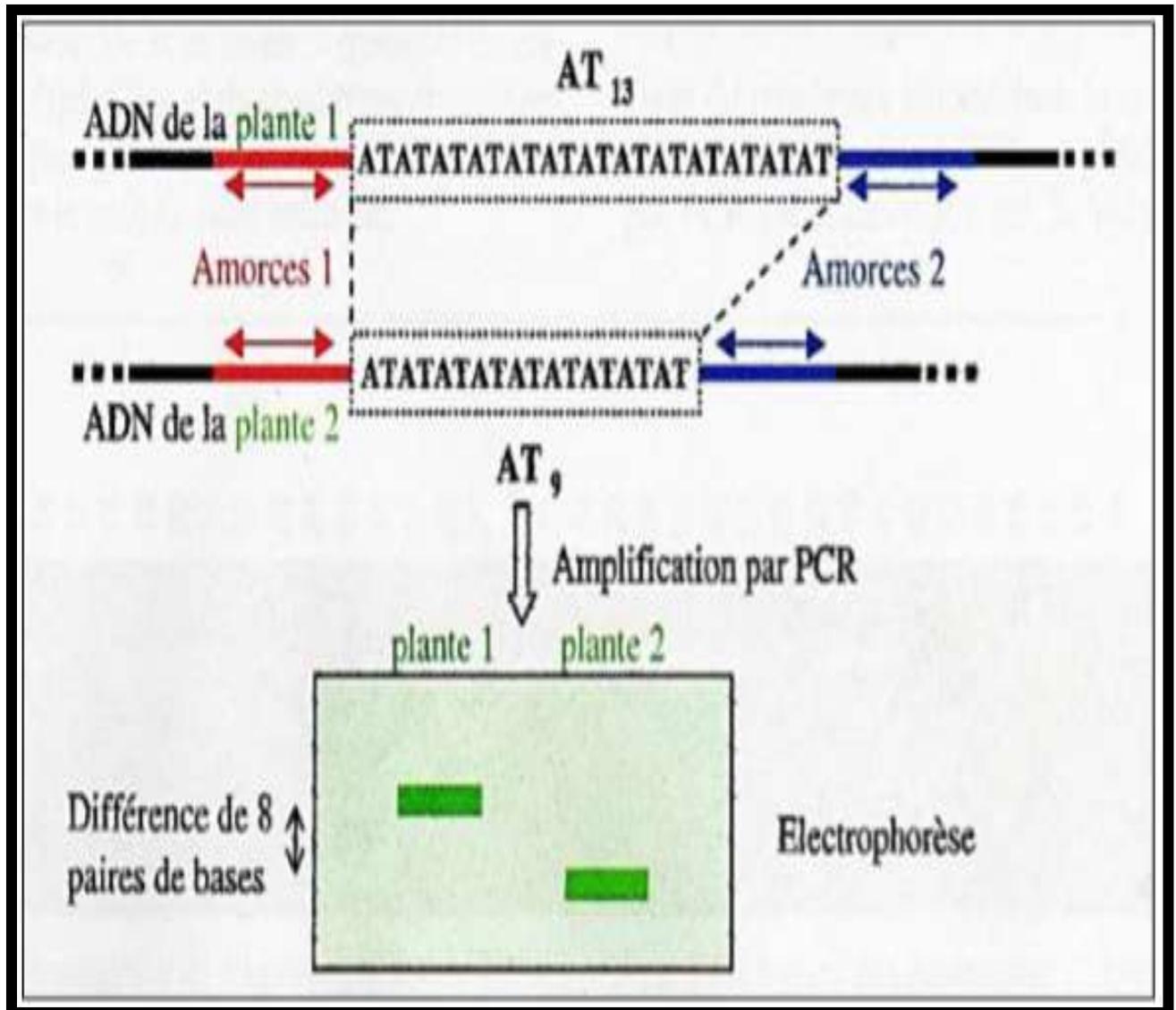


**Figure 5.** Un rameau de *Medicago truncatula* ; fleur, gousse, graines (Hippolyte, 1906 modifié)



**Figure 6.** Le cycle de vie de la plante modèle *Medicago truncatula* (Delalande *et al.*, 2007)

A : stade plante .B: stade feuille. C : stade fleur. D : stade gousse. E : stade graine



**Figure 7.** La détection d'un polymorphisme de répétition (SSR) (Moulet et *al.*, 2008)

# Matériel et Méthodes

Ce chapitre est consacré à la description du matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude.

### 1. Matériel végétal

Notre étude vise à estimer le niveau de la diversité génétique existant au sein de l'espèce *M. truncatula* appartenant au genre *Medicago L.*, mettant en évidence des polymorphismes des caractères biométriques et moléculaires. Pour cela, nous avons analysé des graines matures de 29 accessions de cette espèce qui ont été collectées dans 29 sites éco-géographiques différents dans le Nord Algérien (figure 8), durant la période de 15 Mai au 15 Juillet 2013 par Mme Medoukali I.

Cette collection couvre un large éventail des stades bioclimatiques allant de l'humide jusqu'à l'aride et subissent des contraintes abiotiques diverses (Tableau 4).



**Figure 8.** Localités géographiques des 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* dans le Nord Algérien

**Tableau 4.** Origines géographiques des 29 accessions étudiées, avec les paramètres éco-géographiques correspondants

N°	REGION	PROVENANCE	ALT	LAT	LON	Pm	Tm	TM	CLIMAT
Mt1	Mila	Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E	568	2,5	31,3	HH
Mt2	Mila	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	742	4,4	31,1	HH
Mt3	Constantine	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E	704	3,2	31,4	SH
Mt4	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E	558	3	32,2	SH
Mt5	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624	3,3	32	SH
Mt6	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E	462	0,4	31,3	HH
Mt7	Oum Bouaghi	Ouled Hemla	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E	454	1,9	31,7	HH
Mt8	Oum Bouaghi	Ain Fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E	492	0,4	30,8	HH
Mt9	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E	626	8,4	30,1	HH
Mt10	Bourdj bouarriridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E	368	1,6	33,4	SH
Mt11	Bourdj bouarriridj	Mansoura	504	36°11'48,42"N	4°27'00,50"E	409	3,1	32,6	SH
Mt12	Bourdj bouarriridj	air lac ain zada 2000 m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E	495	0,2	31,1	SH
Mt13	Bourdj bouarriridj	-	984	36°04'21,92"N	4°38'52,93"E	420	1,2	33,1	SH
Mt14	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E	506	0,2	30,9	H
Mt15	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E	711	5,9	31,9	H
Mt16	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E	670	7,6	29,8	H
Mt17	Alger	Ben Aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E	762	6,9	28,4	HH
Mt18	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	791	7	30,9	HH
Mt19	Ain Defla	1	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E	593	6	33,5	H
Mt20	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	593	6	33,5	H
Mt21	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E	405	6,6	32,6	H
Mt22	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O	368	7,5	29	SS
Mt23	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	736	2,5	30,6	SH
Mt24	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E	609	1,1	30,1	SH
Mt25	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E	564	1,9	32,1	H
Mt26	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E	482	1	31,3	H
Mt27	Sétif	Centre-ville	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E	473	0,3	31,7	H
Mt28	Batna	-	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N	335	0,7	32,6	HH
Mt29	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O	383	8,2	26,6	H

ALT : Altitude, LAT : Latitude, LON : Longitude, Pm : La pluviométrie moyenne ; Tm : La température minimale du mois le plus froid ; TM : La température maximale, HH : Hyper-humide, H : Humide, SH : Subhumide, SS : Semi sec.

## 2. Méthodes d'étude

### 2.1. Analyse morphologique

Le totale de 24 accessions de *M. truncatula* ont été évaluées par des mesures morphologiques à l'aide d'un cadran-micromètre avec une précision de 0,01 mm.

Pour chaque accession, douze caractères quantitatifs liés aux graines, aux gousses et aux cotylédons décrits par Issolah et Abdelguerfi (1999) ont été analysés :

- Taille des gousses : longueur (LP), largeur (WP)
- Nombre de graines par gousse (SP)
- Taille des graines : longueur (LS), largeur (WS).
- Poids de 30 gousses (WTP).
- Poids de mille graines (WTS) et le rapport poids des graines / poids des gousses (RW).
- Caractéristiques des semis : date d'émergence des cotylédons (DCOT), longueur de la première feuille (LFL), largeur de la première feuille (BFL) et aire de la première feuille ( $AFL = LFL * BFL$ ). Le DCOT a été mesuré à partir du moment où les semis ont été placés sous la lumière. La LFL, la BFL et l'AFL ont été mesurées après six jours de germination.

### 2.2. Analyse moléculaire

Dans cette analyse nous avons déterminé la diversité génétique des 28 accessions de l'espèce *M. truncatula* du genre *Medicago L.* par utilisation de deux marqueurs SSR (Simple Sequence Repeats) : **AFctt1** avec 17 à 198 pb et **AFct32** avec 25 à 166 pb.

#### 2.2.1. Préparation des échantillons

Les graines matures de chaque individu ont été extraites des gousses, scarifiées, stérilisées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 3% (v/v) et imbibées pendant une nuit. Les grains stériles étaient germés (protocole de germination disponible en annexe 1) dans l'obscurité pendant 2 jours dans des boîtes de Pétri contenant 1% d'eau-agar (w/v) à une température ambiante, puis maintenue à la lumière du jour pendant 10 jours. Les jeunes

feuilles de chaque échantillon (0,3g) ont été broyées en une poudre très fine à l'aide de l'azote liquide et congelés à -20 ° C pour extraction d'ADN.

### 2.2.2. Analyse SSR

L'ADN génomique total a été isolé selon un protocole (Annexe 2) de bromure de cetyl tri méthyl ammonium (CTAB) décrit par Doyle et Doyle (1990).

La qualité de l'ADN a été testée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8% (Annexe 3). Après avoir mesuré la concentration d'ADN avec NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), les échantillons ont été dilués à 50 ng / µl pour l'amplification par PCR.

Un nombre de cinq paires d'amorces SSR ont été criblées et sur la base de ces données préliminaires, deux amorces SSR ont été sélectionnées en fonction de la qualité de l'amplification des fragments (tableau 5).

**Tableau 5.** Séquences et groupe de liaison de cinq amorces de microsatellites testées.

Primer	Linkage group	Motif	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
AFctt1*	4	(CTT) <sub>9</sub> (CAA) <sub>3</sub>	CCCATCATCAACATTTTCA	TTGTGGATTGGAACGAGT
AFct11	7	(CT) <sub>12</sub>	GGACAGAGCAAAGAACAAT	TTGTGTGGAAAGAATAGGAA
AFct32*	3	(CT) <sub>14</sub>	TTTTTGTCCCACCTCATTAG	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC
AFca1	4	(CT) <sub>4</sub> (CA) <sub>10</sub>	CGTATCAATATCGGGCAG	TGTTATCAGAGAGAGAAAGCG
AFca11	6	(CA) <sub>11</sub>	CTTGAGGGAACCTATTGTTGAGT	AACGTTTCCCAAACATACTT

\*Amorces utilisé dans cette étude.

### 2.2.3. Amplification in vitro de l'ADN par PCR

#### a) Principe

La technique PCR ou polymérase chain reaction a été mise au point en 1985 par Kary Mullis. C'est une méthode qui permet d'amplifier in vitro un segment d'ADN double brin, compris entre deux régions de séquences connues, en des millions de copies. L'amplification est assurée par la polymérase de bactérie thermophile des sources chaudes *Thermus aquaticus* (Taq polymérase), par un procédé d'extension de deux amorces oligonucléotidiques complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN. Ces amorces encadrent la séquence à amplifier, l'une avec le brin sens et l'autre avec le brin anti sens.

Cette amplification comprend 03 phases :

- Une phase de dénaturation de l'ADN double brin à 95°C. elle permet de séparer les deux chaînes complémentaires en ADN simple brin qui vont servir de modèle à la synthèse de nouveaux brins.
- Phase d'hybridation généralement 2 à 60 secondes à 56-64 °C permet aux amorces sens et anti-sens de se fixer sur les monobrans d'ADN grâce à une température qui leur est thermodynamiquement favorable. Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.
- Phase d'élongation s'effectue à une température de 72°C par la taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces dans le sens 5'p vers 3'OH d'une séquence complémentaire du brin recopier en y incorporant les désoxyribonucléiques triphosphates ( dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

La PCR nécessite une étape de dénaturation dite initiale avant de commencer les cycles, une étape de chauffage généralement 10 à 15 minutes à 95 °C qui permet de dénaturer les ADN double brin, de casser les structures secondaires, d'homogénéiser le milieu réactionnel par agitation thermique, d'activer les polymérases de type « Hot start », de dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution (Transcriptase Inverse, Uracil-N-Glycosylase).

#### **b) Condition d'amplification**

L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 3 µl d'ADN génomique (50 ng/µl) comme matrice, 2,4 µl de mélange dNTP contenant 2,5 mM de chacun des quatre nucléotides, 3 µl de tampon de réaction 10 x, 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1,8 µl de chaque amorce sens et inverse SSR (10 µM) et 0,3 µl d'ADN polymérase Taq Thermo Scientific (2,5 U).

Les conditions de PCR consistaient en une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 min, suivie de 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 45 s, hybridation à 55 °C pendant 45 s et élongation à 72 °C pendant 1 min, avec une étape d'élongation finale de 72 °C pendant 10 min.

### **c) Test d'amplification**

Les produits d'amplification ont été résolus sur un gel de polyacrylamide non dénaturant à 8% (10 µl par puit), en utilisant un rapport acrylamide / bis-acrylamide de 29 : 1 et un tampon TBE 0,5X. (Annexe 4).

Un marqueur de taille (DNA Ladder) a été aussi déposé dans le gel. Il permet d'évaluer la taille des fragments d'ADN amplifiés.

L'électrophorèse a été effectuée à une tension constante de 175 V pendant environ 2 h 30 min à 4 ° C et a été révélée dans une solution de bromure d'éthidium pendant 5 min.

### **2.3. Analyse statistique**

Les caractéristiques morphologiques ont été analysées à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP), la moyenne, l'écart type (s.d.) et le coefficient de variation (CV) des caractères morphologiques pour les 29 accessions ont été calculés.

La corrélation entre la variabilité morphologique et le bioclimat a été examinée par une autre ACP comprenant les paramètres écologiques les plus importants (Alt., Pm, Tm, TM et Q2).

Les profils électrophorétiques sont comparés après lecture de la mobilité des bandes obtenues. Toutes les analyses ont été évaluées en élaborant une matrice de similarité par paire et les distances génétiques ont été calculées en utilisant l'indice de Jaccard (Jaccard, 1908). A partir des distances génétiques calculées, une classification hiérarchique en UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) a été élaborée moyennant le logiciel Xlstat 2014.5.03 programme (Addinsoft ,2007).

# Résultats et discussion

Notre travail vise à étudier la diversité génétique de 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* par les marqueurs morphologiques (caractères biométriques) et moléculaires (microsatellites). Pour cela nous avons utilisé les méthodes moléculaires fondées sur l'amplification in vitro de fragments d'ADN spécifiques par la technique PCR et sur la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

### **1. Analyse de la diversité morphologique**

Une analyse en composante principale a été mise en évidence pour comparer les caractères biométriques des 24 accessions. La corrélation entre la variabilité morphologique et le bioclimat a été examinée par une autre ACP, comprenant les paramètres écologiques les plus importants (Alt., Pm, Tm, TM et Q2).

Cette étude a montré une relative dissemblance entre les paramètres biométriques des 24 accessions sous l'influence des facteurs environnementaux et climatiques et l'identification des critères morphologiques les plus discriminants. (Tableau 6).

**Tableau 6.** Données descriptives des caractères morphologiques et des paramètres écologiques des 24 populations de *M. truncatula*

N	Accessions	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LFL	BFL	AFL	Alt	Pm	Tm	TM	Q2
1	Mt1	5,68	6,83	1,86	4	3,41	1,76	4,04	2,03	1	6,01	2,81	16,89	795	454	1,9	31,7	52,26
2	Mt2	5,35	5,90	1,46	5	3,53	1,78	3,76	2,58	1	7,54	2,43	18,32	1010	492	0,4	30,8	55,51
3	Mt3	3,83	5,27	0,85	4	2,82	1,51	2,18	2,56	1	6,76	3,21	21,70	883	462	0,4	31,3	51,28
4	Mt5	6,25	6,35	2,15	6	3,48	1,81	4,56	2,12	2	9,02	3,96	35,72	257	593	6	33,5	73,96
5	Mt6	5,50	6,69	1,81	6	3,32	1,93	3,71	2,05	2	6,08	2,68	16,29	537	506	0,2	30,9	56,53
6	Mt8	4,88	5,53	1,26	1	2,80	1,44	3,19	2,53	1	5,19	2,35	12,20	850	558	3	32,2	65,55
7	Mt9	6,38	6,54	2,73	5	3,68	1,83	4,96	1,82	3	7,34	2,86	20,99	429	704	3,2	31,4	85,63
8	Mt10	5,41	6,02	2,06	4	3,25	1,63	3,26	1,58	1	8,40	3,22	27,05	757	568	2,5	31,3	67,65
9	Mt11	5,47	5,66	2,20	5	3,39	1,77	3,98	1,81	1	7,38	2,67	19,70	831	742	4,4	31,1	95,32
10	Mt12	7,86	7,72	4,21	9	3,55	1,96	4,99	1,19	1	8,19	3,82	31,29	3	670	7,6	29,8	103,52
11	Mt13	7,02	7,27	3,33	7	3,61	1,85	4,78	1,44	3	8,64	3,47	29,98	172	762	6,9	28,4	121,57
12	Mt14	4,76	5,17	1,50	5	3,08	1,62	3,34	2,23	1	7,31	3,81	27,85	1022	482	1	31,3	54,56
13	Mt15	4,84	5,13	1,45	6	3,24	1,66	3,80	2,62	1	6,58	2,76	18,16	1089	473	0,3	31,7	51,67
14	Mt16	5,67	5,41	2,01	4	3,27	1,68	4,27	2,12	2	5,73	2,79	15,99	997	495	0,2	31,1	54,95
15	Mt17	5,47	5,67	1,75	5	3,24	1,65	3,68	2,10	2	7,01	2,12	14,86	907	368	1,6	33,4	39,69
16	Mt18	7,48	6,64	4,84	5	4,04	1,99	5,66	1,17	2	7,91	3,55	28,08	504	409	3,1	32,6	47,55
17	Mt20	6,54	7,46	4,95	6	3,70	2,03	5,29	1,07	2	8,04	3,03	24,36	196	626	8,4	30,1	98,95
18	Mt21	6,89	7,39	2,73	6	3,75	2,03	4,94	1,81	2	9,06	3,74	33,88	385	736	2,5	30,6	89,84
19	Mt22	7,64	8,98	4,79	8	3,80	2,06	5,02	1,05	2	7,98	3,26	26,01	575	609	1,1	30,1	72,03
20	Mt23	8,23	10,23	5,54	6	4,14	2,14	6,53	1,18	2	10,17	4,00	40,68	281	368	7,5	29	58,71
21	Mt24	5,75	5,49	1,69	5	3,34	1,61	3,90	2,31	2	6,27	2,61	16,36	946	335	0,7	32,6	36,02
22	Mt25	8,55	8,21	5,52	7	3,79	1,97	5,11	0,93	1	10,58	3,07	32,48	70	791	7	30,9	113,52
23	Mt26	7,32	7,52	3,47	6	3,68	1,97	4,52	1,30	3	6,53	2,38	15,54	135	405	6,6	32,6	53,43
24	Mt27	6,77	6,44	2,20	6	3,31	1,68	3,91	1,78	1	7,48	3,23	24,16	798	564	1,9	32,1	64,06

D'après les résultats obtenus (tableau 7), la surface de la première feuille (AFL) s'est avérée être la caractéristique la plus variable avec une moyenne de 23.70 mm<sup>2</sup> et un coefficient de variation égale à 58.38 % d'où les valeurs les plus faibles étaient entre 12.20 mm<sup>2</sup> et 15.99 mm<sup>2</sup> noté chez Mt8, Mt17, Mt16 et Mt26, tandis que la valeur la plus élevée était de 40.68 mm<sup>2</sup> marqué chez Mt23. Suivi par LFL avec une moyenne de 7.55 mm, les plus longues feuilles ont été observées dans les régions à climat humide/subhumide par des valeurs comprises entre 10 mm et 8 mm chez Mt25, Mt21, Mt23, Mt5, Mt13, Mt12 et Mt20.

4 accessions étudiées présentent un SP de moyenne 5,47 et un coefficient de variation de 2,31 %. Le plus haut a été trouvé chez Mt22 et Mt12 des régions à pluviométrie élevée (8 et 9 graines par gousse respectivement) par contre le plus bas a été rapporté dans des régions à tendance bioclimatique hyper humide avec une valeur de 1 chez Mt8. Pour la longueur et la largeur des gousses, une valeur extrême de 8 mm et de 10 mm respectivement a été enregistrée chez Mt23, Mt25 avec une valeur de 3mm signalé chez Mt3.

Le poids de mille graines (WTS) des populations Algériennes de *M. truncatula* collecté oscillent entre 2 g et 5g. Les plus lourdes ont été constatées chez Mt18, Mt 20, Mt22 et Mt25 et les plus légères ont été observées chez Mt3. Les caractères restants présentaient une moyenne étroite qui ne dépassait pas 2. La moindre moyenne a été observée pour la date d'émergence des cotylédons (1.67 jours).

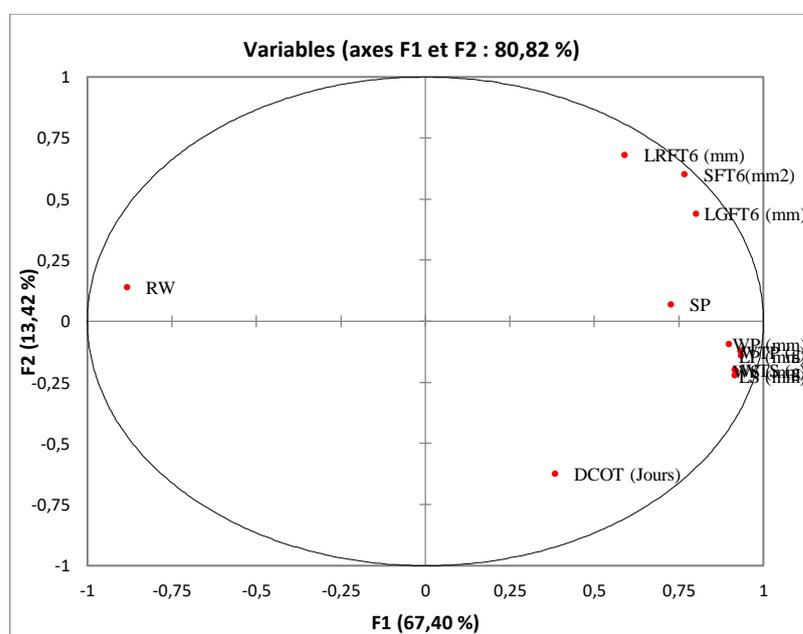
**Tableau 7.** Moyenne, écart type et coefficient de variation des 12 traits analysés pour les 24 accessions de *M.truncatula*.

Variable	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
LP (mm)	3,83	8,55	6,23	1,21	1,47
WP (mm)	5,13	10,23	6,65	1,28	1,64
WTP (g)	0,85	5,54	2,77	1,45	2,10
SP	1,33	9,00	5,47	1,52	2,31
LS (mm)	2,79	4,14	3,47	0,33	0,11
WS (mm)	1,44	2,14	1,81	0,19	0,04
WTS (g)	2,18	6,53	4,31	0,94	0,88
RW	0,92	2,62	1,81	0,54	0,29
DCOT (Jours)	1,00	3,00	1,67	0,70	0,49
LFL (mm)	5,19	10,58	7,55	1,34	1,80
BFL (mm)	2,12	4,00	3,08	0,55	0,30
AFL (mm <sup>2</sup> )	12,19	40,68	23,70	7,64	58,38

### 1.1. Analyse en composantes principales des caractères biométriques (ACP)

Une analyse en composantes principales a été effectuée sur les douze traits quantitatifs étudiés. L'analyse des résultats permet de constater que la majeure partie des informations est expliquée par les deux premiers axes factoriels. Dans le plan 1-2, les valeurs propres des deux composantes PC1 et PC2 et leur contribution à l'inertie totale sont représentées dans la figure 9. Les deux axes pris en considération pour décrire les corrélations entre les variables liées aux structures spatiales, détiennent à eux seuls 80,82 % de l'information totale avec respectivement 67,40 % pour l'axe 1 et 13,42 % pour l'axe 2. Les valeurs des composantes de chaque variable ont été projetées dans les deux premières composantes principales (PC1 et PC2).

La majorité des caractères qui sont relatifs aux : nombre de graines par gousse (SP), longueur (LP) et largeur (WP) des gousses, poids de 30 gousses (WTP), poids d'un millier de graines (WTS), longueur (LS) et largeur (WS) des graines, ainsi que la longueur (LFL) et l'aire de la première feuille (AFL), sont positivement corrélés à l'axe 1 et contribuent largement dans la variation totale et la formation de cet axe, à l'exception de RW qui est corrélé négativement. Tandis que, la deuxième composante principale est déterminée principalement et positivement par la largeur de la première feuille (BFL) et négativement par la date d'émergence des cotylédons (DCOT) qui intervient fortement dans l'explication de la variation totale.



**Figure 9.** Analyse en composantes principales de douze caractéristiques morphologiques.

## 1.2. Analyse des liaisons inter- caractères

La matrice de corrélation a révélé des corrélations significatives entre les différents caractères quantitatifs étudiés, à l'exception de RW, qui était négativement corrélée avec toutes les autres caractéristiques (Tableau 8). A titre d'exemple la longueur des gousses (LP) a présenté une corrélation positive hautement significative avec la largeur (WP) des gousses ( $r=0,859$ ), poids de 30 gousses (WTP) ( $r=0,906$ ), le poids d'un millier de graines (WTS) ( $r=0,878$ ), longueur (LS) et largeur (WS) des graines ( $r=0,861$  et  $0,828$ , respectivement). Mais négativement au corrélée RW ( $r=-0,878$ ).

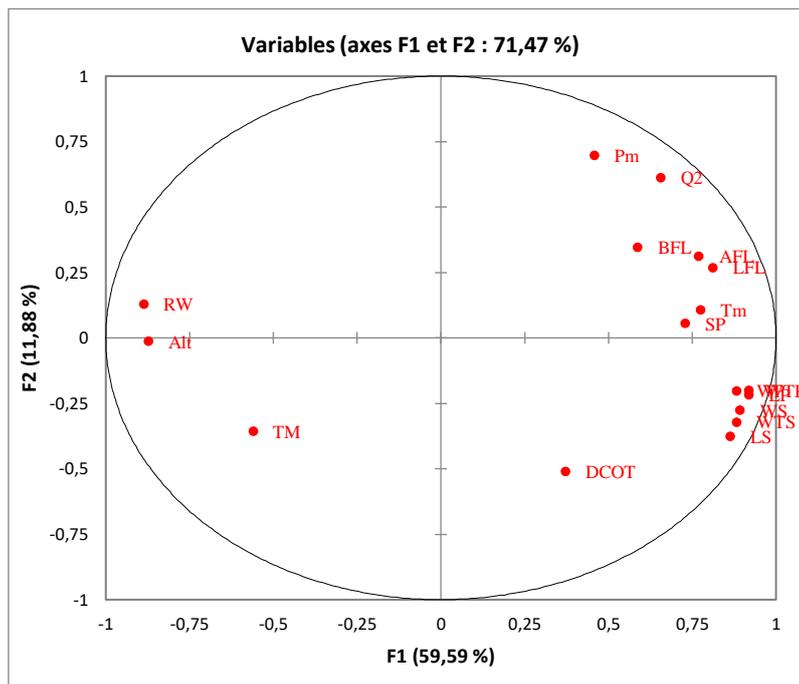
L'aire de la première feuille (AFL) a montré une corrélation positive hautement significative avec la longueur (LFL) et la largeur de la première feuille (BFL) ( $r=0,907$  et  $0,911$ , respectivement). Par ailleurs, la plus forte corrélation positive ( $r = 0,937$ ) a lié la longueur (LS) des graines et le poids d'un millier de graines (WTS) tandis que la plus forte corrélation négative ( $r = -0,932$ ) a lié RW et le poids de 30 gousses (WTP).

**Tableau 8.** Matrice de corrélations entre les différents caractères morphologiques des 24 accessions étudiés.

Variables	LP (mm)	WP (mm)	WTP (g)	SP	LS (mm)	WS (mm)	WTS (g)	RW	DCOT (Jours)	LGFT6 (mm)	LRFT6 (mm)	SFT6 (mm <sup>2</sup> )
LP (mm)	<b>1</b>											
WP (mm)	0,859	<b>1</b>										
WTP (g)	0,906	0,857	<b>1</b>									
SP	0,677	0,600	0,601	<b>1</b>								
LS (mm)	0,861	0,795	0,850	0,580	<b>1</b>							
WS (mm)	0,828	0,859	0,845	0,696	0,916	<b>1</b>						
WTS (g)	0,878	0,802	0,878	0,544	0,937	0,869	<b>1</b>					
RW	-0,878	-0,802	-0,932	-0,611	-0,769	-0,793	-0,764	<b>1</b>				
DCOT (Jours)	0,366	0,320	0,302	0,222	0,475	0,436	0,474	-0,323	<b>1</b>			
LGFT6 (mm)	0,678	0,653	0,681	0,567	0,663	0,616	0,620	-0,632	0,069	<b>1</b>		
LRFT6 (mm)	0,412	0,431	0,416	0,442	0,383	0,407	0,442	-0,389	-0,007	0,662	<b>1</b>	
SFT6 (mm <sup>2</sup> )	0,605	0,615	0,602	0,532	0,578	0,566	0,600	-0,550	0,051	0,907	0,911	<b>1</b>

### 1.3. Corrélation entre les caractéristiques morphologiques et les paramètres écologiques

Afin de vérifier la relation entre les caractères morphologiques étudiés et le bioclimat, une autre ACP (Figure 10) a été réalisée en tenant compte à la fois des caractéristiques morphométriques et des cinq paramètres écologiques (Alt, Pm, Tm, TM et Q2). Un graphique bidimensionnel (2D) a été préparé en utilisant les deux premiers axes, qui représentaient 71,47% de la variation totale avec 59,59%, 11,88% pour les axes 1 et 2, respectivement.



**Figure 10.** Analyse en composantes principales des caractères biométriques et leur relation avec les paramètres écologiques.

Toutes les caractéristiques ont formé un groupe contribuant fortement à la formation de PC1 du côté positif, à l'opposé de l'altitude (Alt) et la température maximale du mois le plus chaud (TM) qui sont corrélées négativement à cet axe. En revanche, PC2 a été influencé essentiellement par la pluviométrie (Pm) (corrélacion positive) et négativement par la date d'émergence des cotylédons (DCOT).

Cette distribution des variables indique une très forte corrélation entre les caractéristiques morphologiques et le bioclimat. Sur la base des valeurs indiquées données dans le tableau 9 qui comporte l'analyse des résultats relatifs aux coefficients de corrélation entre les caractères considérés, a montré une corrélation fortement négative entre l'altitude (Alt) et tous

les paramètres biométriques. Par contre, elle témoigne une corrélation fortement positive avec RW ( $r= 0,782$ ).

Il existe une corrélation positive entre les caractères morphologiques et la pluviométrie (Pm). D'où, la relation la plus étroite a été trouvée entre Pm et DCOT avec  $r = 0,003$  et la corrélation la plus forte a été montrée pour LFL avec  $r = 0,445$ .

Une corrélation positive hautement significative a été enregistrée entre la température minimale (Tm) et le poids de 30 gousses (WTP) avec  $r = 0,706$ . Par contre une relation négative lie la température maximale (TM) et la largeur des gousses (WP) avec  $r = - 0,557$ .

**Tableau 9.** Matrice de corrélation entre les différents caractères morphologiques et les cinq paramètres écologiques.

Variables	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LFL	BFL	AFL	Alt	Pm	Tm	TM	Q2
LP	<b>1</b>																
WP	0,859	<b>1</b>															
WTP	0,906	0,857	<b>1</b>														
SP	0,677	0,600	0,601	<b>1</b>													
LS	0,861	0,795	0,850	0,580	<b>1</b>												
WS	0,828	0,859	0,845	0,696	0,916	<b>1</b>											
WTS	0,878	0,802	0,878	0,544	0,937	0,869	<b>1</b>										
RW	-0,878	-0,802	-0,932	-0,611	-0,769	-0,793	-0,764	<b>1</b>									
DCOT	0,366	0,320	0,302	0,222	0,475	0,436	0,474	-0,323	<b>1</b>								
LFL	0,678	0,653	0,681	0,567	0,663	0,616	0,620	-0,632	0,069	<b>1</b>							
BFL	0,412	0,431	0,416	0,442	0,383	0,407	0,442	-0,389	-0,007	0,662	<b>1</b>						
AFL	0,605	0,615	0,602	0,532	0,578	0,566	0,600	-0,550	0,051	0,907	0,911	<b>1</b>					
Alt	-0,795	-0,741	-0,759	-0,616	-0,654	-0,753	-0,693	0,782	-0,458	-0,626	-0,440	-0,594	<b>1</b>				
Pm	0,304	0,206	0,264	0,350	0,166	0,254	0,201	-0,352	0,003	0,445	0,254	0,358	-0,463	<b>1</b>			
Tm	0,669	0,615	0,706	0,430	0,535	0,563	0,639	-0,705	0,277	0,606	0,368	0,549	-0,859	0,403	<b>1</b>		
TM	-0,357	-0,557	-0,455	-0,440	-0,358	-0,472	-0,391	0,423	-0,081	-0,418	-0,391	-0,439	0,370	-0,446	-0,350	<b>1</b>	
Q2	0,478	0,397	0,479	0,481	0,321	0,409	0,389	-0,539	0,106	0,568	0,340	0,480	-0,667	0,928	0,670	-0,597	<b>1</b>

#### 1.4. Analyse en composantes principales des accessions étudiées

La répartition des variables selon les deux axes permet de faire des groupages des individus qui se ressemblent plus au moins sur la base d'une ou de plusieurs des variables mesurées. L'ACP (Figure 11) se basant sur les caractères morphologiques, montre un regroupement des populations autour d'un centre d'inertie qui dans notre cas est l'accession Mt1 (Mila/Oued Athmenia), Mt2 (Mila/Bab Trouche), Mt11 (Bourdjbouarriridj/mansoura) et Mt27 (Sétif/Centre-ville), Ces derniers sont les plus proches de l'origine des deux axes. Cela veut dire qu'elles ont les caractères les plus communs avec l'ensemble des populations.

Les accessions Mt12 (Bourdj bouarriridj/air lac ain zada 2000 m), Mt13(Bourdj bouarriridj), Mt18 (Blida), Mt20 (Ain Defla), Mt21(Chlef), Mt22(Mascara), Mt23(Medea), Mt25(Guelma) qui se caractérisent par un SP élevé, une grande taille des gousses et des graines, un poids de 30 dosettes (WTP) élevé, un poids d'un millier de graines (WTS) important ainsi une langue et large feuille. Ces populations se situent au côté positif de la première composantes principales (PC1). Tandis que Mt6 (Oum Bouaghi), Mt8 (Oum Bouaghi/Ain Fakroun), Mt9(Tipaza), Mt16 (Alger/Mohamadia), Mt17 (Alger/Ben Aknoun), Mt24 (Tissemsilt), Mt26 (Sétif/Eulma), se caractérisent par un RW important et une date d'émergence des cotylédons (DCOT) tardive.

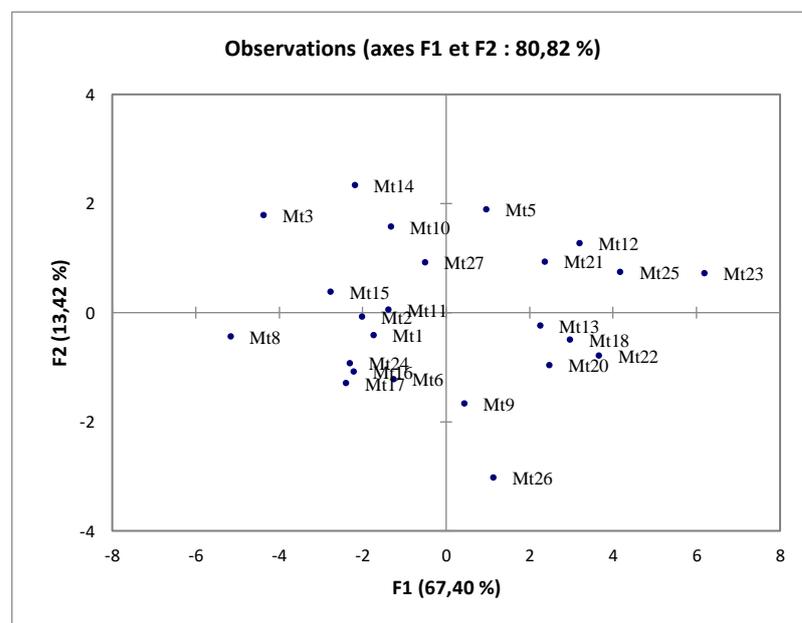


Figure 11. Répartition des 24 accessions étudiées sur les plans 1/2 de l'ACP

## 2. Analyse de la diversité moléculaire

### 2.1. Lecture des profils électrophorétiques

L'analyse des profils électrophorétiques des différents produits de la PCR a été effectuée par un simple examen visuel des pistes d'électrophorèses. L'ensemble des mobilités relatives des bandes ont été déterminées visuellement et introduites dans une matrice de données binaires (0/1) présence (1) ou absence (0), les bandes ayant la même mobilité ont été considérées comme des fragments identiques, quelle que soit l'intensité de la bande.

A partir de ces données obtenues, la matrice de similarité a été calculée en se basant sur l'indice de Jaccard par «Simple Matching» et un dendrogramme a été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les accessions ont été élaborées également.

### 2.2. Mobilité et fréquence des amplifiants

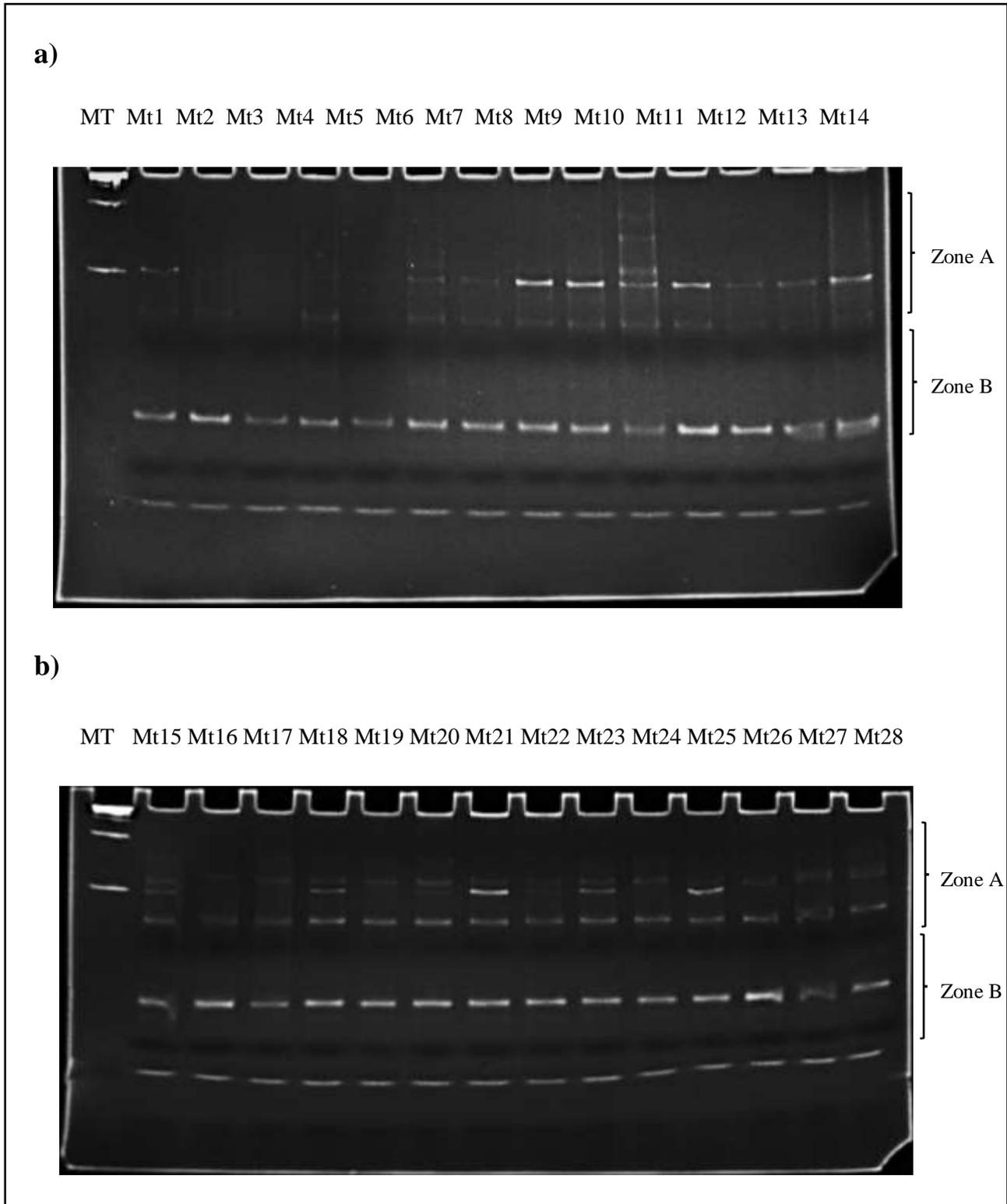
La lecture des diagrammes électrophorétiques consiste à relever la mobilité (cm) de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation. La mobilité d'une bande est la distance entre le point d'application de l'échantillon et la position de la bande correspondante dans le gel. A cet effet, nous avons utilisé une accession de référence qui a servi de repère pour tenir compte des variations de mobilité observées entre les gels.

En se basant sur la mobilité et la preuve génétique, les bandes lentes correspondent aux fragments de haut poids moléculaire tandis que les bandes intermédiaires et rapides correspondent aux fragments de faible poids moléculaire.

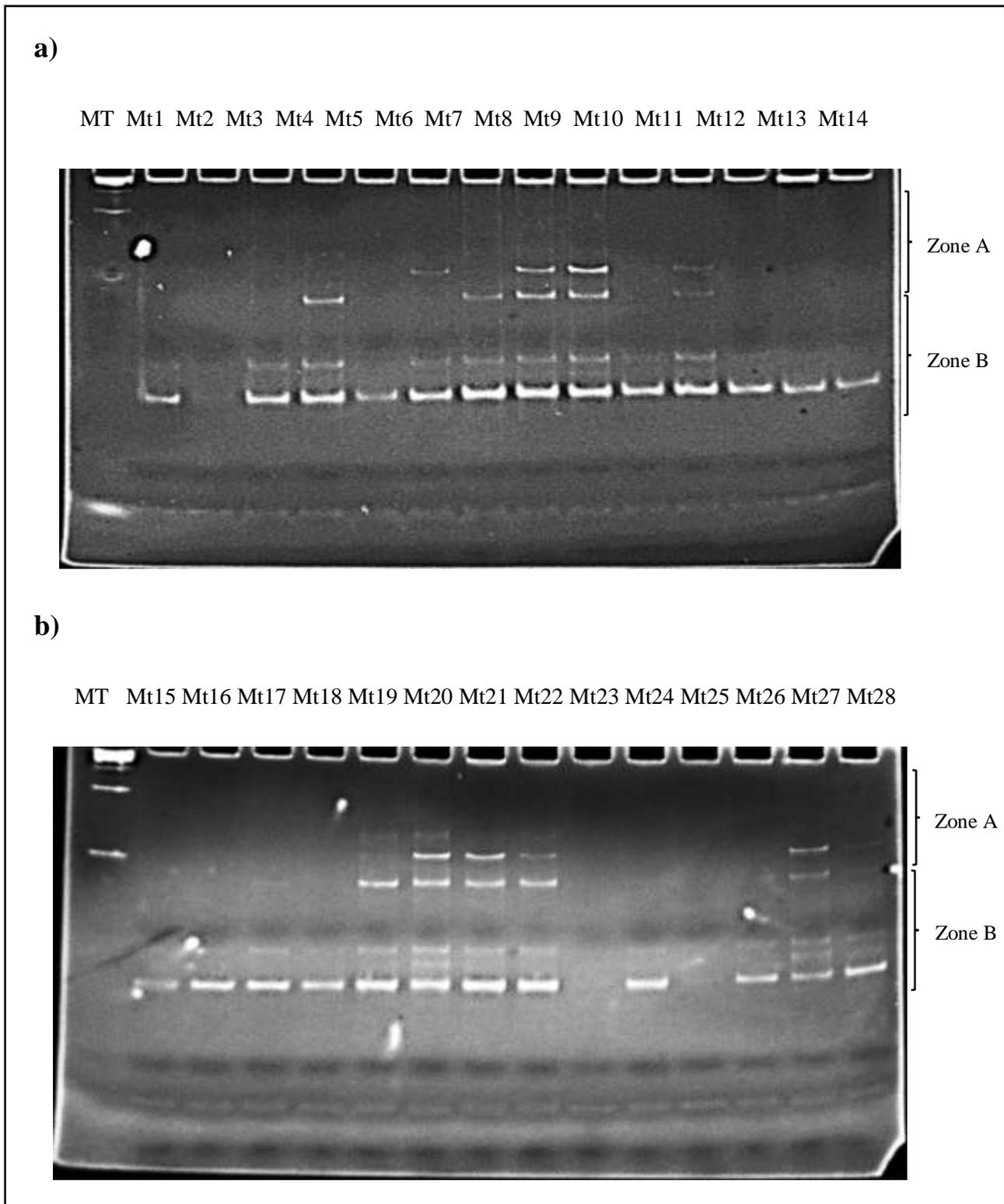
Les résultats obtenus après la migration des ADN amplifiés ont permis de détecter des électrophorègrammes avec des différences intensités, ces dernières varient d'un microsatellite à un autre. Les bandes sont très bien séparées avec une bonne résolution et elles révèlent un polymorphisme entre les accessions. Le diagramme divisé en deux zones A et B pour Afct32, Afctt1 chacune (figure 12 et 13).

- Zone (A) : C'est la zone la plus lente puisqu'elle représente les bandes qui ont un poids moléculaire supérieur ou égale 200 kDa pour AFct32 et Afctt1 chacune avec une gamme de mobilité allant de 0.28 à 2.43cm et de 0.18 à 2.33cm respectivement, les bandes dans cette zone sont bien séparées et ont des intensités différentes.

• Zone (B) : c'est la zone rapide, elle est caractérisée par une considérable variabilité des profils avec des poids moléculaires moins de 98 KDa pour les deux amorces et une mobilité oscille entre 2.61 et 6.46cm pour Afctt1, entre 2.54 et 5.89 cm pour AFct32.



**Figure 12.** Profils électrophorétiques des bandes SSR de l'espèce *M.truncatula* révélés par l'amorce AFct32.



**Figure 13.** Profils électrophorétiques des bandes SSR de l'espèce *M. truncatula* révélés par l'amorce AFctt1.

### ➤ Amorce AFct32

Dans les diagrammes électrophorétiques pour l'amorce Afct32, nous avons détecté 8 bandes réparties dans tout le gel, numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide, avec des mobilités allant de 0.28 à 5.89 cm. Les fréquences des bandes détectées dans les 28 accessions de l'espèce *M. truncatula* sont représentées dans le tableau 10.

Deux bandes (B6 et B8) ont été marquées monomorphes, elles sont omniprésentes dans toutes les accessions à 100 % avec des mobilités de 3.32 cm et 5.89 cm pour chacune respectivement. Suivies par Des fréquences moyennes qui varient de 0.20 à 0.32 ont caractérisé quatre bandes sur les 8 détectées (B1, B2, B4, B5). Les plus faibles fréquences (entre 0.12 à 0.16) ont été observées dans deux bandes (B3, B7) qui sont partagées par 3 à 4 accessions.

### ➤ Amorce AFctt1

A travers les 29 accessions de cette espèce, 10 bandes décelables ont été obtenues avec des mobilités allant de 0.18 à 6.46 cm, leurs fréquences sont représentées dans le tableau 11.

D'après le tableau, nous avons constaté une grande variabilité de fréquences entre les accessions de *M. truncatula*. Parmi les 10 bandes détectées, seulement deux sont monomorphes (A8, A9) elles sont omniprésentes dans toutes les accessions avec un taux maximum (1.00). Une fréquence moins élevée de 0.88 a été notée pour la bande A6 qui a été absente chez 3 accessions seulement.

Des fréquences intermédiaires varient entre 0.40 et 0.36 ont été enregistrées pour les trois bandes (A2, A3 et A5), à titre d'exemple les bandes A2 et A3 ont été détectées chez neuf accessions chacune avec la valeur de fréquence 0.36. Les bandes restantes sont partagées par deux ou trois accessions avec des fréquences faibles varient de 0.08 à 0.12, c'est les cas des bandes : A4, A7, A10 (Tableau 11).

La fréquence la plus faible 0,04 a été observé pour la bande A1 de mobilité 0.18 cm, c'est une bande spécifique à l'espèce *M. truncatula* qui a été observée pour l'amorce AFctt1, et qui a été trouvée dans une seule accession uniquement, elle est donc considérée polymorphe : la bande A1 particularise l'accession Mt13 appartenant à la région de Bourdj bouarridj.

**Tableau 10.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences pour l'amorce AFCT32 des 28 accessions de *M. truncatula*.

Bandes	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6	MT8	MT9	MT10	MT13	MT14	MT15	MT16	MT17	MT18	MT19	MT20	MT21	MT22	MT23	MT24	MT25	MT26	MT27	MT28	somme	fréquence
B1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	8	0,32
B2	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0,28
B3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	4	0,16
B4	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,24
B5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	5	0,2
B6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25	1
B7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	3	0,12
B8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25	1

**Tableau 11.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences pour l'amorce AFctt1 des 28 accessions de *M. truncatula*.

Bandes	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6	MT8	MT9	MT10	MT13	MT14	MT15	MT16	MT17	MT18	MT19	MT20	MT21	MT22	MT23	MT24	MT25	MT26	MT27	MT28	somme	fréquence
A1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,04
A2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	9	0,36
A3	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	9	0,36
A4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,08
A5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	0,4
A6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	22	0,88
A7	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,12
A8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25	1
A9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25	1
A10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,08

### 2.3. Analyse génétique

Cinq marqueurs SSR ont été sélectionnés pour tester le polymorphisme avec 28 accessions de l'espèce *M. truncatula*. Trois d'entre eux n'ont produit aucun fragment dans les accessions. Par conséquent, deux (AFctt1 et AFct32) des cinq marqueurs SSR ont donné un total de 18 fragments allant de 17 à 187pb, avec 10 bandes et 8 (25-132 pb) bandes pour AFctt1 et AFct32, respectivement (tableau 12).

**Tableau 12.** Nombre total des bandes amplifiées et polymorphisme dans les 28 accessions pour chaque marqueur SSR.

Locus	Nombre de bandes amplifiées	Moyenne de nombre des bandes	Taille de la bande (pb)	Nombre de bandes polymorphiques	Quantité de polymorphisme (%)
AFctt1	10	4.32 (3-6)	17-187	8	72.73
AFct32	8	3.32 (2-6)	25-132	6	75.00

Une variation génétique a été détectée entre 28 accessions de *M. truncatula*. Des amplifications PCR ont été réalisées avec des microsatellites ont donné des différents profils électrophorétiques (figure11 et 12).

Les deux amorces ont donné 18 fragments d'ADN amplifiés avec 14 bandes SSR polymorphes pour les 28 accessions (tableau 12).

Le nombre de bandes polymorphes oscillent entre 6 et 8 avec un pourcentage de polymorphisme varie de 75,00% et 72,73% respectivement pour AFct32 et AFctt1.

### 2.4. Distances génétiques

Pour quantifier l'analogie ou la dissemblance entre les accessions en estimant le degré de différence entre les diagrammes moléculaire 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 dissimilarités entre les 28 accessions de *M. truncatula* ont été calculées sur la base des données des amorces en utilisant la distance de Jaccard comme coefficient. Les résultats

sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau 12. Les valeurs ressortent que les distances génétiques se situent entre 0.00 et 0.714 avec une valeur moyenne  $d=0.375$ .

Huit couples d'accessions : Mt2 (Mila / Bab Trouche) et Mt1 (Mila / Oued athmenia), Mt5 (Constantine / Chaabat ersas) et Mt1 (Mila / Oued athmenia), Mt5 (Constantine / Chaabat ersas) et Mt2 (Mila / Bab Trouche), Mt15 (Bouira / Akhdaria) et Mt1 (Mila / Oued athmenia), Mt15 (Bouira / Akhdaria) et Mt2 (Mila / Bab Trouche), Mt15 ( Bouira / Akhdaria) et Mt5 (Constantine / Chaabat ersas), Mt17 (Alger / Ben Aknoun), et Mt16 (Alger / Mohamadia), Mt21(Chlef) et Mt18(Blida) sont similaires à 100 % présentant la valeur de distance 0,00. Elles ont été prélevé dans des zones relativement éloignée géographiquement (Constantine / Mila / Bouira / Alger / Chlef / Blida) et écologiquement (varient du hyper-humide au subhumide) avec des valeurs d'altitude (584, 831, 144, 3, 70, 135), respectivement.

Les valeurs faibles signifient que les diagrammes des amplifias apparaissent très voisins et que les accessions sont génétiquement proches les unes des autres. Une valeur  $d=0.100$ , qui a été observée entre le couple Mt24/ Mt25 et qui ont été prélevées dans deux régions assez distantes (Tissemsilt /Guelma) avec des sites de collecte particularisée par des valeurs d'altitude relativement proches (575/ 798) et des valeurs de pluviométrie annuelle de 609 et 564, respectivement.

Inversement, lorsque les valeurs des distances génétiques sont élevées, les accessions sont génétiquement éloignées. Tels que le couple Mt18/Mt22 (Mascara/Blida) qui a été caractérisé par la valeur la plus élevée de distance  $d=0.714$ . Ces deux échantillons ont été collectés dans deux sites éloignés écologiquement (semi sec, hyper humide avec une grande différence entre leurs valeurs d'altitude (70 et 281, respectivement).

Des distances intermédiaires ont été obtenue pour d'autres couples d'accessions présentent des diagrammes plus ou moins proches, avec autant de ressemblances que dissemblances (moyenne= $0.375$ ).

**Tableau 13.** Distances génétiques obtenues entre les 28 accessions de *M.truncatula* en se basant sur les données des amorces (AFct32/AFctt1).

	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6	MT8	MT9	MT10	MT13	MT14	MT15	MT16	MT17	MT18	MT19	MT20	MT21	MT22	MT23	MT24	MT25	MT26	MT27	MT28
MT1	0	0,000	0,167	0,444	0,000	0,500	0,375	0,375	0,375	0,375	0,286	0,000	0,167	0,167	0,375	0,429	0,444	0,375	0,636	0,583	0,500	0,444	<b>0,375</b>	0,556	0,286
MT2		0	0,167	0,444	0,000	0,500	0,375	0,375	0,375	0,375	0,286	0,000	0,167	0,167	0,375	0,429	0,444	0,375	0,636	0,583	0,500	0,444	0,375	0,556	0,286
MT3			0	0,333	0,167	0,545	0,444	0,250	0,250	0,444	0,375	0,167	0,286	0,286	0,444	0,500	0,500	0,444	0,545	0,500	0,400	0,333	0,444	0,600	<b>0,375</b>
MT4				0	0,444	0,273	0,111	0,111	0,111	0,455	0,222	0,444	0,500	0,500	0,583	0,636	0,615	0,583	0,643	0,600	0,538	0,500	0,583	0,692	0,545
MT5					0	0,500	0,375	0,375	0,375	0,375	0,286	0,000	0,167	0,167	0,375	0,429	0,444	0,375	0,636	0,583	0,500	0,444	0,375	0,556	0,286
MT6						0	0,200	0,364	0,364	0,364	0,300	0,500	0,545	0,545	0,500	0,545	0,538	0,500	0,667	0,625	0,667	0,643	0,500	0,615	0,583
MT8							0	0,222	0,222	0,400	0,125	0,375	0,444	0,444	0,545	0,600	0,583	0,545	<b>0,714</b>	0,667	0,615	0,583	0,545	0,667	0,500
MT9								0	<b>0,000</b>	0,400	0,125	0,375	0,444	0,444	0,545	0,600	0,583	0,545	0,615	0,571	0,500	0,455	0,545	0,667	0,500
MT10									0	0,400	0,125	0,375	0,444	0,444	0,545	0,600	0,583	0,545	0,615	0,571	0,500	0,455	0,545	0,667	0,500
MT13										0	0,333	0,375	0,444	0,444	0,400	0,600	0,455	0,400	0,615	0,571	0,615	0,583	0,400	0,545	0,500
MT14											0	0,286	0,375	0,375	0,500	0,556	0,545	0,500	0,692	0,643	0,583	0,545	0,500	0,636	0,444
MT15												0	0,167	0,167	0,375	0,429	0,444	<b>0,375</b>	0,636	0,583	0,500	0,444	<b>0,375</b>	0,556	0,286
MT16													0	<b>0,000</b>	0,444	0,500	0,500	0,444	0,667	0,615	0,545	0,500	0,444	0,600	0,375
MT17														0	0,444	0,500	0,500	0,444	0,667	0,615	0,545	0,500	0,444	0,600	0,375
MT18															0	0,444	0,111	<b>0,000</b>	0,364	0,333	0,500	0,455	0,000	0,222	0,125
MT19																0	0,500	0,444	0,545	0,615	0,667	0,636	0,444	0,444	0,375
MT20																	0	0,111	0,273	0,250	0,417	0,364	0,111	0,300	0,222
MT21																		0	0,364	0,333	0,500	0,455	0,000	0,222	0,125
MT22																			0	0,167	0,333	0,273	0,364	0,364	0,455
MT23																				0	0,167	0,250	0,333	0,333	0,417
MT24																					0	<b>0,100</b>	0,500	0,500	0,455
MT25																						0	0,455	0,583	0,400
MT26																							0	0,222	0,125
MT27																								0	0,333
MT28																									0

## 2.5. Classification ascendante hiérarchique (CAH)

La classification CAH permet le regroupement des objets ou autres dans des groupes homogènes, sur la base de leur similarité. Cette méthode statistique permet d'effectuer des typologies empiriques.

Le dendrogramme est construit sur la base des distances génétiques ou des bandes des profils électrophorétiques obtenus pour les marqueurs SSR étudiés. Les liens hiérarchiques apparaissent sur le dendrogramme présenté ci-dessous montrent la présence de cinq clusters majeurs (défini par une coupure tracée « en pointillés » pour séparer les différents niveaux d'agrégation) à une distance  $d=0,4$ .

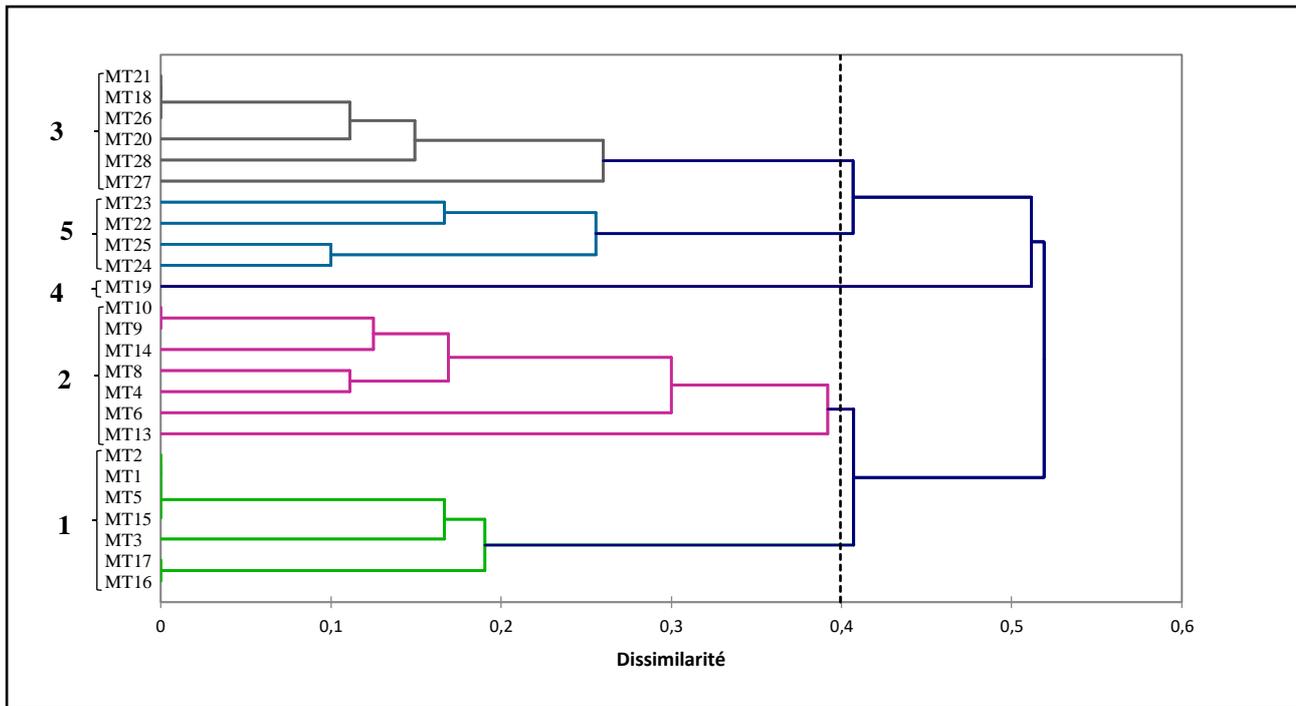
Le premier cluster ( $d=0,19$ ) regroupe sept accessions (Mt1, Mt2, Mt3, Mt5, Mt15, Mt17, Mt16) appartenant à des régions de l'Est du pays (Constantine, Mila, Bouira) avec gammes des étages bioclimatiques variant de l'hyper-humide au subhumide, sauf Mt16 et Mt17 (Alger) sont à l'origine du centre de l'Algérie avec un climat hyper-humide au humide.

Le deuxième groupe comprend sept accessions à un degré de distance  $d=0,39$  et qui appartiennent à des régions relativement éloignées de l'Est Algérien (Oum Bouaghi, Constantine, Bourdj Bouarriridj et Bouira), avec des étages bioclimatiques variant du hyper-humide au subhumide, sauf Mt9 qui a été prélevée dans une région du Nord du pays (Tipaza) avec un climat hyper-humide.

Le troisième cluster est constitué de six accessions collectées dans des régions allant du centre jusqu'à l'Ouest du Nord algérien appartenant à un climat humide, à l'exception de Sétif (Mt26 et Mt27) et Batna (Mt28) qui représente le côté Est, avec un climat qui varie de l'hyper-humide à l'humide. Ils présentent un degré de distance  $d=0,26$ .

L'accession Mt19 qui est collectée dans une région humide d'Ain Defla, forme le quatrième groupe qui est considéré indépendant des autres avec le degré le plus élevé de distance génétique ( $d=0,5$ ).

Le cinquième groupe renferme quatre accessions (Mt22, Mt23, Mt24, Mt25) au niveau de distance  $d=0,25$ . Ces accessions ont la particularité d'être collectées dans différentes régions allant de l'Est passant par le centre vers l'Ouest du pays (Guelma, Medea, Tissemsilet, Mascara) avec une large gamme des étages bioclimatiques qui varie de l'humide au semi sec.



**Figure 14.** Classification hiérarchique en UPGMA des 28 accessions de *M. truncatula* basée sur le polymorphisme des SSR : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe, 5) le cinquième groupe.

### 3. Discussion

L'objectif de cette étude est la détermination de la diversité génétique dans les populations de l'espèce *M. truncatula*, les marqueurs SSR et morphologiques ont été comparés pour 28 accessions recueillies dans un large éventail des étapes climatiques dans le nord Algérien.

Nos résultats ont montré qu'il y avait des variations morphologiques significatives au sein et entre les populations en termes de caractères de gousse, de graine et de plantule. De plus, tous les taxonomistes ont utilisé les caractères des fruits (gousse et graine) comme clé importante pour distinguer les espèces du genre *Medicago L.* (Heyn, 1963; Lesins et Lesins, 1979; Quezel et Santa, 1962; Small et Jomphe, 1989). Cette forte variation morphologique est cohérente avec les résultats de nombreuses études sur la diversité génétique sur les collections de matériel génétique de *Medicago L.* (Al-Faifi *et al.*, 2013; Bonnin *et al.*, 1996; Bullita *et al.*, 1994; Cherifi *et al.*, 1993; El Hansali *et al.*, 2007; Radwan *et al.*, 1980; Tucak *et al.*, 2008; Zivković *et al.*, 2012).

Brundu *et al.*, (2004) font remarquer que *M. minima* et *M. truncatula* montrent une grande diversité morphologique et phénologique. Haddiou *et al.*, (2012) et El Hansali *et al.*, (2007) ont noté l'existence d'une variabilité morphologique hautement significative chez neuf populations

naturelles de *M. truncatula* originaire du Maroc, qui est d'autant plus importante que les populations sont situées dans des climats différents. Arraouadi *et al.*, (2006), en caractérisant phénotypiquement les populations naturelles Tunisiennes de *M. truncatula*, ont signalé un important degré de polymorphisme quantitatif au sein et entre les populations étudiées.

Selon Abdelkefi et Marakchi (2000), les espèces annuelles de *Medicago* ou « medics » produisent une grande quantité de gousses indéhiscents contenant de graines dures. Loi *et al.*, (2000), en étudiant le potentiel de nouvelles légumineuses alternatives à pâturage pour les systèmes agricoles méditerranéens de l'Australie, ont montré que les luzernes annuelles ont produit plus de graines que la plupart des autres espèces.

Yousfi *et al.*, (2006) signalent que le cultivar australien Jemalong (*M. truncatula*), classé parmi les populations tardives, produit un nombre faible de gousses, mais contient un nombre élevé de graines par gousse.

Chebouti *et al.*, (2006) signalent que les populations tardives de *M. aculeata*, *M. orbicularis* et *M. truncatula* ont présenté un meilleur développement végétatif et une bonne nodulation que les populations précoces. Par contre Laouar et Abdelguerfi (1999) ont indiqué que les populations précoces produisent les gousses et les graines les plus lourdes.

Notre étude a révélé des résultats mitigés concernant les corrélations des caractères biométriques avec les facteurs du milieu comme le montre l'ACP. La différenciation, même importante, entre et au sein de ce pool sauvage algérien pour les caractéristiques quantitatives est probablement due à la vaste zone géographique représentée, et donc à la grande hétérogénéité des habitats rencontrés. Diverses études sur le genre *Medicago* L. ont révélé une corrélation positive entre les traits morphologiques et les facteurs climatiques (Abdelguerfi et Laouar, 1999; Al-Faifi *et al.*, 2013; Zivković *et al.*, 2012).

Prosperi *et al.*, (2006) lors de l'évaluation de la diversité morphologique et agronomique des ressources génétiques sauvages de *Medicago sativa* L. en Espagne ont trouvé de faibles corrélations significatives entre les deux ensembles de variables (morphologie et bioclimat) et ont remarqué que les caractéristiques environnementales qui influencent davantage les traits phénotypiques du naturel les populations étudiées étaient les précipitations estivales et la latitude.

La structuration de populations naturelles de *M. truncatula* selon des facteurs écogéographiques traduit l'existence de structures génotypiques bien adaptées à des conditions

écologiques locales. Le faible taux d'allogamie que représente cette espèce permettrait de maintenir des recombinaisons génétiques contribuant à des adaptations particulières aux différentes conditions du milieu (Baatout *et al.*, 1990). Cette structuration des populations naturelles de *M. truncatula*, selon certains facteurs écologiques du milieu d'origine, rappelle celle observée chez les populations algériennes (Si Ziani & Abdelguerfi, 1995). Ce résultat a été également observé chez d'autres espèces fourragères en Afrique du Nord : *Medicago spp.* (Cremer-Bach, 1992), *M. ciliaris* et *M. intertexta* (Cherifi *et al.*, 1993), *M. polymorpha* (Abdelkefi *et al.*, 1996), *Hedysarum spinosissimum* (Baatout *et al.*, 1991) et *Atriplex halimus* (Haddioui & Baaziz, 2001 ; Abbad *et al.*, 2004).

Badri *et al.*, (2007), pour leur part, ont également trouvé des corrélations entre les caractères quantitatifs et les facteurs écogéographiques des sites d'origine.

L'analyse du polymorphisme morphologique est souvent accompagnée de l'étude du polymorphisme isoenzymatique ou moléculaire (Ballve *et al.*, 1997 ; Moore, 2001). Les marqueurs microsatellites sont connus pour présenter des taux de mutation élevés, et devraient donc révéler des quantités de polymorphismes, en particulier lorsqu'ils sont utilisés au niveau des espèces. Ils permettent de sélectionner les caractères souhaités en fonction du génotype et peuvent donc compléter et accélérer les programmes de sélection végétale. De plus, les marqueurs avec un grand nombre d'allèles sont informatifs pour les études de population (Ronfort *et al.*, 2006).

La technique SSR, dans des conditions d'amplification adaptées de l'ADN, permet de fournir rapidement une masse de produits fiables très informatives, avec des profils reproductibles et très polymorphes (Prevost et Wilkinson, 1999 ; Haouari et Ferchichi, 2004).

Nous avons analysé les données de génotypage par marqueurs SSR de 28 accessions (génotypes) appartenant à l'espèce *M. truncatula*. Pour le choix des marqueurs SSR nous sommes référées aux travaux de Medoukali *et al.*, (2015), selon lesquels on pouvait avoir des marqueurs moléculaires, utilisés dans la cartographie génétique de *M. truncatula*.

Toutes les accessions étudiées ont montré un polymorphisme intraspécifique intéressant basé sur les deux marqueurs SSR, ce qui n'est pas surprenant car les espèces annuelles de *Medicago* sont autofécondantes et on sait que l'autofécondation diminue le flux génétique et augmente par conséquent la différenciation locale entre les populations (Charlesworth, 2003).

L'importance des marqueurs SSR étudiés est démontrée par la topologie du dendrogramme basé sur le coefficient de Jaccard qui variait de 0,00 à 0,714 avec une moyenne de 0,375, cette large gamme d'indices de dissimilarité reflète un haut degré de polymorphisme entre les accessions de *M. truncatula*.

Selon Pollak (1987) in Siol *et al.*, (2008), l'autogamie réduit la variance intra population, car la consanguinité réduit l'efficacité des recombinaisons génétiques (Nordborg, 2000 in Siol *et al.*, 2008). De plus, l'autogamie augmente la variance inter populations en raison du faible taux de dispersion du pollen qui constitue l'un des facteurs les plus importants pour l'augmentation des flux géniques entre plantes. Des études sur les allozymes et les marqueurs moléculaires ont confirmé qu'un taux élevé d'autofécondation est associé à un faible taux de variation intra population et à un taux élevé de variation inter populations comparé aux espèces allogames (Hamrick et Godt, 1990 in Siol *et al.*, 2008 ; Schoenen et Brown, 1991 in Siol *et al.*, 2008).

Des études utilisant les différentes techniques de marquage (isozymes, ADN) ont révélé que la variation des espèces autogames était essentiellement due aux variations entre sites alors que celle des allogames pouvait contenir une certaine variation au niveau du même site (Andrews *et al.*, 1998 in Nichols, 2005 ; Pakniat *et al.*, 1997 in Nichols, 2005).

De plus, l'autogamie agit comme barrière de flux génétique entre populations voisines présentes dans différents habitats. De ce fait, les gènes favorables peuvent être maintenus dans ces cas. Selon Benett (1999) in Nichols, (2005), des habitats variables sont nécessaires pour le maintien de la diversité génétique chez les autogames. Mais la variabilité des habitats est réduite aux limites de destruction des espèces (Venable et Brown, 1988 in Nichols, 2005).

En revanche, les études de Bonnin ont révélé une large diversité génétique au sein de l'espèce autogame *M. truncatula*, entre les populations mais aussi à l'intérieur de certaines populations (Bonnin *et al.*, 1996. Bonnin *et al.*, 2001). Cette grande diversité génétique entre les populations pourrait s'expliquer par les niveaux élevés d'autogamie chez *M. truncatula*, Selon Hamrick et Godt (1990). Les espèces à autogamie prédominante peuvent garder des niveaux de polymorphisme à l'intérieur des populations (Cherifi, 1996).

Pour Siol *et al.*, (2008), il existe un peu plus de variation de population à population au niveau de la diversité chez les espèces préférentiellement autogames que chez les espèces allogames. Ceci signifie que bien que le niveau de diversité génétique soit moyen à faible chez

les espèces autogames, certaines populations peuvent receler un taux élevé de diversité génétique.

Cependant l'étude de Badri *et al.*, (2003), a mis en évidence une importante variabilité intraspécifique par l'utilisation de 7 marqueurs SSR chez des populations annuelles appartenant à deux espèces du genre *Medicago* (*M. truncatula* et *M. laciniata*).

Une autre analyse de la variabilité intraspécifique chez des populations prenes appartenant à l'espèce *M. sativa* par l'utilisation de 2 marqueurs SSR a démontré l'existence d'une variabilité génétique très élevée (Petolescu et Nedelea, 2009).

Cui *et al.*, (2013) trouve qu'il existe une association positive entre des caractères morphologiques et les microsatellites en relation avec l'origine des populations et leur tolérance au froid. Tandis que Touil *et al.*, (2008), en étudiant la diversité génétique, chez des populations cultivées de *M. sativa* L., montrent qu'il n'y a pas une corrélation entre marqueurs SSR et l'origine géographique des populations.

Par contre Bagavathiannan *et al.*, (2010) en investiguant la diversité génétique de certaines populations de Luzerne naturelles et cultivées, ne trouve pas de corrélation entre les variables phénotypiques et les marqueurs SSR utilisés.

Conclusion  
et  
perspectives

Ce travail de recherche avait pour objectif, d'apprécier la diversité existante au sein de l'espèce *M. truncatula* par des marqueurs morphologiques et moléculaires sur 28 échantillons recueillis dans diverses conditions éco-géographiques dans le nord de l'Algérie.

Sur le plan moléculaire, nous avons réalisé la méthode de Doyle et Doyle 1990, afin d'extraire l'ADN à partir des feuilles de plantules. Une PCR suivi d'une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en utilisant des microsatellites ont été effectuées. Pour les caractères morphologiques ont été mesuré manuellement par un cadran-micromètre.

L'analyse des données de diversité morphologique et moléculaire de *M. truncatula*, nous a permis de :

- Réaliser une analyse en composantes principales, une grande dispersion des individus dans le plan défini par les deux composantes principales montre que la majorité des caractères biométriques ont contribué à la discrimination des 28 accessions de *M. truncatula* étudiées. Ces caractères ont subdivisé les populations en deux groupes : un groupe incluant les populations avec des valeurs élevées de caractéristiques morphologiques et un second groupe incluant les populations caractérisées par des valeurs de caractéristiques morphologiques intermédiaires à faibles.

- Noter des corrélations hautement significatives entre les caractères biométriques et les paramètres écologiques. Ces caractères utilisés en biométrie sont essentiellement polygéniques et concernent des niveaux phénotypiques complexes accessibles aux influences du milieu, ainsi qu'à la sélection.

- Conclure une diversification génétique observable entre populations de *M. truncatula* échantillonnées dans des conditions éco-géographiques très diverses.

- Définir l'apport des marqueurs moléculaires, en particulier PCR-SSR, dans l'évaluation de la diversité génétique de l'espèce *M. truncatula*.

- Détecter les différences au niveau des électrophorogrammes obtenus révélés par les deux amorces AFct32 et Afctt1chez les différentes accessions étudiées.

- Répertoire 18 bandes SSR à travers toute la collection avec des mobilités et fréquences très variables, dont 14 sont polymorphes.

- Effectuer une caractérisation phylogénétique des différentes accessions étudiées par une classification hiérarchique en UPGMA, ça nous a conduit à constater la présence d'une corrélation entre le regroupement des accessions selon le polymorphisme des microsatellites, et les facteurs climatiques et géographiques des régions d'origine de chaque accession.

- Une différenciation génétique est révélée avec un flux génique élevé, laisse suggérer que ceci, en plus des facteurs naturels et anthropiques, contribue dans l'organisation de la structure génétique de l'espèce : certaines populations éloignées se sont regroupées génétiquement, tandis que des populations plus proches divergent de manière significative, due à l'effet de l'hétérogénéité climatique, édaphique et géographique.

Nous avons pu démontrer que les populations Algériennes de *M. truncatula* sont un matériel de choix pour faire de la biologie intégrative, c'est à dire mettre en parallèle la biologie de la plante, son environnement, sa génétique et sa génomique afin de comprendre comment les plantes fonctionnent et permettre d'identifier des gènes d'intérêt.

Enfin comme perspective, d'autres approches et d'autres méthodes seraient nécessaires et complémentaires à cette étude :

- Mieux apprécier cette diversité et confirmer les résultats obtenus.
- L'utilisation d'autres marqueurs morphologiques et moléculaires devrait permettre de mieux comprendre la structuration de la diversité génétique et le rôle des facteurs écologiques dans la différenciation de cette espèce Algérienne, ce qui peut donner une indication sur le modèle d'évolution appliqué aux accessions étudiées dans leurs conditions environnementales.
- Approfondir les connaissances sur cette espèce pour une meilleure valorisation dans les domaines de l'écologie, agriculture, industrie et médicale.
- Essayer de comprendre les mécanismes d'adaptation de ce groupe de plante.
- Elargir le champ d'application des microsatellites, et étudier d'autres genres et d'autres espèces pour la préservation de la diversité biologique et des ressources génétiques.
- Élargir les stations de collecte des échantillons de cette espèce à travers toutes les régions de sa répartition en Algérie, avec une récolte exhaustive de données utiles telles que les données climatiques et édaphiques.

- Essayer de corrélérer cette diversité morphologique et moléculaire avec d'autres marqueurs.

- Comparer les résultats d'analyse génétique de *M. truncatula* en Algérie à ceux des autres pays méditerranéens afin de construire un arbre phylogénétique global permettant d'élucider les relations généalogiques et de découvrir les processus évolutifs de cette espèce.

# Références bibliographiques

**Abbad A, Cherkaoui M, Wahid N, El Hadrami A, Benchaabane A. (2004).** Variabilité phénotypique et génétique de trois populations naturelles d'*Atriplex halimus*. C.R. Biologies, 327, 371-380.

**Abdelguerfi A, Abdelguerfi-Berriki R. (1988a).** Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* L. en Algérie. II. Caractérisation des gousses et des graines de *M. orbicularis* (L) Bart. Relation avec les conditions du milieu d'origine. Annales de l'institut National Agronomique. El-Harrach., 12 (1) : 329-341.

**Abdelguerfi A, Chapot JY, Conesa AP, Roseau R. (1988c).** Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* L. en Algérie. Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. Annales de l'institut National Agronomique. El-Harrach., 12 (1) : 304- 326.

**Abdelguerfi A, Chapot JY, CONESA AP. (1988).** Contribution à l'étude des luzernes annuelles spontanées en Algérie selon certains facteurs du milieu. Fourrages., 113 : 89-106.

**Abdelguerfi A, Laouar M. (1999).** Autoécologie et variabilité de quelques légumineuses d'intérêt fourrager et/ou pastoral : possibilités de valorisation en région Méditerranéenne. [Autecology and variability of some legumes of fodder and/or pastoral interest : valorization possibilities in Mediterranean region]. *Pastagens e Forragens*, 20:81-112.

**Abdelkafi A, Marrakchi M. (1998).** Les ressources phylogénétiques fourragères et pastorales : de l'érosion à la conservation. *Opt Medit.*, 15-27.

**Abdelkefi A, Boussaid M, Biborchi A, Haddioui A, Salhi-Hanachi A, Marrakchi M. (1996).** Genetic diversity inventory and valuation of spontaneous species belonging to *Medicago* genus in Tunisia. *Cahiers Options méditerranéennes*, 18, 143-150.

**Abdelkefi A, Marrakchi M. (2000).** Les ressources phylogénétique fourragères et pastorales: de l'érosion à la conservation. *Options Méditerranéennes*, 45 : 15-27.

**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.

**Al-Faifi SA, Migdadi HM, Al-Doss A, Ammar MH, El-Harty EH, Khan MA, Muhammad JM, Alghamdi SS. (2013).** Morphological and molecular genetic variability analyses of Saudi lucerne (*Medicago sativa* L.) landraces. *Crop & Pasture Science* 64:137-146.

**Allen ON, Allen EK. (1981).** The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses and Nodulation. 1st Edn., Wisconsin, University of Wisconsin Press.

**Ameline-Torregrosa C, Wang BB, O'Bleness MS, Deshpande S, Zhu H, Rose B, Yong ND, Cannon SB. (2008).** Identification and characterization of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes in the model plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 146 :5-21.

**Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GE, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Denarie J, Gough C. (2003).** The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* 34: 495-506.

**Andersson MS, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano CE. (2006).** Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research* 96: 387-406.

**Ane JM, Levy J, Thoquet P, Kulikova O, de Billy F, Penmetsa V, Kim DJ, Debelle F, Rosenberg C, Cook DR, Bisseling T, Huguet T, Denarie J. (2002).** Genetic and cytogenetic mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 genes of *Medicago truncatula* involved in Nod factor transduction, nodulation, and mycorrhization. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 1108-18.

**Ane JM, Zhu H, Frugoli J. (2008).** Recent advances in *Medicago truncatula* Genomics, Review Article. *International Journal of Plant Genomics*, Vol 2008, 11 pages.

**Arraouadi S, Badri M, Huguet T, Aouani ME. (2006).** Caractérisation phénotypique des populations naturelles de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* (Fabaceae) issues du sud Tunisien. In « Diversité des fabacées fourragères et de leurs symbiotes », pp. 99-103.

**Baatout H, Marrakchi M, Combes D. (1991).** Genetic divergence and allozyme variation within and among populations of *Hedysarum spinosissimum* subsp. *capitatum* and sub sp. *spinosissimum* (Papilionaceae). *Taxon*, 40, 231-252.

**Baatout H, Marrakchi M, Pernes J. (1990).** Electrophoretic studies of genetic variation in natural populations of allogamous *Hedysarum capitatum* and autogamous *Hedysarum euspinosissimum*. *Plant Sci.*, 69, 49-64.

**Badri M, Ilahi H, Huguet T, Aouani ME. (2007).** Quantitative and molecular genetic variation in sympatric populations of *Medicago laciniata* and *M. truncatula* (Fabaceae) : relationships with eco-geographical factors. *Genet. Res. Camb.* 89: 107– 122.

**Badri Y, Zribi K, Badri M, Huguet T, Aouani ME. (2003).** *Sinorhizobium meliloti* nodulates *Medicago laciniata* in Tunisian soils. *Czech J. Genet Plant Breed.* 39: 178-183

**Bagavathiannan MV, Julier B, Barre P, Gulden RH, Van Acker RC. (2010).** Genetic diversity of feral alafalfa (*Medicago sativa* L.) population occurring in Manitoba, Canada and comparaison with alafalfa cultivars : an analysis ussing SSR markers phenptypic traits. *Euphytica*.173 : 419-432.

**Ballve R.M.L, Medina-Felho H.P, Braz J, Bordignon R. (1997).** Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leat petiole wing, *Genet* 20 (4).

**Baquerizot-Audiot E, Desplanque B, Prosperi JM, Santoni S. (2001).** Characterization of microsatellite loci in the diploid legume *Medicago truncatula* (barrel medic). *Molecular ecology* 1: 1-3.

**Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Flament P, Galluxi P, Genier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T. (1990).** *Medicago truncatula*, a model plant for studing the molecular genetics of the Rhizobiim\_legume symbiosis. *Plant molecular Biology Reporter*, 233 :78-93.

**Bewley JD, Black M. (1994).** *Seeds : Physiology of development and germination*, Plenum Press, New York.

**Blondel J, (2006).** Introduction à l'écologie : [www.agentdeterrain.espaces-naturel.fr/node/12](http://www.agentdeterrain.espaces-naturel.fr/node/12)

**Blondon F, Marie D, Brown S, Kondorosi A. (1994).** Genome size and base composition in *Medicago sativa* and *M. truncatula* species. *Genome*, 37 : 264-70.

- Bonnin I, Huguet T, Gherardi M, Prospéri JM, Olivieri I. (1996).** High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species *Medicago truncatula* Gaertn. using RAPDs markers. *Am J Bot*, 83 : 843-55.
- Bonnin I, Prospero JM, Olivieri I. (1996).** Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae) : a comparative analysis of population structure. *Genetics* 143:1795-1805.
- Bonnin I, Ronfort J, Wozniack F, Olivieri I. (2001).** Spatial effects and rare outcrossing events in *Medicago truncatula* (Fabaceae). *Molecular Ecology*, 10: 1371-1383.
- Broeckling CD, Huhman DV, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA, Sumner LW. (2004).** Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *Journal of Experimental Botany*, vol. 56, No. 410.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. (2003).** Beans (*Phaseolus* spp) : Model Food Legume. *Plant and Soil*, 252: 55-128.
- Brundu GAD, Camarda I, Caredda M, Garau G, Maltoni SL, Deiana P. (2004).** A contribution to the study of the distribution of *Medicago*-*Sinorhizobium* symbiosis in Sardinia (Italy). *Agricoltura Mediterranea* 134: 33-48.
- Budak H, Pedraza F, Cregan PB, Baenziger PS, Dweikat I. (2003).** Development and utilization of SSRs to estimate the degree of genetic relationships in a collection of pearl millet germplasm. *Crop Science* 43:2284–2290.
- Bullitta S, Floris R, Hayward MD, Loi A, Porqued du C, Veronesi F. (1994).** Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. *Euphytica* 77:263-268.
- Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Puhler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thebault P, Vandebol M, Weidner S, Galibert F. (2001).** Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17): 9877-9882.

**Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker, DG, (2003).** Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Rep* 22: 46-51

**Chabaud M, Larssonneau C, Marmouget C, Huguet T. (1996).** Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Rep.* 15: 305-310

**Charlesworth D. (2003).** Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 358:1051-1570.

**Chebouti A, Abdelguerfi A. (2005).** Contribution à l'étude de la floraison et de la production de gousses chez huit espèces de medic dans deux zones agro-écologique. In « Actes du séminaire international sur l'amélioration des productions végétales », pp. 216-217.

**Chebouti A, Mefti M, Abdelguerfi A. (2006).** Etude du développement végétatif et de la nodulation chez trois espèces de luzernes annuelles : *Medicago aculeata*, *Medicago orbicularis* et *Medicago truncatula*. In « Diversité des fabacées fourragères et de leurs symbiotes », pp. 104-106.

**Cherifi K, Boussaid M, Marrakchi M. (1993).** Diversité génétique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L) Krock et de *Medicago intertexta* (L) Mill. I. Analyse de la variabilité morphologique. [Genetic diversity of some natural populations of *Medicago ciliaris* (L.) Krock and *Medicago intertexta* (L.) Mill. I. Morphological variability analysis]. *Agronomie* 13:895-908.

**Cherifi K. (1996).** Polymorphisme enzymatique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krock et de *Medicago intertexta* (L.) Mill. *Acta Botanica Gallica*. 1: 165-155.

**Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR. (2004).** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 101: 15289-15294.

**Chu HG, Yan J, Hu Y, Wang HC, Li JQ. (2009).** Cross-species amplification of 92 microsatellites of *Medicago truncatula*. *Molecular ecology Resources* 10 (1) : 150-155.

**Cremer-Bach M. (1992).** Caractéristiques morphologiques et agronomiques de *Medicago* spp. annuelles autochtones au Maroc provenant de sites non alcalins. *Al Awamia*, 79, 35-49.

**Cronk Q, Ojeda I, Pennington RT. (2006).** Legume comparative genomics: progress phylogenetics and phylogenomics. *Curr opin plant Bio*, 9:99-103.

**Cui D, Xu C, Tang C, Yang C, Yu T, Cao G, Xu F, Yang C, Zang J, Han L. (2013).** Genetic structure and association mapping of cold tolerance in improved japonica rice germplasm at the booting stage. *Euphytica*. 193 :369-382.

**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.

**Dajoz R. (2003).** Précis d'écologie .Ed. Dunod, Paris, 615p.

**Dalechamps J. (1587).** *Historia generalis plantarum in librosXVII*. Ed. ApudG. Rovillum. Lugduni. 1094p.

**De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. (1989).** Occurrence of nodulation in the Leguminosae. *New Phytol.* (111) 607–619.

**Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S. (2003).** Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106: 912–922.

**Delalande M, Greene S, Hughes S, Nair R, Huguet T, Aouani ME, Prospero JM. (2007).** Wild accessions/populations. *Medicago truncatula* handbook, 1-27.

**Dénarie J, Gamas P. (2001).** La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. *Ecole thématique Biologie végétale*, 1-9.

**Derek Munro B, Ernest S. (1997).** Les légumes du Canada. *NRC Research Press*. 2: 279280.

**Diwan N, Bouton JH, Kochert G, Cregan PB. (2000).** Mapping of simple sequence repeat (SSR) DNA markers in diploid and tetraploid alfalfa. *Biomedical and life sciences. Theoretical and Applied Genetics* 101(1-2) : 165-172.

**Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu C-J, Reddy MSS, Wang L. (2004).** Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects biotic and abiotic elicitors on metabolism journal of Experimental Botany, vol. 56, No. 410.

**Downie JA. (2005).** Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol* 15: 6.

**Doyle JJ, Luckow MA. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol*, 131:900-910.

**El-Hansali M, Zinelabidine LH, Haddioui A. (2007).** Variabilité des caractères morphologiques des populations naturelles de *Medicago truncatula* Gaertn. au Maroc. [Morphological characters variability of some natural populations of *Medicago truncatula* Gaertn. in Morocco]. *Acta Botanica Gallica* 154:643-649.

**Ellegren H. (2004).** Microsatellites : Simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.

**Ellwood SR, D'souza NK, Kamphuis LG., Burgess TI, Nair RM, Olivier RP. (2006).** SSR analysis of the *Medicago truncatula* SARDI core collection reveals substantial diversity and unusual genotype dispersal throughout the Mediterranean basin. *Theor. Appl. Genet.*, 112: 977-983.

**Eujayl I, Sledge MK, Wang L, May GD, Chekhovskiy K, Zwonitzer JC, Mian MAR. (2004).** *Medicago truncatula* EST-SSRs Reveal cross-species genetic Markers from *Medicago* ssp. *Biomedical and life sciences. Theoretical and applied genetics* 108 (3): 414-422.

**Field D, Wills C. (1996).** Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proc. Biol. Sci.* 263, 209-215.

**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.

**Frugoli J, Harris J. (2001).** *Medicago truncatula* on the move. *the Plant Cell*, 13: 458-63.

**Gamas P, Niebel FDC, Lescure N, Cullimore JV. (1996).** Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*, 9: 233–242.

**Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. (2005).** Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology*, 137: 1228– 1235.

**Gimenes Gilles C. (2009).** Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale. Université d'Angers (France), 174 p.

**Gomez OJ, Blair MW, Frankow-Lindberg BE, Gullberg U. (2004).** Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sci.*44 : 1412-1418.

**Gouyon PH. (1994).** La biodiversité dans sa perspective historique, in *Le courrier de l'environnement de l'INRA* n°23, novembre 1994.

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

**Gupta PK, Varshney RK. (2000).** The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113:163-185.

**Haddioui A, Baaziz M. (2001).** Genetic diversity on natural populations of *Atriplex halimus* L. in Morocco : An isoenzyme-based overview. *Euphytica*, 121, 99-106.

**Haddioui A, Zinelabidine LH, Nouri M, Ajal E A, El Hansali M, Hanine H. (2012).** Genetic diversity of natural populations of *Medicago truncatula* in Morocco using isozyme polymorphism. *World J. Agric. Sci.* 8: 13-19.

**Halmi S. (2010).** Contribution à l'étude cytogénétique de quelques espèces du genre *Medicago* (L). Mémoire de magistère en biotechnologie végétales. Université Mentouri Constantine., 97p.

**Hamrick JL, Godt MJW. (1990).** Allozyme diversity in plant species, in : Brown A.H.D., M.T. Clegg A.L. Kahler and B.S. Weir, (Eds.), *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, Sinauer Associates, Sinauer Associates Inc, pp, 43-63, Sunderland, Massachusetts.

**Hancock JF, Grumet R, Hokanson SC. (1996).** The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. *Hortscience* 31,1080–1085.

**Handberg K, Stougaard J. (1992).** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2 :487-496.

**Haouari A, Ferchichi A. (2004).** Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique d'*Artemisia Herba-Alba* in Ferchichi A. et Ferchichi A. Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM. Cahiers Options Méditerranéennes, vol. 62 :115- 119.

**Harry M. (2001).** Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine, Paris.

**Heyn CC. (1963).** The annual species of *Medicago*. Publication of Hebrew university. Jerusalem. 12: 145-154s.

**Hippolyte Coste. (1901-1906).** Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes, Klincksieck, Paris, volumes 3.

**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 chromosomique chez 35 populations de 17 espèces. Annales de l'institut National Agronomique. El-Harrach. 12 (1) : 342-354 p.

**Holmes P, GoVard N, Weiller GF, Rolfe BG, Imin N. (2008).** Transcriptional proWling of *Medicago truncatula* meristematic root cells. *BMC Plant Biology*, 8, 21. doi: 10.1186/1471-2229-8-21.

**Jafri SMH, El Gadi A. (1980).** Flora of Libya, Ed. Al Faateh University, Faculty of science Department of Botany, Tripoli ; 304 p.

**Jarne P, Lagoda P.JL. (1996).** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11:424–429.

**Jenczewski E, Prosperi JM, Ronfort J. (1999).** Evidence for gene flow between wild and cultivated *Medicago sativa* (Leguminosae) based on allozyme markers and quantitative traits. *American Journal of Botany* 86 : 67.

**Journet EP, Carreau V, Gouzy J, Thoquet P, Rosenberg C, Barker D, Huguet T, Denarie J, Gamas P. (2001).** La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. *Ecole thématique Biologie végétale*, 8(5) : 478–484.

**Julier B, Barre P. (2005).** Les cartes génétiques chez les espèces fourragères pérennes des régions tempérées. *Fourrages*. 183 : 389-409.

**Kulikova O, Gualtierig, Geurts RA, Kim DJ, Cook D, Huguet T, De Jong JH, Fransz PF, Bisseling T. (2001).** Integration of the FISH pachytene and genetic maps of *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 27(1) : 49-58.

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

**Labadi, M, LDR Singh KB, Charrier A. (1996).** Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphisms. *Euphytica* 88: 181-188.

**Laouar M, Abdelguerfi A. (1999).** Variabilité de la production des gousses et des grains chez quelques populations spontanées de *Medicago intertexta*. *Options Méditerranéennes* 39: 111-117.

**Laouar M, Abdelguerfi A. (2003).** variabilité morphologique et phénologique chez deux taxa très proches. *Medicago ciliaris* et *Medicago intertexta*. *INRAA*. 263- 264.

**Lazrek-Ben friha F. (2008).** Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de *Medicago truncatula* et recherche de QTL liés au stress salin. Thèse De Doctorat. L'université de Toulouse. France.

**Lesins KA, Lesins I. (1979).** Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Dr. W. Junk bv Publishers, The Hague-Boston-London.

**Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debellé F. (2004).** A Putative Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science*, 303: 1361 – 1364.

**Lewin B. (1992).** *Genes*. Flammarionmédecine-science, Paris.

**Loi A, Nutt BJ, McRobb R, Ewing MA. (2000).** Potential new alternative annual pasture legume for Australian Mediterranean farming system. *Cahiers Options Méditerranéennes*, vol. 45: 51-54.

**Mathieu M. (2003).** Luzerne : culture, récolte, conservation, utilisation. *France agricole*. 5:11-16.

**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. Hort. Agr. Cluj-Napoca*. 43(1), 86-95.

**Moore G.A. (2001).** Oranges and lemons : clues of the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet.*17(9) 536-540.

**Moulet O, Fossati D, Mascher F, Schori A. (2008).** Les marqueurs moléculaires comme outils dans la sélection des céréales. *Revue Suisse Agriculture* 40(3): 133-138.

**Munns R, James RA, Lauchli A. (2006).** Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57 : 1025-1043.

**Nègre R. (1959).** Révision des *Medicago* d'Afrique du Nord. *Bull. Soc. Hist. Nat. De L'Afrique du Nord* 50,267-3 14.

**Nicholas P. (2005).** Reproductive strategies of Mediterranean annual legumes, Literature review, in <http://theses.library.uwa.edu.au/adtWU2005.0008/public/03chapter2>.

**Nordborg M. (2000).** Linkage disequilibrium, gene trees and selfing: an ancestral recombination graph with partial self-fertilization. *Genetics* 154: 923–929.

**Pakniyat H, Powell W, Baird E, Handley LL, Robinson D, Scrimgeour CM, Nevo E, Hackett CA, Caligari PDS, Forster BP. (1997).** AFLP variation in wild barley (*Hordeum spontaneum* C.Koch) with reference to salt tolerance and associated ecogeography. *Genome*40, 332–341.

**Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE. (1999).** Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96,12923–12928.

**Parizeau ME. (1997).** La biodiversité. Edition de boeck, Bruxelles.

**Petolescu, Cerasela, Nedelea, Gabriel. (2009).** Genetic Diversity Analysis of the In Vitro Regenerated Alfafa Plants Using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Romanian Society of Biological Sciences* Vol. 14, No. 6, 2009, pp. 4882-4886.

**Phan HTT, Ellwood SR, Hane JK, Ford R, Materne M, Olivier RP. (2007).** Extensive macrosynteny between *Medicago truncatula* and *Lens culinaris* ssp. *culinaris*. *theor Appl Genet*, 114 :549-558.

**Pierre. (2008).** Recherche de déterminants génétiques de la date de floraison chez la légumineuse modèle, *Medicago truncatula*. Thèse de doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique de rennes. 207p.

**Plomion C. (2003).** SSR : Microsatellites, Repetition de Sequences Simples (Simple Sequence Repeats). Principes des techniques de biologie moléculaire ; Ed. I.N.R.A. ; pp 143-146.

**Pollak E. (1987).** On the theory of partially inbreeding finite populations. I. Partial selfing. *Genetics* 117(2) :353–360.

**Popp C, Ott T. (2011).** Regulation of signal transduction and bacterial infection during root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* 14, 458-467. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.016.

**Prevost A, Wilkinson MJ. (1999).** A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet*, vol. 98: 107-112.

**Prosperi JM, Auricht GC, Genier G, Johnson RC. (2000).** The Genetic Diversity of Legumes species in the Mediterranean : *Medicago*. In the plant genetic resources of legumes in the Mediterranean Maxted N. and Bennett S. Eds Kluwer Academic publishers. Netherlands.

**Prosperi JM, Guy P, Balfourier F. (1995).** Resource génétiques des plantes fourragères et à gazon. Ed. INRA. Paris. 245 p

**Prosperi JM, Jenczewski E, Angevain M, Ronfort J. (2006).** Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Genet. Resour. Crop Evol.*53, 843–856.

- Prosperi, JM, Olivviers I, Angevain M, Nausat P. (1993).** Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétique des luzernes méditerranéennes. Le Courrier de l'environnement de l'INRA.P, 1-12.
- Pupko T, Graur D. (1999).** Evolution of microsatellites in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* : role of length and number of repeated units. *J Mol Evol* 48:313–316.
- Quezel P, Santa S. (1962).** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales.CNRS. Tome1. 4:133-137.
- Quiros CF, Bauchan GR. (1988).** The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In : Hanson AA, Barnes DK, Hill RR (eds) *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. pp 93-124.
- Radwan MS, Alfakhry AK, Al-Hasan AM. (1980).** Variation between and within species of annual medics from northern Iraq. *Egyptian Journal of Agronomy* 5 :153-159.
- Ramakrishnan MN, Hughes SJ, Ellwood S, Oliver R, Greene SL, Delalande M, Wen J, Oldroyd G. (2006).** *Medicago truncatula* stock centres. *Medicago truncatula* handbook. John Innes Centre, UK. pp. 1-18.
- Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M. (2006).** Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume : building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 6, 28.
- Rose RJ. (2008).** *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology : past, present and future. *Functional Plant Biol*, 35: 253-264.
- Russelle M. (2001).** alfalfa. *Am .Sci.*7:252-259.
- Si Ziani Y, Abdelguerfi A. (1995).** Comportement de populations de *Medicago truncatula* Gaertn. dans deux zones différentes ; relation avec les facteurs du milieu d'origine. *Cahiers Options méditerranéennes*, 12, 29-32.
- Siol M, Prosperi JM, Bonnin I, Ronfort J. (2008).** How multilocus genotypic pattern helps to understand the history of selfing populations : a case study in *Medicago truncatula*. *Heredity*, 100: 517-525.

**Small E, Jomphe M. (1989).** A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 67:3260-3294.

**Tanksley SD, Orton TJ. (1983).** Isozymes in plant genetics and breeding. Elsevier, Amsterdam.

**Tava A, Odoardi M. (1996).** Saponins from *Medicago* spp. chemical characterization and biological activity against insects. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 405,97–109.

**Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L, Cho Y, Ishli G, Mccouch SR. (2000).** Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 100 : 697-712.

**Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE. (1992).** Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Reports*, 11: 113- 117.

**Tivoli B, Baranger A, Sivasithamparam K, Barbetti MJ. (2006).** Annual *Medicago*: From a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the Nature of disease resistance. *Ann Botany*, 98: 1117–1128.

**Touil L, Guesmi K, Fares C, Zagrouba, Ferchichi A. 2008.** Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using SSR markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (15) : 1923-1928.

**Tucak M, Popović S, Čupić T, Grljušić S, Bolarić S, Kozumplik V. (2008).** Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characteristics. *Periodicum Biologorum* 110:243-249.

**Tutin TG, Heywood VH, Berges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. (1968).** *Flora Europaeae* 2, Rosaceae to umbellifereae, Ed. Cambridge, 375 p.

**Vienne. (1998).** Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA, Paris.

**Waller GR, Jurzysta M, Thorne RLZ. (1993).** Allelopathic activity of root saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L.) on weeds and wheat. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 34,1–11.

**Young ND, Mudge J, Ellis THN. (2003).** Legume genomes : more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:199-204.

**Yousfi N, Badri M, Abdelguerfi A, Aouani ME. (2006).** Effect of water stress on phenology and the production of pods and seeds for some populations of *Medicago truncatula* and *Medicago laciniata* : the behavior relationship of populations with bioclimatic factors of the environment of the origine. In « Diversité des fabacées fourragères et de leurs symbiotes », pp. 107-114.

**Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC. (2005).** Bridging model and crop legumes through comparative genomics. *Plant Physiol.* 137: 1189–1196.

**Zivković B, Radović J, Sokolović D, Xiler B, Banjanac T, Strbanović R. (2012).** Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis. *Industrial Crops and Products* 40 :285-291.

# Annexes

**ANNEXE 1. Protocole de germination**

- Mettre les grains dans 5 volumes de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), concentré pendant 8 min avec une agitation intermittente.
- Mettre les grains dans 5 volumes de 5% de sodium hypochlorite pendant 3 min
- Décant l'eau de javel sous des conditions stériles (haute à flux laminaire).
- Rincer les grains par de l'eau distillée stérile 6 à 8 fois.
- incuber les graines pendant 1 heure dans le dernier rinçage.
- une fois gonflée, elles sont déplacé sur du milieu agar (7g/l) (6.7% d'agar) et incubé à 4°C pendant 3 jours, puis à 14°C pendant 24 heures à l'abri de la lumière.

**ANNEXE 2. Extraction de l'ADN**

D'après la méthode de Doyle et Doyle 1990.

- Préchauffer le tampon **CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol** dans un bain marie à 65 °C.
- Broyer le matériel végétal (environ 150 mg) dans un mortier avec l'azote liquide (manipuler avec les gants)
- A l'aide de spatule, transférer le broyat dans un tube à vis (mettez les tubes contenant le broyat dans l'azote liquide, bien fermer les tubes)
- Ajouter **900 µL** de tampon **CTAB 2X additionné de Beta-mercaptoéthanol** préchauffé à 65 °C.
- Homogénéiser au vortex et incubé 60 min dans un bain marie à 65 °C avec agitation.
- Centrifuger 15 min à 10 000 rpm à 4 °C.
- Récupérer le surnageant (≈ 800 µL) dans un nouveau tube d'ependorf de 2 mL (stocker le culot à 4 °C à l'abri de la lumière).
- Ajouter 800 µL (1vol) **chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1)**
- Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites).
- Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'ependorf. (Éviter de prendre la couche blanche au milieu).
- Pour un meilleur résultat, répéter cette la dernière étape :**
- Ajouter 800 µL (1vol) chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1). Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites). Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C. Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'ependorf.
- Ajouter 3 à 5 µl de **RNAse A (10 mg/ml)**, agiter par inversion et incubé 30 min à 37 °C.
- Ajouter 540 µl (2/3 Vol) **d'Isopropanol froid (-20°C)**
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche.
- Laisser précipiter à -20 °C pendant 5 à 10 min.
- Centrifuger 10 min à 10000 rpm à 4 °C.
- Éliminer le surnageant très délicatement (à l'aide de micropipette)
- Ajouter 500 µl de **Solution de lavage 1**.
- Incuber pendant 15 min à température ambiante.
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Éliminer le surnageant et ajouter 500 µl de **solution de lavage 2**.
- Ne pas incubé plus de 5 min
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Éliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 min.
- Suspendre le culot d'ADN dans 100 µl de **TE 0.1X**
- Stocker l'ADN pendant une nuit à 4 °C avant dosage.

**Solutions et tampons**

Tampon CTAB 2X (pH 8) (Stocker à température ambiante)

- |                        |       |   |           |
|------------------------|-------|---|-----------|
| - CTAB                 | 20    | g | 2 % (p/v) |
| - Tris de base         | 12.11 | g | 100 mM    |
| - Na <sub>2</sub> EDTA | 7.44  | g | 20 mM     |
| - NaCl                 | 81.8  | g | 1.4 M     |
| - PVP 40               | 10    | g | 1 % (p/v) |
| - H <sub>2</sub> O up  | Qsp 1 | L |           |
- Commencer par dissoudre le CTAB à la chaleur (50°C) dans 800 ml d'eau up, puis ajouter dans l'ordre les autres produits.
  - Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl 1 M, puis compléter le volume à 1 litre.
  - Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120°C.

**Chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1)**

Pour 25 ml : Ajouter 24 ml Chloroforme + 1 ml Alcool isoamylique

**Tampon de dissolution d'ARNase**

- |                       |       |   |       |
|-----------------------|-------|---|-------|
| - Tris                | 0,12  | g | 10 mM |
| - NaCl                | 0,88  | g | 15 mM |
| - H <sub>2</sub> O up | Qsp 1 | L |       |
- Mettre sous agitation dans 900 ml d'eau up.
  - Ajuster le pH à 7.5 par addition d'HCl puis compléter au volume final avec l'eau ultra pure.
  - Aliquoter en bouteilles et stériliser 20 min à 120°C.
  - Stocker à température du laboratoire.

**RNase A (10 mg/ml)**

- Dissoudre 100 mg de **RNase A** dans 10 ml de ce tampon de dissolution.
- Aliquoter en tubes vissables de 2 ml
- Traiter 15 min à 100 °C au bain marie
- Laisser refroidir à température du laboratoire
- Stocker au congélateur à -20 °C.

**Solution Lavage 1**

- |                     |        |    |        |
|---------------------|--------|----|--------|
| - Acétate de Sodium | de 1.6 | g  | 200 mM |
| - Eau distillée     | 24     | mL |        |
- Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol
  - Ethanol 100 % Qsp 100 mL

**TE 1X (pH 8)**

- |                        |         |    |       |
|------------------------|---------|----|-------|
| - Tris de base         | 0.12    | g  | 10 mM |
| - Na <sub>2</sub> EDTA | 0.04    | g  | 1 mM  |
| - H <sub>2</sub> O up  | Qsp 100 | ml |       |
- Ajouter de l'H<sub>2</sub>O up jusqu'à 90 % du volume

- Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl fumant.
- Compléter le volume.
- Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120 °C.

Stocker à température ambiante.

Les concentrations mentionnées correspondent aux concentrations finales.

Remplir une fiche solution en notant toutes les informations disponibles. Noter date, nom du produit et numéro du lot de la solution sur le flacon.

**ANNEXE 3. CONTROLE DE QUALITE « Electrophorèse sur gel d'agarose »**

- Préparer un gel d'agarose 0.8% dans du **TBE 1X**
- Déposer 5  $\mu$ L (soit 500 ng) de chaque échantillon
- Faire migrer l'ADN 15 min. à 100V
- Colorer le gel d'agarose 10 min. dans une solution BET à 2  $\mu$ g/mL

**Attention :** le BET est un mélange puissant, respecter les consignes de sécurité et travailler avec des gants

- Prendre une photo du gel sous UV

**Attention :** les UV peuvent causer des brûlures graves, respecter les consignes de sécurité

**ANNEXE 4. Protocole expérimental pour l'analyse de l'ADN par SSR**

Préparer le mélange réactionnel (ou « Mix ») comme suit :

- Eau pure stérile	6.5	µL
- Tampon 10X	3	µL
- MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.2	µL
- dNTP mix 10 mM	2.4	µL
- Amorces (sens et anti-sens) 10 µM	1.8	µL
- Taq (2.5 U)	0.3	µL
- ADN (50 ng/µL)	3	µL
Volume finale	20	µL

Réaliser l'amplification selon le programme suivant :

Étape	Température °C	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	5 min.	1
Dénaturation	94	45 s	35
Hybridation	55	45 s	
Elongation	72	1 min.	
Elongation finale	72	10 min.	1

**Gel de Polyacrylamide à 8%**

-Acrylamide-bisacrylamide (29 :1)	3.2	mL
-Tampon TBE 5X	2.4	mL
-Eau distillée	6.4	mL
-APS (10%)	200	µL
-TEMED	10	µL

**Tampon TBE 10X**

-Tris	108	g
-Borate	55	g
-EDTANa <sub>2</sub>	7.44	g
-Eau distillée	Qsp 1	L

**Tampon de migration**

-TBE 0.5X

**Solution de révélation**

-BET (2mg/mL)	100	µL
-Eau distillée	100	mL

**ATTENTION** : Le bromure d'éthidium (BET) est dangereux par contact, inhalation et ingestion (agent mutagène), porter des gants doubles en latex ou des gants simples en nitrile.

# Résumés

## Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation et de la valorisation des ressources phylogénétiques d'intérêt agronomique en Algérie. Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des microsatellites en utilisant les méthodes d'amplification (PCR) accompagné par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ainsi que la biométrie relative à 28 accessions de l'espèce *M. truncatula*, collectées dans différents sites éco géographiques, qui couvrent une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien.

La variabilité des microsatellites a été analysée en se basant sur la matrice de présence et d'absence des bandes. Leur fréquence a été calculée pour toutes les accessions des deux amorces SSR. Les distances de Jaccard ont été calculées et des dendrogrammes ont été construits selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les 28 accessions ont été élaborées également. Pour l'analyse morphologique, des analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées.

Globalement, les accessions étudiées ont généré 18 bandes pour les deux amorces SSR, 8 bandes pour AFct32, et 10 pour AFctt1 dont le nombre et les fréquences sont variables d'une accession à l'autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, il y a quelques bandes spécifiques à certaines accessions. Le polymorphisme a été souligné par la classification hiérarchique des accessions. En revanche, l'ACP montre une grande diversité génétique entre les accessions étudiées et marque une certaine corrélation éco-géographique.

**Mots-clés :** Microsatellites, Polymorphisme, Algérie, *M. truncatula*, morphologie, PCR, AFct32, AFctt1, ADN.

## Abstract

The present work is part of the evaluation and development of plant genetic resources of agronomic interest in Algeria. Our study aims at highlighting a possible genetic variability of microsatellites using amplification methods (PCR) accompanied by electrophoresis on polyacrylamide gel, as well as biometry relating to 28 accessions of the species *M. truncatula*, collected in different eco-geographical sites, which cover a wide range of bioclimatic stages in northern Algeria.

The variability of the microsatellites was analyzed based on the presence/absence matrix of the bands. Their frequency was calculated for all accessions of the two SSR primers. Jaccard distances were calculated and dendrograms were constructed using the UPGMA aggregation method. Genetic distance matrices between the 28 accessions were also developed. For morphological analysis, principal component analysis (PCA) was performed.

Overall, the accessions studied generated 18 bands for the two SSR primers, 8 bands for AFct32, and 10 for AFctt1 whose number and frequencies vary from one accession to another. Among these, several bands were shared by two or three accessions, there are some bands specific to certain accessions. The polymorphism has been emphasized by the hierarchical classification of accessions. On the other hand, the PCA shows a high genetic diversity among the accessions studied and marks a certain ecogeographic correlation.

**Keywords:** Microsatellites, Polymorphism, Algeria, *M. truncatula*, morphology, PCR, AFct32, AFctt1, DNA.

## ملخص

هذا العمل هو جزء من تقييم وتعزيز الموارد الوراثية النباتية ذات الأهمية الزراعية في الجزائر. الهدف من دراستنا هو تسليط الضوء على التباين الجيني المحتمل للسوائل المكروية باستخدام طرق التضخيم (PCR) مصحوبة بالحلل الكهربائي للهلام متعدد الأكريلاميد، بالإضافة إلى القياسات الحيوية المتعلقة بـ 28 مدخلات من الأنواع *M.truncatula*، التي تم جمعها في مواقع جغرافية بيئية مختلفة، والتي تغطي مجموعة واسعة من المراحل المناخية الحيوية في شمال الجزائر.

تم تحليل تنوع السوائل المكروية بناءً على مصفوفة الوجود وغياب النطاقات. تم حساب تردداتها لجميع المدخلات من اثنين من بادئات SSR. تم حساب مسافات Jaccard وتم إنشاء مخططات dendrogrammes باستخدام طريقة UPGMA التجميعية. كما تم تطوير مصفوفات المسافات الجينية بين 28 مُدخلًا. للتحليل المورفولوجي، تم إجراء تحليلات المكونات الرئيسية (PCA).

بشكل عام، ولدت المدخلات المدروسة 18 نطاقًا لبادئي SSR، و 8 نطاقات لـ AFct32، و 10 لـ AFctt1، والتي يختلف عددها وتردداتها من انضمام إلى انضمام. من بين هؤلاء، تم مشاركة العديد من النطاقات من قبل اثنين أو ثلاثة مُدخلات، وهناك بعض النطاقات الخاصة بمدخلات معينة. تم التأكيد على تعدد الأشكال من خلال التصنيف الهرمي للانضمام. من ناحية أخرى، يُظهر PCA تنوعًا وراثيًا كبيرًا بين المدخلات المدروسة ويظهر ارتباطًا بيئيًا جغرافيًا معينًا.

**الكلمات المفتاحية:** الوسوائل المكروية، تعدد الأشكال، الجزائر، *M.truncatula*، مورفولوجيا، AFctt1، AFct32، PCR، الحمض النووي (ADN)

<b>Nom :</b> AIMAR LANACEUR	<b>Date de soutenance :</b> 20/09/2020
<b>Prénom :</b> Oumnia Oumnia Rana	
<b>Thème :</b> Evaluation de la diversité génétique au sein de <i>Medicago truncatula</i> Algérienne par les marqueurs morphologiques et moléculaires.	
<b>Diplôme :</b> Master en sciences alimentaires spécialité Biochimie de la nutrition	
<b>Résumé</b>	
<p>Le présent travail s’inscrit dans le cadre de l’évaluation et de la valorisation des ressources phylogénétiques d’intérêt agronomique en Algérie. Notre étude a pour objectif la mise en évidence d’une éventuelle variabilité génétique des microsatellites en utilisant les méthodes d’amplification (PCR) accompagné par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ainsi de la biométrie relative à 28 accessions de l’espèce <i>M. truncatula</i>, collectées dans différents sites éco géographiques, qui couvrent une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien.</p> <p>La variabilité des microsatellites a été analysée en se basant sur la matrice de présence et d’absence des bandes. Leur fréquence a été calculée pour toutes les accessions des deux amorces SSR. Les distances de Jaccard ont été calculées et des dendrogrammes ont été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les 28 accessions ont été élaborées également. Pour l’analyse morphologique, des analyses en composantes principales (ACP) ont été effectuées.</p> <p>Globalement, les accessions étudiées ont généré 18 bandes pour les deux amorces SSR, 8 bandes pour AFct32, et 10 pour AFctt1 dont le nombre et les fréquences sont variables d’une accession à l’autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, il y a quelques bandes spécifiques à certaines accessions. Le polymorphisme a été souligné par la classification hiérarchique des accessions. En revanche, l’ACP montrent une grande diversité génétique entre les accessions étudiés et marquent une certaine corrélation éco-géographique.</p>	
<b>Mots-clés :</b> Microsatellites, Polymorphisme, Algérie, <i>M. truncatula</i> , morphologie, PCR, AFct32, AFctt1, ADN.	
<b>Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri –Constantine</b>	
<b>Jury</b>	
<b>Présidente :</b>	S. MOUSSAOUI Maitre de Conférences UFM – Constantine
<b>Encadrante :</b>	I. MEDOUKALI Maitre de Conférences UFM – Constantine
<b>Examinatrice :</b>	A. GUENDOUZE Maitre de Conférences UFM – Constantine