



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Frères Mentouri Constantine
Faculté Sciences de la Nature et de la vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم 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 :

**Evaluation de la diversité génétique au sein de l'espèce *Trifolium angustifolium* par les marqueurs protéiques
(Albumines et globulines)**

Présenté par : KHALFALLAH Linda
LACHELAH Rokia

Soutenu le : 10/11/2020

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Dr. GUENDOUZE Assia (MCB - UFM Constantine).

Rapporteur : Dr. MEDOUKALI Imane (MCB - UFM Constantine).

Examinatrice: Dr. MOUSSAOUI Samira (MCB - UFM Constantine)

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

Avant tout, nous remercions Le BON DIEU le tout puissant de nous avoir donné le courage, la volonté et la patience pour achever ce modeste travail.

Nous adressons notre reconnaissance, à notre encadreur Mme MEDOUKALI Imane, Docteur au département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire à l'université des Frères Mentouri Constantine, pour avoir dirigé ce travail, ses judicieux conseils, ses jugements critiques, son soutien, ses encouragements, ses qualités humaines, pour sa générosité scientifique et pour sa gentillesse, nous tenons à lui exprimer toute nos gratitude. Merci d'avoir accepté de nous encadrer et de nous avoir fait confiance.

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements aux membres de jury qui ont accepté d'évaluer notre travail: Vous nous faites l'honneur d'accepter de siéger notre modeste mémoire. Veuillez accepter ce travail, engagé de notre plus grand respect.

Nous exprimons toutes nos reconnaissances à Mme GUENDOUZE A 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 MOUSSAOUI S. 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 tenons également à remercier le Directeur du laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales de l'université Frères Mentouri Constantine, M KHELIFI D. pour nous avoir permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire

Dédicace

À Allah

Le tout miséricordieux, le très miséricordieux, Le tout puissant, Qui m'a inspiré, Qui m'a guidé sur le droit chemin. Je vous dois ce que j'étais, Ce que je suis et ce que je serais Inchallah. Soumission, louanges et remerciements Pour votre clémence et miséricorde.

A mes très chers parents :

***A ma très chère mère CHELGHOUM Bahria et mon très cher père
KHALFALLAH Madjid :***

Aucune dédicace, ne pourrait exprimer avec fidélité, la profonde affection, l'estime et le respect envers les deux personnes les plus chères à mon cœur.

Vos encouragements, vos prières et vos innombrables sacrifices ont été pour moi d'une grande aide.

Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

Aujourd'hui, Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consenti pour mon éducation et ma formation.

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie.

A mon très cher frère Zoubir, ainsi qu'à ma très chère sœur Sara:

En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès.

A mes grands-parents, mes tentes, mes oncles, mes chères cousines et toute ma famille.

A mes collègues de ce travail et mes amies de vie et de promotion :

En souvenir d'agréables moments passés ensemble, et en témoignage de notre amitié. Je vous exprime par ce travail toute mon affection et j'espère que notre amitié restera intacte et durera pour toujours.

A toute personne m'ayant consacré un moment pour m'aider, me conseiller, m'encourager ou simplement me sourire. À tous ceux que j'ai omis de citer.

KHALFALLAH Linda

Dédicace

A mon très cher père qui était toujours présent avec son soutien moral et psychique.

A ma très chère mère, pour ses prières et ses sacrifices

A vous également :

Ma chères sœurs : Hiba ,Fatima et salsabil

Mon cher frère : Seif .

Ma chère amie et binôme : Linda.

Mon fiancé: Ahmed

LACHELAH Rokia

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Partie bibliographique	
1. Présentation générale des légumineuses	3
2. Présentation du genre <i>Trifolium</i>	5
2.1. Caractères généraux	5
2.2. Taxonomie et génétique	5
2.3. Position systématique	6
2.4. Distribution du genre <i>Trifolium</i>	6
2.5. Caractéristiques botaniques.....	7
3. Espèce étudiée (<i>Trifolium angustifolium</i>).....	8
3.1. Description botanique	9
3.2. Origine et distribution éco-géographique.....	10
3.3. Caractéristique de l'espèce	10
3.4. Intérêt de l'espèce étudiée.....	11
4. diversité génétique.....	11
5. les marqueurs génétiques.....	12
5.1. marqueurs morphologiques	12
5.2. marqueurs moléculaires.....	12
5.3. Les marqueurs biochimiques	13
Matériel et méthodes	
1. Matériel végétal	15
2. Méthode d'étude	16
2.1. Préparation des échantillons.....	16
2.2. Extraction séquentielle des albumines et des globulines	17
2.2.1. Délipidation de la farine	17
2.2.2. Extraction des albumines	17
2.2.3. Extraction des globulines.....	17

2.2.4. Préparation des extraits pour l'électrophorèse	17
2.3. Technique d'électrophorèse	17
2.3.1. Principe	18
2.3.2. Préparation des gels	18
2.3.3. Tampons d'électrophorèse.....	19
2.3.4. Condition de migration.....	19
2.3.5. Fixation, coloration, décoloration.....	19
2.4. Analyse des données.....	19

Résultats et Discussion

1. Analyse de la diversité génétique des 22 accessions de <i>T. angustifolium</i>	20
1.1. Albumines	20
1.1.1. Fractionnement des albumines et lecture des profils électrophorétiques.....	20
1.1.2. Fréquences des albumines	22
1.1.3. Distances génétiques.....	23
1.1.4. Classification hiérarchique.....	24
1.2. Globulines.....	25
1.2.1. Fractionnement des globulines et lecture des profils électrophorétiques.....	25
1.2.2. Fréquences des globulines.....	26
1.2.3. Distances génétiques.....	27
1.2.4. Classification hiérarchique.....	28
2. Discussion.....	29

Conclusion générale et perspectives.....	31
---	-----------

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

ABREVIATIONS

ALT	Altitude
CaCl₂	Chlorure de calcium
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGTA	Ethylène glycol tetraacetic Acid
KDa	Kilo dalton
LAT	Latitude
LON	Longitude
Mg	Milli gramme
Min	Minute
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
Rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloracétique Acide
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
UI	Micro litre
UPGMA	Unweighted pair group method arithmetic average

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Classification phylogénique des légumineuses.....	4
Figure 2 :	Distribution géographique du genre <i>Trifolium</i>	7
Figure 3 :	Les trois folioles d'une feuille de <i>Trifolium</i>	7
Figure 4 :	Diagramme florale du trèfle.....	8
Figure 5 :	<i>Trifolium angustifolium</i>	9
Figure 6 :	Illustration botanique comprenant <i>Trifolium angustifolium</i>	9
Figure 7 :	Localités géographiques des 22 accessions de l'espèce <i>T.angustifolium</i> dans le nord algérien.....	15
Figure 8 :	Profils électrophorétiques des albumines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez <i>T. angustifolium</i>	21
Figure 9 :	Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de l'espèces <i>T.angustifolium</i> selon le polymorphisme des albumines.....	24
Figure 10 :	Profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez <i>T.angustidolium</i>	26
Figure 11 :	Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de l'espèce <i>T. angustifolium</i> selon le polymorphisme des globulines.....	29

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.	Sites de collectes des 22 accessions utilisées dans cette étude.....	16
Tableau 2.	Matrice Présence/Absence, fréquences des albumines dans les 22 accessions de l'espèce <i>T. angustifolium</i>	22
Tableau 3.	Distances génétiques calculées entre les 22 accessions de l'espèce <i>T. angustifolium</i> en se basant sur les données des albumines.....	23
Tableau 4.	Matrice Présence/Absence, fréquences des globulines dans les 22 accessions de l'espèce <i>T. angustifolium</i>	27
Tableau 5.	Distances génétiques calculées entre les 22 accessions de l'espèce <i>T. angustifolium</i> . En se basant sur le polymorphisme des globuline.....	28

Introduction

L'Algérie est caractérisée par une grande diversité de climats et de milieux. Les variations de la température, de l'altitude, de la pluviosité (quantité et répartition), des types de sols (texture, salinité ...), ont permis une grande diversité d'espèces fourragères. Un très grand nombre de ces espèces poussent à l'état naturel et endémique, certaines se révèlent d'une grande valeur agronomique, car elles sont utilisées comme fourrage pour bétail ou sous forme de plantes alimentaires, d'autres ont une application médicinale (Armani, 2006).

Le genre *Trifolium* renferme plusieurs espèces qui sont bien adaptées à la croissance dans différentes régions agro-écologiques (Zohary et heler, 1984 ; gillet et taylor, 2001). Il présente une spéciation accompagnée par une diversification des structures. Ce genre est très répandu dans les régions tempérées du globe terrestre.

Notre étude s'intéresse à l'espèce *Trifolium angustifolium* qui présente un intérêt agro économique du fait de son excellente qualité fourragère et de l'enrichissement du sol par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à des bactéries symbiotiques hébergées dans leurs racines. *T. angustifolium* a longtemps été utilisé comme fourrage auto-ensemencé pour la production de foin ou le pâturage direct. Des études menées par Kamalak et Canbolat (2010) sur sa valeur nutritive ont montré qu'il contient des niveaux élevés de protéines brutes. Cependant, avec l'avancement de la maturité, sa valeur nutritive diminue. Ses faibles niveaux de tanin lui permettent d'être utilisée comme légumineuse alternative pour réduire le risque de ballonnement chez les ruminants broutés dans les pâturages. Il est également apprécié pour la production de miel. *T. angustifolium* est également reconnu comme un donneur potentiel de gènes à d'autres trèfles cultivés (*T. incarnatum*). (Driouech et al., 2008).

La description de la diversité génétique à différents niveaux hiérarchiques d'organisations peut grandement bénéficier à la biologie des populations et à la biologie de l'évolution. Cette discipline contribue à un concept intégré de la conservation de la biodiversité. Ainsi, l'information génétique est devenue un outil important pour l'étude de la variabilité génétique, et aussi pour la biologie de la conservation, au même titre que les considérations écologiques, éthiques et économiques. (Jean-Pierre 2007).

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'analyse du polymorphisme génétique des albumines et globulines au sein de vingt-deux accessions de l'espèce *T. angustifolium* collectées dans différentes régions éco-géographiques dans le nord Algérien. Pour cela nous avons utilisé la

technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). En effet cette technique est de plus en plus utilisée pour identifier des variétés, contrôler des semences et élucider certains problèmes taxonomiques (Trifi et al., 1989).

Dans notre recherche le manuscrit se décline en trois chapitres :

- Les études bibliographiques sont présentées dans le premier chapitre de ce mémoire, d'où il présente d'une façon générale l'origine du genre *Trifolium* (plus particulièrement *Trifolium angustifolium*), sa répartition, ses caractéristiques botaniques, sa génétique ainsi son intérêt et utilisations.
- Le deuxième chapitre de ce mémoire décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées pour accomplir notre objectif.
- L'interprétation et la discussion des résultats obtenus sont présentées sous forme de troisième chapitre de ce mémoire.

Partie
bibliographique

1. Présentation générale des légumineuses

Les Fabaceae, ou Leguminosae (Légumineuses) sont une famille des plantes dicotylédones, il s'agit de la troisième plus grande famille des plantes supérieures (Gepts et al., 2005), Après les Orchidaceae et les Asteraceae, avec environ 750 genres (Polhill et al., 1981). Ils comptent 20 000 espèces et réunit d'importantes espèces à graines alimentaires, fourragères et forestières (Gepts et al., 2005). Les Fabaceae occupent près de 180 millions d'hectares soit 12 à 15% de la superficie des terres arables à l'échelle mondiale (F.A.O, 2007).

Les légumineuses à grosses graines utilisées dans l'alimentation humaine comprennent le petit pois, l'haricot, le pois chiche et la lentille, ils constituent la principale source des protéines existant dans les pays en développement (zaghouane et al., 2000). Les fabacées comprennent également la majorité des plantes fourragères à savoir luzerne, trèfle, vesce, gesse, mélilot et sainfain, qui constituent une base importante de l'alimentation animale en raison de leur faible coût et de leurs qualités nutritives (Russelle, 2001).

La famille des légumineuses est très diverse avec 3 sous familles:

Les papilionoideae : est la plus grande sous-famille des légumineuses avec 13 800 espèces réparties dans 28 tribus réparties dans 478 genres (Lewis et al., 2005). Elle comprend de nombreuses espèces d'importance économique, en particulier les principales cultures des légumineuses alimentaire (haricot soja, le haricot, l'arachides, et pois...) et légumineuse fourragère Comme trèfle (*Trifolium*) et luzerne (*Medicago*). 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).

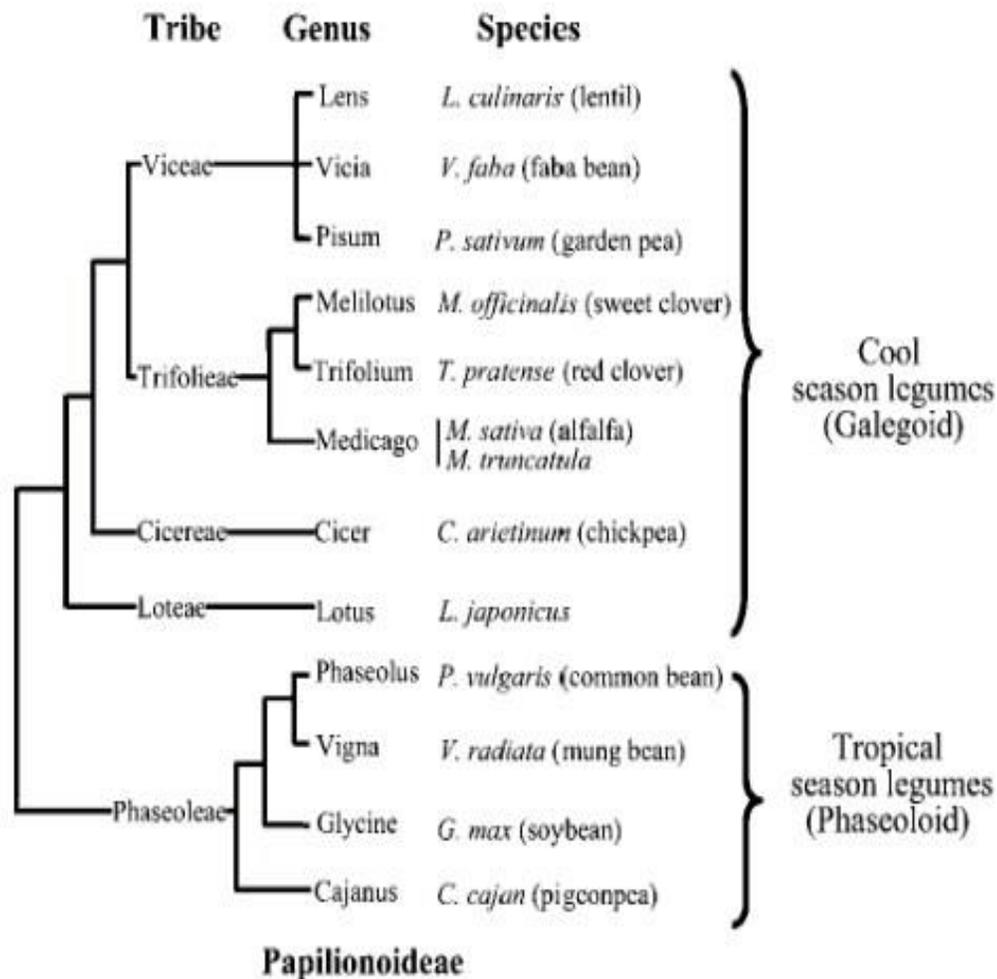


Figure 1 : Classification des légumineuses de la Sous famille des *Papilionoideae* (Zhu et al., 2005)

Les caesalpinioideae : Les espèces de cette sous-famille diversifiée se trouvent principalement dans régions tropicales et subtropicales d'Amérique du Sud, d'Afrique et Asie du Sud-Est sous forme d'arbres, certains extrêmement grands, ainsi que de lianes et arbustes. La sous-famille comprend environ 2250 espèces en 171 genres, actuellement divisés en quatre tribus: *Cercideae*, *Detarieae*, *Cassieae* et *Caesalpinieae* (Lewis et al., 2005).

Les mimosoides : sont les deuxième sous-famille des légumineuses, avec 3271 espèces (Lewis et al., 2005). Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux. Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd et al., 2001).

2. Présentation du genre *Trifolium*

2.1. Caractères généraux

Le genre *Trifolium* L : nom fait référence aux feuilles distinctives généralement composées de trois feuillettes (trifoliolés). Il appartient à l'un des plus grands groupes de la famille des Fabacées. Il contient environ 255 espèces (Zohary et Heller, 1984; Gillet et Taylor, 2001), et parmi ceux-ci les plus cultivés sont particulièrement agronomiquement importants (Coombe, 1972 ; Zohary et Heller, 1984).

Toutes les espèces sont des vivaces herbacées ou des annuelles, souvent prostrées et rarement plus de 50 cm de hauteur. Les fleurs de petite à moyenne taille (environ 0,3–2,5 cm) sont généralement disposés en capitales à têtes épineuses. Les quatre pétales inférieurs (aile et quille) sont partiellement connus et leurs griffes sont attachées au tube staminal; la partie supérieure le pétale (bannière) peut également être lié aux pétales inférieurs, et parfois à l'étamine libre (Hossain, 1961; Zohary et Heller, 1984).

2.2. Taxonomie et Génétique

Comme les autres grands genres de la famille des légumineuses (ex. *Astragalus*, *Indigofera* et *Mimosa*), une spéciation dans le genre *Trifolium* est accompagnée par une diversification des structures liées à la dispersion des graines. Contrairement à ces genres, les fruits du trèfle sont assez invariables, mais la corolle et le calice sont plus variables et responsables de la diversité des mécanismes de dispersion (Zohary, 1972).

Cette diversité florale a conduit à des propositions classiques (Presl, 1831) et récentes pour diviser le genre *Trifolium* en séries de genres plus petits (Hendrych 1976 ; 1978 ; Khokhrjakov, 1998 ; Roskov, 1990 ; Soják, 1986 ; see also Small, 1987). Presl en 1831 reconnut 9 sections, dont la majorité sont encore retenues aujourd'hui, mais certaines sous des noms différents. Les nombres de chromosomes sont connus pour au moins 184 espèces de *Trifolium* (résumées dans Taylor et al., 1979; Zohary et Heller, 1984; voir également Goldblatt et Johnson, 2003). Plus de 80% des espèces examinées ont $2n = 16$ et $x = 8$ est le nombre de base déduit du genre (Goldblatt, 1981). L'aneuploïdie ($2n=10, 12$ ou 14) est connue de 31 espèces, Dont 11 à la fois aneuploïdes et diploïdes ($2n= 16$) ou dénombrements polyploïdes.

La polyplœidie est connue de 24 espèces, dont six sont exclusivement tétraploïdes, deux sont hexaploïdes et l'un est dodécaploïde (12 x).

2.3. Position systématique

Règne: *Planta*

Embranchement : *Spermatophyte*

Sous embranchement : *Angiospermes*

Classe : Eu dicotylédones, Noyau des Eu dicotylédones, *Rosidees* , *Fabidées*

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabacée*

Genre : *Trifolium*

2.4. Distribution du genre *Trifolium*

Le genre *Trifolium* est très répandu dans le monde et représenté dans un total de quatre régions floristiques : Néotropique, Paléotropique, Holarctique et Capensis.

Il est absent de la région australasienne. Son aire de répartition peut être subdivisée en trois centres distincts : Les principaux centres se trouvent en Amérique du Nord (60–65 espèces), Afrique (25–30 espèces) et Eurasie (150–160 espèces) (Zohary et Heller, 1984).



Figure 2 : Distribution géographique du genre *Trifolium* (Medoukali, 2016)
(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trifolium_Distribution.png)

2.5. Caractéristiques botaniques

2.5.1. Appareil végétatif

Plantes herbacées généralement de petite taille, certaines rampantes, qui peuvent être vivaces, annuelles ou bisannuelles. Les feuilles sont généralement à trois folioles (parfois quatre), et sont à l'origine du nom de la plante, ces folioles sont presque toujours dentées, parfois maculées en leur centre (Figure 3).



Figure 3 : Les trois folioles d'une feuille de *Trifolium repens* (Frank vincentz, 2007)

2.5.2. Appareil floral

L'inflorescence comporte des nombreuses fleurs groupées en têtes sous forme d'une grappe, et qui ressemble soit à un capitule en boule, soit à un épi, les pédoncules s'alignant en étages serrés le long de l'extrémité de la tige. Le calice de la fleur compte cinq dents, avec une corolle typique des fabacées (étendard, ailes et carène), avec des ailes plus longues que la carène, et un étendard érigé généralement recourbé vers le haut dans la majorité des espèces. L'androcée est diadelphé (étamines assemblées en deux groupes). Le fruit typique des Fabacées, la gousse multiséminée à déhiscence longitudinale, subit une modification morphologique : elle devient pauciséminée voire uniséminée (quatre graines, trois, deux voire une : akène) et indéhiscente (Figure 4). (Michel, 2010).

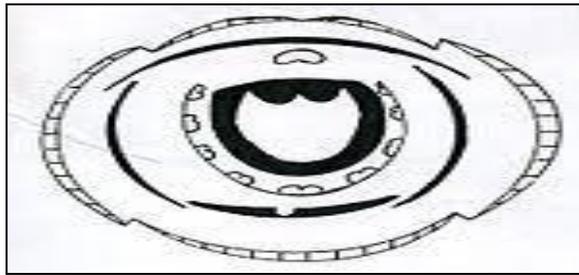


Figure 4 : Diagramme floral du *Trifolium* (Lokil, 2008)

3. L'espèce étudiée (*Trifolium angustifolium*)

Trèfle à feuilles étroites (*Trifolium angustifolium* L.) est une plante appartenant au genre *Trifolium* et à la famille des Fabacées (ou Légumineuses). Il pousse à la fin du printemps, surtout dans les régions méditerranéennes, Harshberger, 1922, et se reconnaît facilement à son inflorescence allongée, semblable à un épi de graminée, et à ses petites fleurs roses (Figure 5).



Figure 5: *Trifolium angustifolium* (Gary,2017)

3.1. Description botanique

T. angustifolium est une herbe annuelle atteignant environ 0,1 à 0,6 m de haut. Son inflorescence est un épi cylindrique de fleurs rose pâle, de 1 à 5 cm de hauteur, chaque fleur ayant un calice de sépales qui ont de longs lobes en forme d'aiguilles qui durcissent en poils lorsque la plante sèche. Son herbage a une texture velue avec des tiges solides et des feuilles trifoliées alternes avec des folioles linéaires à lancéolées atteignant 4,5 cm de long (Webb et al., 1988).

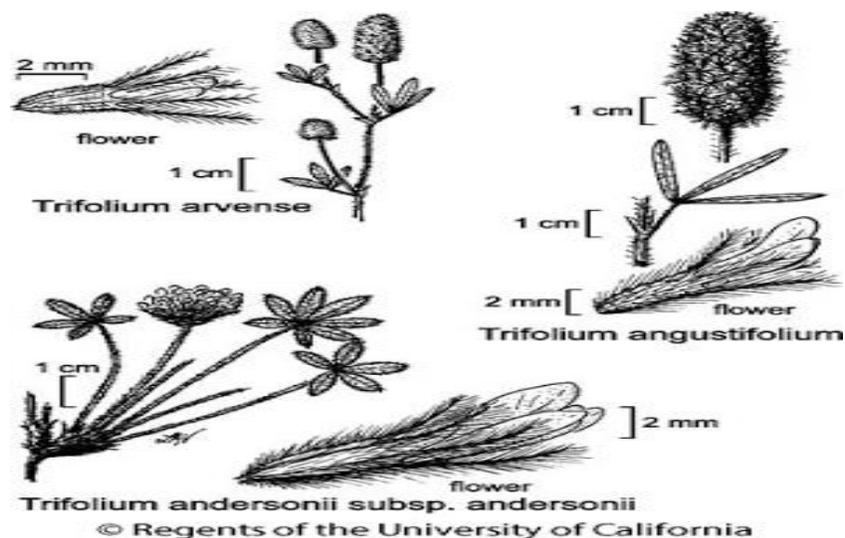


Figure 6: Illustration botanique comprenant *Trifolium angustifolium* copyright 2020 régents of the University of California

3.2. Origine et distribution Eco géographique

T. angustifolium est originaire d'Europe centrale, orientale et méridionale et des régions méditerranéennes d'Afrique et d'Asie (Harshberger, 1922; Blake, 1923; Zohary et Heller, 1984; Osborne, 2013). Il existe une certaine incertitude quant à son statut d'origine / introduite au Bélarus, en Ukraine, en Suisse, à Madère et aux îles Canaries (Lopez Poveda, 2012; Osborne, 2013; USDA-ARS, 2016). Elle s'est naturalisée dans certains pays et est considérée comme une mauvaise herbe environnementale en Australie et au Japon (Auld et al., 2003) et au Chili (Marticorena et Quezada, 1985). Cette espèce n'a pas été signalée comme envahisseur agressif.

3.3. Caractéristiques de l'espèce

3.3.1. Génétique

Le nombre de chromosomes est $2n = 16$ (Löve, 1980; CCDB, 2015).

3.3.2. Biologie de la reproduction

T. angustifolium se reproduit sexuellement par la semence. La taille des graines est relativement petite comparativement aux autres trèfles annuels et est associée à une fécondité élevée (Norman et al., 2005).

3.3.3. Physiologie et phénologie

Le taux de germination des graines de *T. angustifolium* est faible dans des environnements inadaptés, la croissance étant directement liée à la disponibilité de l'eau (Western Australian Herbarium, 2015). Cette espèce a une graine dure à long terme qui permet un risque d'échec de propagation à travers les saisons (Norman et al., 2005) car le manteau dur rend cette plante très tolérante aux facteurs abiotiques. Il a été constaté que les graines de *T. angustifolium* persistent dans le sol des forêts malgré leur absence au-dessus du sol (Erfanzadeh et al., 2013). Des études sur la germination ont montré que les solutions de fumée et de bois carbonisé améliorent la germination des graines, mais cela est affecté négativement par les applications exogènes de composés azotés et / ou de sels (Pérez-Fernández et Rodríguez-Echeverría, 2003).

3.3.4. Associations

T. angustifolium a une association symbiotique avec les bactéries *Rhizobium* fixatrices d'azote dans le sol, ce qui permet à cette plante de coloniser les zones perturbées et les sols pauvres en nutriments (Driouech et al., 2008).

3.3.5. Exigences environnementales

T. angustifolium préfère les sols secs, généralement pauvres en éléments nutritifs et perturbés (Fletcher, 2007). Il existe peu d'informations sur la tolérance au gel et à la sécheresse, cependant, le trèfle écarlate étroitement apparenté *T. incarnatum* est considéré comme sensible à ces facteurs abiotiques (Frame, 2015).

3.4. Intérêts de l'espèce étudiée

T. angustifolium a longtemps été utilisé comme fourrage auto-ensemencé pour la production de foin ou le pâturage direct. Des études menées par Kamalak et Canbolat (2010) sur sa valeur nutritive ont montré qu'il contient des niveaux élevés de protéines brutes. Cependant, avec l'avancement de la maturité, sa valeur nutritive diminue. Ses faibles niveaux de tanin lui permettent d'être utilisée comme légumineuse alternative pour réduire le risque de ballonnement chez les ruminants broutés dans les pâturages.

Ses établissements rapides et son association avec des bactéries fixatrices d'azote rendent le *T. angustifolium* approprié comme culture de couverture hivernale pour produire du fumier vert dans les systèmes de production de légumes biologiques ou à faible apport dans les régions méditerranéennes (Driouech et al., 2008). Il est également apprécié pour la production de miel.

T. angustifolium est également reconnu comme un donneur potentiel de gènes à d'autres trèfles cultivés (*T. incarnatum*)

4. Diversité génétique

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité (Parizeau, 1997).

C'est la diversité intra-spécifique (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).

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

5. Marqueurs génétiques

Un marqueur génétique est tout marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire qui permet de révéler un polymorphisme. L'identification de formes de polymorphismes dans les espèces peut aider à comprendre leurs distributions et leur évolution historique et aussi bien leur mécanisme d'interaction et leurs coévolutions avec les autres espèces (Moraes et al., 2007).

5.1. 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 influencés par l'environnement. Néanmoins, ils fournissent des informations utiles pour décrire et identifier le matériel biologique (Andersson et al., 2006).

5.2. Marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires, réputés neutres (n'agissant pas sur les caractères sélectionnés), s'affranchissent de ces facteurs confondants et peuvent permettre d'accéder à l'histoire des populations. L'analyse de la diversité génétique neutre permet de comprendre la structuration spatiale de la diversité et de construire des hypothèses sur les différents événements liés à la domestication et à la diffusion de la plante (Nordborg et al., 2005).

Les marqueurs moléculaires sont basés sur la mise en évidence de variations de séquences nucléotidiques dans l'ADN entre les individus.

Ils présentent comme avantage d'être pratiquement en nombre illimité. Leur niveau de variation (polymorphisme) est plus grand que pour les autres types de marqueurs. D'autre part, ils ne sont pas modifiés par le milieu ambiant ni par la nature de l'échantillon prélevé chez un individu. Les marqueurs moléculaires se classent en trois grands groupes : les RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), les 37 marqueurs basés sur la PCR (Polymerase Chain Reaction) et les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

5.3. Marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques (protéines, iso enzymes...) sont des éléments génétiques issus de l'expression biochimique des gènes, apparus vers 1970, et sont déterminés non seulement par les gènes mais souvent par l'état de développement physiologique ainsi que par l'organe et le milieu où il se trouve (Harry, 2001).

Les marqueurs biochimiques sont donc des moyens d'étude de facteurs génétiques et non génétiques parce qu'ils permettent de détecter l'influence de l'environnement et du milieu sur le génotype et aident donc à mieux différencier les populations.

5.3.1. Marqueurs enzymatiques

Les marqueurs iso enzymatiques (nommés ainsi par market et moller, 1959) définissent un polymorphisme de nature biochimique associée aux différentes formes alléliques d'une même enzyme. Chez plusieurs espèces cultivées, plusieurs marqueurs iso enzymatiques ont contribué à l'élaboration des cartes génétiques (Marchand, 1999).

Le terme iso enzyme englobe les multiples formes moléculaires d'une enzyme donnée, catalysant toutes la même réaction. Ces protéines des formes, des masses moléculaires ou de points isoélectriques différents, résultent des variations dans la composition en acides aminés qui dépend elle-même de la séquence des nucléotides de leurs gènes respectifs. Par conséquent leur mobilité électrophorétique est différente (El Aoufir, 2001).

5.3.2. Marqueurs protéiques

Les protéines consistent en un mélange complexe des protéines extractibles (variable selon le protocole suivi) présente au moment du prélèvement dans les tissus analysés (Prat et al., 2006). La séparation électrophorétique des protéines solubles est largement exploitée pour mettre en évidence les polypeptides caractéristiques d'un individu (Riousset, 2001) l'analyse de leur polymorphisme a constitué une nouvelle approche dans la classification des individus et par là dans l'identification et la différenciation des organismes (Prat et al., 2006). Les protéines de réserve représentent un outil macromoléculaire d'une haute importance, en effet sont utilisées comme marqueurs biochimiques, en biotechnologie végétale permettant ainsi: l'identification des variétés et des espèces végétales, l'étude de la variabilité et du polymorphisme génétique inter et

intra spécifique, l'étude des protéines donne un accès direct vers la génomique, ce qui permet de cibler les molécules et les gènes d'intérêt.

- **Albumines**

Les albumines représentent (10 à 20%) des fractions protéiques des légumineuses. La protéine précurseur est composée de trois sous-unités, d'environ 14, 24 et 46 KDa liées par des ponts disulfures (shewry et al., 1995), relativement riches en acides aminés soufrés et en lysines. D'après l'étude de Salmanowicz (2000) leurs poids moléculaires varient de 4000 Da à 7000 Da et de 8000 Da à 11000 Da. Blagrove et Gillespie (1978) ont montré que les albumines contiennent les plus hauts niveaux de plusieurs acides aminés essentiels y compris la cystine et particulièrement la méthionine par rapport aux globulines. La fraction albumine contient la plupart des enzymes présents dans les graines (Applewhite, 1989).

- **Globulines**

Représentent 50 à 65% de l'azote totale des légumineuses (Wenzel et al., 1993), leurs compositions en acide aminés soufrés et leur teneur en arginine est faible, elles ont une structure spatiale complexe et peuvent se lier ou se dissocier selon les conditions du milieu.

Chez les légumineuses, la fraction des globulines est déterminée essentiellement par les légumines, les vicillines, convicillines et les lectines.

- Les légumines sont des molécules hexamériques 350 à 400 KDa, elles sont composées de 6 sous unités bi caténares de 60 KDa (Lawrence et al., 1994).
- Les vicillines sont des protéines trimériques dont la masse varie entre 150 et 200 KDa.
- Les convicillines présentent une structure tétramérique et leurs polypeptides Constitutifs ont une masse d'environ 280 KDa, la forme finale de la protéine à une masse d'environ de 750 KDa.
- Les lectines, sont des protéines toxiques qui se lient de façon irréversible aux glycoprotéines, ils sont considérés comme d'excellents outils macromoléculaires, ce sont des protéines de défense contre les insectes et les herbivores et possèdent donc des propriétés insecticides (Foriers et al., 1996).

*Matériel et
méthodes*

Cette partie est consacrée à la description du matériel végétal utilisé dans la présente étude ainsi que les techniques adoptées.

1. Matériel végétal

Notre étude est menée sur des graines matures de vingt-deux accessions d'une espèce du genre *Trifolium* (*T. angustifolium*). Ces accessions ont été collectées dans vingt-deux sites éco-géographiques représentant une large gamme des étages bioclimatiques dans le Nord Algérien (Figure 7). Cette collection a pour avantage le fait que les sites prospectés présentent différents climats et subissent des contraintes abiotiques diverses (Tableau 1).

Les principales caractéristiques de chaque site ALT (Altitude), LAT(Latitude), LON (Longitude) sont détaillées dans le tableau 1.



Figure 7 : Localités géographiques des 22 accessions de l'espèce *T. angustifolium* dans le nord Algérien.

Tableau 1. Sites des collectes des 22 accessions de *T. angustifolium* utilisées dans cette étude

N°	Site de collecte	ALT	LAT	LON
TA1	Skikda/ Ouedrigha	32	36° 53'46,84"N	7° 03'56,20"E
TA2	Medea	385	36° 20'33,96"N	2° 46'04,83"E
TA3	Sidi bel Abbes	465	35° 14'20,82"N	0° 37'03,24"E
TA4	Bouira/ Akhdaria	144	36° 34'38,26"N	3° 33'16,25"E
TA5	Bouira	537	36° 22'09,18"N	3° 51'33,64"E
TA6	TiziOuzou	129	36° 43'54,04"N	4° 17'54,66"E
TA7	Ain Defla	257	36° 09'57,25"N	1° 43'25,04"E
TA8	Guelma	798	36° 22'08,93"N	7° 13'59,93"E
TA9	Tipaza	203	36° 34'48,16"N	2° 34'06,74"E
TA10	Tissemsilt	575	36° 00'36,95"N	2° 09'11,39"E
TA11	Annaba	132	37° 02'56,98"N	7° 23'19,39"E
TA12	Constantine/ BeniHemiden	429	36° 31'04,89"N	6° 33'52,68"E
TA13	Constantine/ Chettaba	850	36° 18'08,13"N	6° 27'50,96"E
TA14	Constantine/ Chaaberessas	584	36° 20'20,08"N	6° 37'27,04"E
TA15	Mila/ Bab Trouche	823	36° 21'48,77"N	6° 19'56,83"E
TA16	Mila/ OuedAthmenia	757	36° 16'17,87"N	6° 16'36,31"E
TA17	Chlef	135	36° 14'45,30"N	1° 14'17,86"E
TA18	Bejaia	207	36° 30'03,58"N	4° 34'28,30"E
TA19	Alger/ Mohammadia	3	36° 44'21,62"N	3° 08'50,41"E
TA20	Alger/ Ben Aknoun	172	36° 44'00,09"N	3° 01'33,28"E
TA21	Boumerdes	20	36° 44'52,57"N	3° 41'42,29"E
TA22	Jijel/ Parcanimalier	21	36° 47'26,38"N	5° 39'46,16"E

2. Méthodes d'étude

2.1. Préparation des échantillons

La procédure appliquée consiste à extraire séquentiellement les protéines dans un échantillon de graines finement broyé à l'aide d'un mortier. La farine obtenue a été récupéré dans des tubes d'appendorf (l'équivalent de 10 mg de farine par tube).

2.2. Extraction séquentielle des albumines et des globulines

Différents protocoles expérimentaux ont été pratiqués pour procéder à l'extraction des albumines et des globulines à partir de chaque échantillon. La mise au point du protocole d'extraction a été réalisée selon la technique établie par (Franco et al., 1997) et modifiée au niveau du laboratoire. Cette procédure est décomposée en plusieurs étapes décrites ci-dessous:

2.2.1. Délipidation de la farine

10 mg de farine contenue dans des tubes d'ependorf sont mélangés à environ 300 μ l de n-hexane. Après 30 min d'agitation à température ambiante ce mélange est centrifugé, Le n-hexane contenant dans le surnageant est évacué, décanté et le culot est séché.

2.2.2. Extraction des albumines

Le résidu de délipidation est mélangé avec 250 μ l d'une solution d'eau distillée, pH 8, contenant 10 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 et 1 mM PMSF et agité pendant 30 min à 4°C avant d'être centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. Le culot de centrifugation est soumis deux fois à l'extraction comme précédemment. Le surnageant est récupéré comme solution contenant la fraction albumines.

2.2.3. Extraction des globulines

Le résidu d'extraction des albumines est mélangé avec 250 μ l d'une solution 0.1 M TrisHCl, pH8, contenant 10 % (w/v) NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA et 1 mM PMSF. Le mélange est agité 30 min à 4°C puis centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est récupéré comme solution contenant la fraction globulines.

2.2.4. Préparation des extraits pour l'électrophorèse

Les deux fractions extraites ont été précipités en y ajoutant de l'acétone froide. Après 1 heure de contacte à -20°C, les protéines précipitées ont été séparées du surnageant par centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min puis portées à 37°C pendant 15 min. Les culots protéiques ont été mis en suspension dans 100 μ l de tampon de charge Tris-HCl pH 6.8 contenant 2% SDS, 40% glycérol, 0.02% bleu de bromophéno. Les échantillons ont été agités brièvement avant d'être incubés à 65°C pendant 30 min pour permettre la complexion du SDS et soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) à raison de 15 μ l par puits.

2.3. Technique d'électrophorès

La technique d'électrophorèse utilisée est celle proposée par Laemmli (1970) modifiée par Singh et al. (1991). La séparation se fait sur gel vertical en système discontinu, dans des conditions dénaturantes (présence de l'agent anionique SDS) non réductrices (absence d'agents réducteurs).

2.3.1. Principe

L'électrophorèse est une technique connue depuis 1930, permettant la séparation des constituants d'un mélange protéique sous l'action d'un champ électrique. Elle utilise le caractère amphotère des protéines du a la présence des radicales amines et carboxyliques dans la molécule. A pH supérieur à leur PHi moyen (pH en général 8,2 à 8,6), les protéines sont toutes chargées négativement et se comportent comme des anions par suite de l'ionisation des groupements carboxyliques des AA dicarboxyliques (glutamine et acide aspartique). Sous l'action d'un champ électrique, elles vont migrer vers l'anode (+). La mobilité des protéines est en fonction de :

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

2.3.2. Préparation des gels

Les plaques de verre qui servent de moule pour la polymérisation des gels sont nettoyées à l'éthanol. Elles sont ensuite assemblées avec deux espaceurs d'une épaisseur de 1,5mm chacun. Le support d'électrophorèse est formé d'un gel de séparation (separating gel) à T1 = 12,58 % et C2 = 0,97 %, et d'un gel de concentration (stacking gel) à T = 2,88 % et C = 1,42 %. Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 40% (p/v), de N, N'-méthylène bisacrylamide à 2% (p/v) et de Tris-HCL 1M, tamponnés à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence du TEMED et de l'APS. Le gel de séparation est préparé le premier, bien mélangé puis coulé entre deux plaques en verre, en laissant un vide de 4 cm pour le stacking gel. Une fine couche du butanol est ajoutée pour niveler le gel et pour le protéger de l'air. La polymérisation s'effectue à une température ambiante pendant environ 45 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé, et des peignes à 15 puits sont rapidement insérés. Après la polymérisation du stacking gel qui s'effectue en plus de 60 minutes, les peignes sont enlevés en obtenant ainsi des puits servant pour les dépôts des extrais protéiques, les puits sont remplis avec du tampon avant le dépôt des échantillons.

2.3.3. Tampon d'électrophorèse

Après dépôt des échantillons, la cuve d'électrophorèse est remplie avec un volume suffisant de tampon de migration Tris 25 mM pH 8,3 contenant 1.4 % (p/v) de glycine et 0,1% (p/v) de SDS.

2.3.4. Conditions de migration

La température de la cuve est maintenue aux environs de 4°C grâce à un système de refroidissement qui lui est raccordé. Pour une cuve de deux gels de 180 x 160 x 1,5mm de dimension chacun, la migration est menée à une intensité de courant de 80 mA avec une tension maximale de 1200 V.

2.3.5. Fixation, coloration et décoloration

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

2.4. Analyse des données

Les profils électrophorétiques sont comparés après lecture de la mobilité des bandes obtenues. Toutes les analyses reposent sur la matrice de présence (1) absence (0) des bandes. Les différents échantillons étudiés sont comparés par paire et les distances génétiques ont été calculées en utilisant l'indice de Jaccard. À partir des distances génétiques calculées, une classification hiérarchique en UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) a été élaborée moyennant le logiciel Xlstat 2014.

*Résultats et
Discussion*

Notre travail consiste à l'étude de la diversité génétique des deux fractions albumines et globulines chez *T. angustifolium*. Pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse en conditions dénaturantes non réductrices (SDS-PAGE) décrite par Laemmli (1970) modifié par Singh et al., (1991).

1. Analyse de la diversité génétique des 22 accessions de *T. angustifolium*

L'analyse des diagrammes électrophorétiques met en évidence des différences entre les vingt-deux accessions de *T.angustifolium*.

L'ensemble des mobilités relatives des bandes ont été exploité pour l'établissement des matrices fondées sur un caractère qualitatif (présence (1) et absence (0) de toutes les bandes examinées. Ces matrices représentent les configurations des albumines et des globulines, et permettent de conserver une image réelle des gels. Elles peuvent aussi servir comme base de données pour l'établissement d'un catalogue et ont de ce fait une application directe dans l'identification.

La variabilité des protéines a été analysée en reportant sur la matrice de présence et absence des bandes. Leurs fréquences ont été calculées à travers toutes les accessions. Pour chaque fraction protéique, les distances ont été calculées en se basant sur l'indice de Jaccard et un dendrogramme a été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les accessions ont été élaborées également.

1.1. Les albumines

1.1.1. Fractionnement des albumines et lecture des profils électrophorétiques

Les profils des albumines obtenus révèlent un polymorphisme entre les accessions étudiées, avec des bandes bien décelées et une bonne résolution du gel. La figure 8 représente le profil obtenu quand la migration est arrêtée au moment où le front de bleu de bromophénol atteint la limite du gel. Le diagramme se subdivise en trois principales zones de mobilité décroissante 1,2 et 3.

- **Zone (1)** : C'est la zone la plus lente puisqu'elle représente les bandes qui ont un poids moléculaire supérieure ou égale à 100 kDa. Les bandes dans cette zone sont bien séparées et ont des intensités différentes.

- **Zone (2)**: c'est la zone intermédiaire ou la majeure partie des albumines sont localisées avec grandes quantités, cette zone est caractérisée par une variabilité relative des profils tant pour le nombre que pour l'intensité des électro morphes.

• **Zone (3)** : C'est la zone la plus rapide, se particularise par un nombre des bandes moins intenses que les bandes de la deuxième zone. Ces bandes sont bien séparées dont leurs poids moléculaires est moins de 25 KDa.

Ces 3 zones sont caractérisées par les gammes de mobilité suivantes :

$$10 \text{ mm} < \text{Zone 1} < 60 \text{ mm}$$

$$60 \text{ mm} < \text{Zone 2} < 125 \text{ mm}$$

$$125 \text{ mm} < \text{Zone 3} < 170 \text{ mm}$$

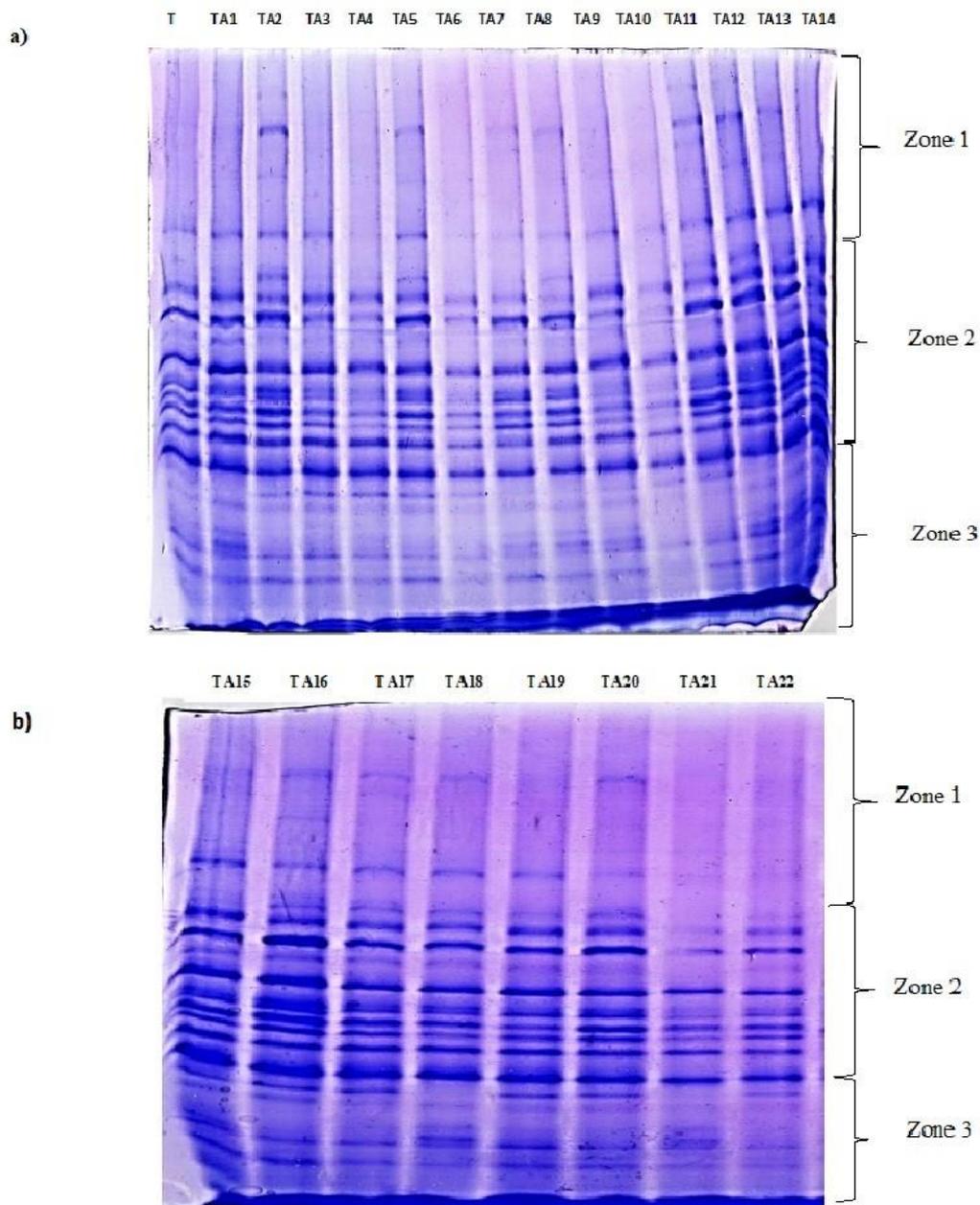


Figure 8 : Profils électrophorétiques des albumines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez vingt-deux accessions de *T. angustifolium*.

1.1.2. Fréquences des albumines

Les différentes bandes des albumines observées ont été variables d'une accession à une autre et à travers les trois zones qui ont été obtenus. 22 bandes ont été numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide. La matrice présence/absence, les mobilités et les fréquences des albumines détectées dans les 22 accessions de l'espèce *T.angustifolium* sont données dans tableau 2. Les bandes (B4, B7, B8, B10, B11, B12, B1, B14, B15, B16, B18 et B21) sont monomorphes, elles sont présentes dans toutes les accessions avec une valeur de fréquence égale à 1, ce qui montre leur dominance dans la zone 2 et 3. Suivies par les bandes (B1, B6, B9, B17 et B22) avec des fréquences moins élevées (varient entre 0.7 et 0.9). Des fréquences moyennes (0.5) ont été également enregistrées dans ces bandes (B3, B5, B19 et B20). La plus faible fréquence (0.09) a été observée dans une seule bande (B2) qui est présente dans deux accessions uniquement, (TA16) d'Oued Athmenia (Mila) et (TA18) de Bejaia.

Tableau 2. Matrice Présence/Absence, et fréquences des albumines dans les 22 accessions de l'espèce *T. angustifolium*

Bande	TA 1	TA 2	TA 3	TA 4	TA 5	TA 6	TA 7	TA 8	TA 9	TA 10	TA 11	TA 12	TA 13	TA 14	TA 15	TA 16	TA 17	TA 18	TA 19	TA 20	TA 21	TA 22	Somme	fréquence
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	16	0,7
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	2	0,09
3	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	11	0,5
4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
5	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	12	0,5
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	20	0,9
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
9	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	19	0,8
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	20	0,9
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
19	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	11	0,5
20	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	12	0,5
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21	0,9

1.1.3. Distances génétiques

La comparaison par pair entre les 22 accessions étudiées a été réalisée sur la base des profils des albumines en utilisant l'indice de Jaccard. Les valeurs de distances génétiques sont présentées dans le tableau 3. Les chiffres enregistrés variaient entre 0.00 et 0.40 avec une distance moyenne de 0.20, ce qui signifie la présence d'une diversité importante entre les accessions de *T. angustifolium* de point de vue des albumines.

Une similarité totale des profils des albumines a été notée entre les accessions (TA11/TA19), (TA4/TA5), (TA1/TA9), (TA13/TA14), (TA3/TA17), (TA3/TA21) et (TA17/TA21). En revanche, la distance la plus élevée ($d = 0.40$) a été observée entre TA11 et TA19 qui sont prélevées dans des sites géographiques relativement distants : Annaba caractérisé par une altitude de 132 et Alger/Mohammadia avec 3 d'altitude, respectivement. Des distances intermédiaires ont été obtenues pour d'autres couples d'accessions comme c'est montré dans le tableau 3.

Tableau 3. Distances génétiques calculées entre les vingt-deux accessions de l'espèce *T. angustifolium* en se basant sur les données des albumines

	TA1	TA2	TA3	TA4	TA5	TA6	TA7	TA8	TA9	TA10	TA11	TA12	TA13	TA14	TA15	TA16	TA17	TA18	TA19	TA20	TA21	TA22
TA1	0	0,048	0,143	0,200	0,200	0,095	0,190	0,050	0,000	0,095	0,350	0,190	0,095	0,095	0,143	0,048	0,143	0,143	0,050	0,150	0,143	0,250
TA2		0	0,095	0,238	0,238	0,048	0,143	0,095	0,048	0,048	0,381	0,143	0,048	0,048	0,095	0,091	0,095	0,182	0,095	0,190	0,095	0,286
TA3			0	0,158	0,158	0,050	0,053	0,190	0,143	0,143	0,316	0,053	0,143	0,143	0,190	0,182	0,000	0,100	0,190	0,105	0,000	0,381
TA4				0	0,000	0,200	0,211	0,158	0,200	0,200	0,188	0,111	0,200	0,200	0,158	0,238	0,158	0,158	0,250	0,059	0,158	0,278
TA5					0	0,200	0,211	0,158	0,200	0,200	0,188	0,111	0,200	0,200	0,158	0,238	0,158	0,158	0,250	0,059	0,158	0,278
TA6						0	0,100	0,143	0,095	0,095	0,350	0,100	0,095	0,095	0,143	0,136	0,050	0,143	0,143	0,150	0,050	0,333
TA7							0	0,238	0,190	0,190	0,278	0,105	0,190	0,190	0,238	0,227	0,053	0,150	0,238	0,158	0,053	0,350
TA8								0	0,050	0,143	0,316	0,150	0,050	0,050	0,100	0,095	0,190	0,190	0,100	0,105	0,190	0,211
TA9									0	0,095	0,350	0,190	0,095	0,095	0,143	0,048	0,143	0,143	0,050	0,150	0,143	0,250
TA10										0	0,350	0,190	0,095	0,095	0,050	0,136	0,143	0,227	0,143	0,238	0,143	0,250
TA11											0	0,278	0,350	0,350	0,316	0,381	0,316	0,316	0,400	0,235	0,316	0,250
TA12												0	0,100	0,100	0,150	0,227	0,053	0,150	0,238	0,056	0,053	0,350
TA13													0	0,000	0,050	0,136	0,143	0,227	0,143	0,150	0,143	0,250
TA14														0	0,050	0,136	0,143	0,227	0,143	0,150	0,143	0,250
TA15															0	0,182	0,190	0,273	0,190	0,200	0,190	0,211
TA16																0	0,182	0,095	0,095	0,190	0,182	0,286
TA17																	0	0,100	0,190	0,105	0,000	0,381
TA18																		0	0,190	0,105	0,100	0,381
TA19																			0	0,200	0,190	0,211
TA20																				0	0,105	0,316
TA21																					0	0,381
TA22																						0

1.1.4. Classification hiérarchique

Un dendrogramme UPGMA basé sur la matrice de dissimilarité de Jaccard des albumines a été construit (Figure 9). Cette classification hiérarchique a montré la présence de quatre groupes majeurs au niveau $d = 0.16$. Le premier groupe renferme 9 accessions au niveau de distance $d = 0.12$, Ces 9 accessions ont la particularité d'être collectées dans régions allant du centre jusqu'à l'Est du Nord Algérien avec une gamme des étages bioclimatiques relative (de l'hyper-humide jusqu'au subhumide), sauf TA10 (Tissemsilt) est à l'origine du ouest de l'Algérie. Ce premier groupe est subdivisé lui-même en deux sous-groupes à des niveaux de distance proches, sans corrélation logique avec les origines géographiques des accessions. Le groupe deux est constitué de 11 accessions collectées dans des régions allant du centre jusqu'à l'Ouest du Nord Algérien appartenant à différents climats (varient du hyper-humide au semi sec) à l'exception de Constantine (Beni Hemiden) TA10 qui représente le coté Est. Il est subdivisé lui-même en deux sous-groupes à la valeur de distance $d = 0.15$. L'accession TA11 représente le troisième groupe, qui est collectée dans une région hyper humide de Annaba. Ce groupe est lié avec le quatrième groupe (TA22) qui est collectée dans une région hyper humide aussi (Jijel) avec le degré le plus élevé de distance génétique ($d = 0.25$).

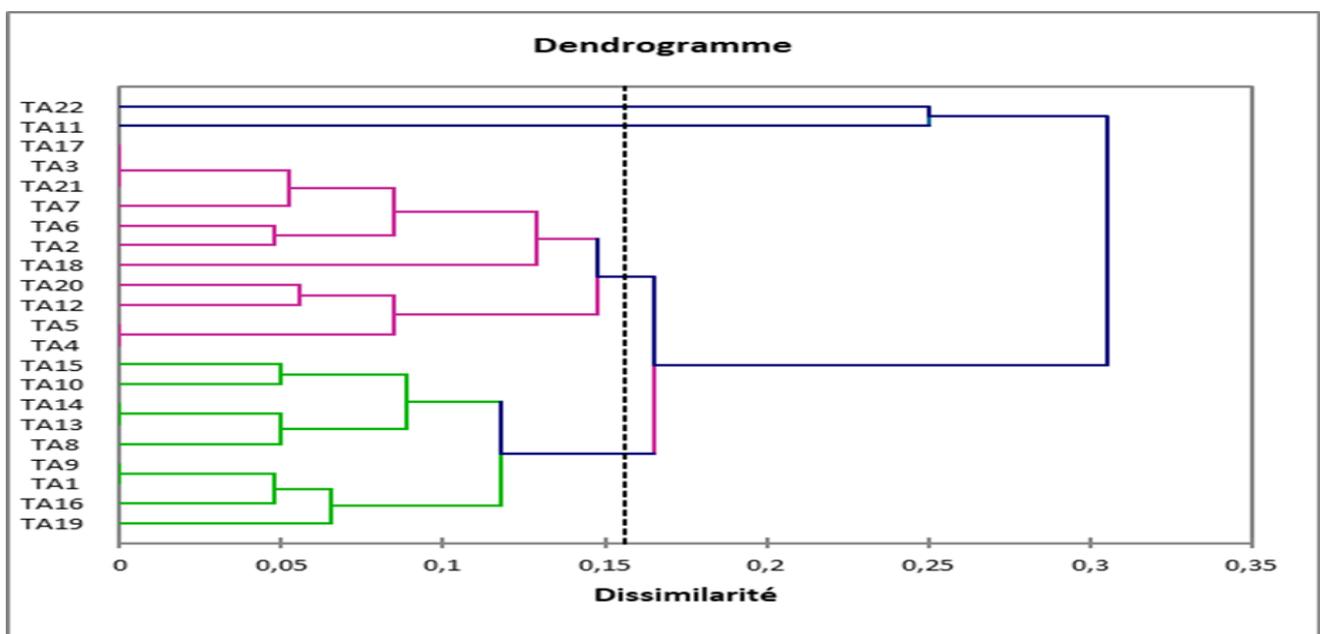


Figure 9 : Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de l'espèce *T. angustifolium* selon le polymorphisme des albumines.

1.2. Les globulines

1.2.1. Fractionnement des globulines et lecture des profils électrophorétiques

Le diagramme des globulines est montré par la figure 10, se décompose en trois principales zones de mobilité décroissante 1,2et 3

- **Zone (1)** : C'est la zone la plus lente, et qui représente des poids moléculaires supérieure ou égale à 100 kDa. Cette zone est caractérisée par la présence d'un nombre moindre de bandes des globulines qui sont moins visible.

- **Zone (2)** : les globulines sont localisées majoritairement dans cette zone de mobilité avec une considérable variabilité qualitative et quantitative des profils et un poids moléculaire s'étend approximativement de 25 à 100 KDa.

- **Zone (3)** : cette zone est particularisée par un nombre moindre de globulines avec un poids moléculaire moins de 25 KDa. C'est la zone la plus rapide.

Ces 3 zones sont caractérisées par les gammes de mobilité suivantes :

10 mm < Zone 1 < 50mm

50 mm < Zone 2 < 115mm

115 mm < Zone 3 < 170 mm

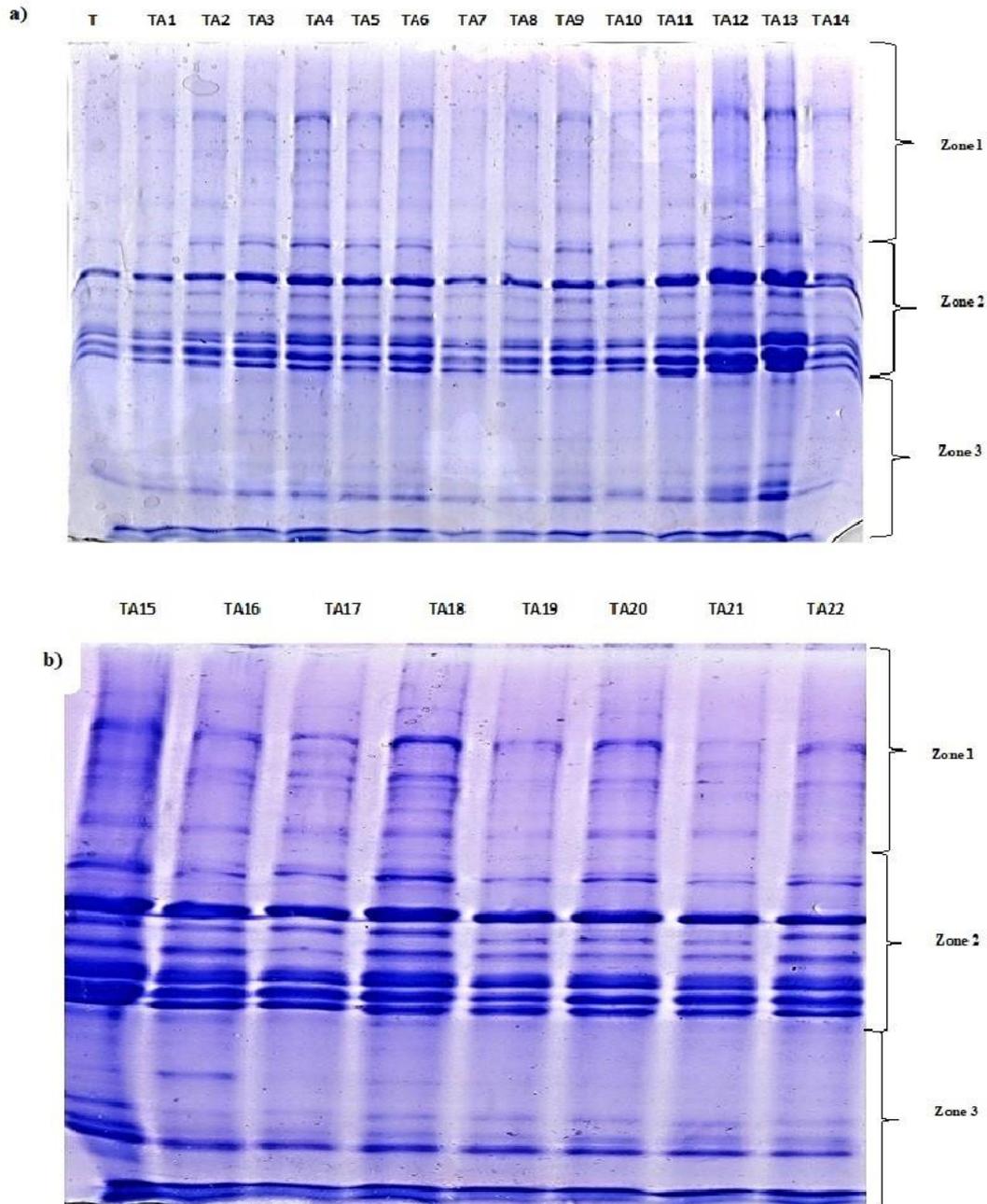


Figure 10 : Profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez *T. angustifolium*

1.2.2. Fréquences des globulines

À travers les 22 accessions analysées, un total de 25 bandes de fréquences différentes a été détecté pour l'espèce *T. angustifolium* (Tableau 4). D'après le tableau ci-dessous, nous notons un polymorphisme important des globulines. 11 bandes monomorphes (B1, B8, B9, B12, B15, B16, B18, B19, B20, B22 et B23) avec des fréquences d'une valeur de 1. Des fréquences intermédiaires de 0.6 à 0.9 ont été enregistrées dans six bandes considérées polymorphe (B6,

B13, B21, B4, B10 et B25) dont les fréquences sont respectivement 0.6, 0.8, 0.8, 0.9, 0.9 et 0.9. Les fréquences faibles (0.1 à 0.09) ont été enregistrées dans trois bandes (B2, B3 et B14) dont les fréquences sont respectivement 0.09, 0.1, 0.1 et 0.1. La plus faible fréquence (0.04) a été observée pour la bande B11 et B24, Cette dernière se trouve dans une seul accessions (TA10) provenant de Tissemsilt.

Tableau 4. Matrice Présence/Absence, et fréquences des globulines dans les 22 accessions de l'espèce *T. angustifolium*

Bandes	TA1	TA2	TA3	TA4	TA5	TA6	TA7	TA8	TA9	TA1	TA2	TA2	TA2	somme	fréquences										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2												
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0,1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0,1
4	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21	0,9
5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	0,6
6	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0,09
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21	0,9
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,04
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	18	0,8
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	4	0,1
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	18	0,8
20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,04
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21	0,9

1.2.3. Distances génétiques

Les dissimilarités entre les 22 accessions de *T. angustifolium* ont été calculées sur la base des données des globulines en utilisant la distance de Jaccard comme coefficient (Tableau 5). Les distances entre les différentes accessions ont été plus ou moins importantes vue les valeurs enregistrées qui variaient entre 0.00 et 0.455 avec une moyenne de 0.222

Une similarité totale des profils des globulines a été observée entre 27 couple d'accessions [(TA1/TA2), (TA1/TA3), (TA2/TA3), (TA4/TA6) ...Ets] avec une valeur de distance de 0.0 (Tableau 5). La distance génétique la plus élevée (0.455) a été obtenue entre

TA10 et TA18 qui sont collectées dans des régions éco-géographiquement proches à Tissemsilt avec une altitude de 575 et Bejaia de 207 d'altitude, pour les deux accessions respectivement. Des distances intermédiaires ont été enregistrées pour d'autres couples d'accessions (Tableau 5).

Tableau 5. Distances génétiques calculées entre les 22 accessions de l'espèce *T. angustifolium* en se basant sur le polymorphisme des globulines

	TA1	TA2	TA3	TA4	TA5	TA6	TA7	TA8	TA9	TA10	TA11	TA12	TA13	TA14	TA15	TA16	TA17	TA18	TA19	TA20	TA21	TA22
TA1	0	0,000	0,000	0,059	0,111	0,059	0,000	0,063	0,000	0,350	0,000	0,111	0,059	0,059	0,111	0,059	0,111	0,167	0,111	0,222	0,222	0,263
TA2		0	0,000	0,059	0,111	0,059	0,000	0,063	0,000	0,350	0,000	0,111	0,059	0,059	0,111	0,059	0,111	0,167	0,111	0,222	0,222	0,263
TA3			0	0,059	0,111	0,059	0,000	0,063	0,000	0,350	0,000	0,111	0,059	0,059	0,111	0,059	0,111	0,167	0,111	0,222	0,222	0,263
TA4				0	0,056	0,000	0,059	0,118	0,059	0,381	0,059	0,056	0,000	0,000	0,056	0,000	0,056	0,111	0,056	0,167	0,167	0,211
TA5					0	0,056	0,111	0,167	0,111	0,409	0,111	0,105	0,056	0,056	0,105	0,056	0,105	0,158	0,000	0,211	0,211	0,250
TA6						0	0,059	0,118	0,059	0,381	0,059	0,056	0,000	0,000	0,056	0,000	0,056	0,111	0,056	0,167	0,167	0,211
TA7							0	0,063	0,000	0,350	0,000	0,111	0,059	0,059	0,111	0,059	0,111	0,167	0,111	0,222	0,222	0,263
TA8								0	0,063	0,400	0,063	0,167	0,118	0,118	0,167	0,118	0,167	0,222	0,167	0,278	0,278	0,316
TA9									0	0,350	0,000	0,111	0,059	0,059	0,111	0,059	0,111	0,167	0,111	0,222	0,222	0,263
TA10										0	0,350	0,409	0,381	0,381	0,333	0,381	0,333	0,455	0,409	0,350	0,350	0,381
TA11											0	0,111	0,059	0,059	0,111	0,059	0,111	0,167	0,111	0,222	0,222	0,263
TA12												0	0,056	0,056	0,105	0,056	0,105	0,056	0,105	0,211	0,211	0,158
TA13													0	0,000	0,056	0,000	0,056	0,111	0,056	0,167	0,167	0,211
TA14														0	0,056	0,000	0,056	0,111	0,056	0,167	0,167	0,211
TA15															0	0,056	0,000	0,158	0,105	0,211	0,211	0,250
TA16																0	0,056	0,111	0,056	0,167	0,167	0,211
TA17																	0	0,158	0,105	0,211	0,211	0,250
TA18																		0	0,158	0,167	0,167	0,111
TA19																			0	0,211	0,211	0,250
TA20																				0	0,000	0,059
TA21																					0	0,059
TA22																						0

1.2.4. Classification hiérarchique

Les distances de Jaccard basées sur le polymorphisme des globulines nous ont aidés à élaborer un dendrogramme en UPGMA (Figure 11). Le dendrogramme a défini 5 clusters majeurs à une distance $d=0.08$. Le premier cluster ($d=0.06$) regroupe 7 accessions (TA1, TA2, TA3, TA7, TA8, TA9 et TA11), ces 7 accessions ont la particularité d'être collectées dans les régions de centre jusqu'à Est du pays avec une gamme des étages bioclimatiques relative (de l'hyper-humide jusqu'au subhumide), sauf TA3 (Sidi Bel Abbes) et TA7 (Ain Defla) sont à l'origine de l'ouest de l'Algérie. Ce premier groupe lié avec deuxième groupe à un distance $d=0.09$. Le deuxième groupe renferme 9 accessions au niveau de distance $d=0.07$, qui

représentent l'Est Algérien (de l'Est jusqu'à le centre) avec une large gamme des étages bioclimatiques qui varie de l'hyper-humide jusqu'au semi-sec, sauf TA17 (Chlef) d'origine de l'ouest de l'Algérie. L'accession TA10 qui est collectée dans une région sub humide de Tissemsilt, forme un groupe indépendant des autres avec le degré le plus élevé de distance génétique ($d= 0.375$). Le quatrième groupe forme un clade entre les deux accessions TA12 et TA18 à une valeur de distance $d= 0.05$. Ces accessions appartiennent à deux régions un peu proches géographiquement avec un climat hyper-humide ; Constantine (Bni Hemiden) et Bejaia (Akbou), respectivement. Le Cinquième groupe renferme les trois accessions TA20, TA21 et TA22 à une valeur de distance $d= 0.06$. Ces accessions appartiennent à trois régions de centre de l'Algérie avec un climat hyper-humide ; Alger (Ben Aknon), Boumrdas et Jijel, respectivement.

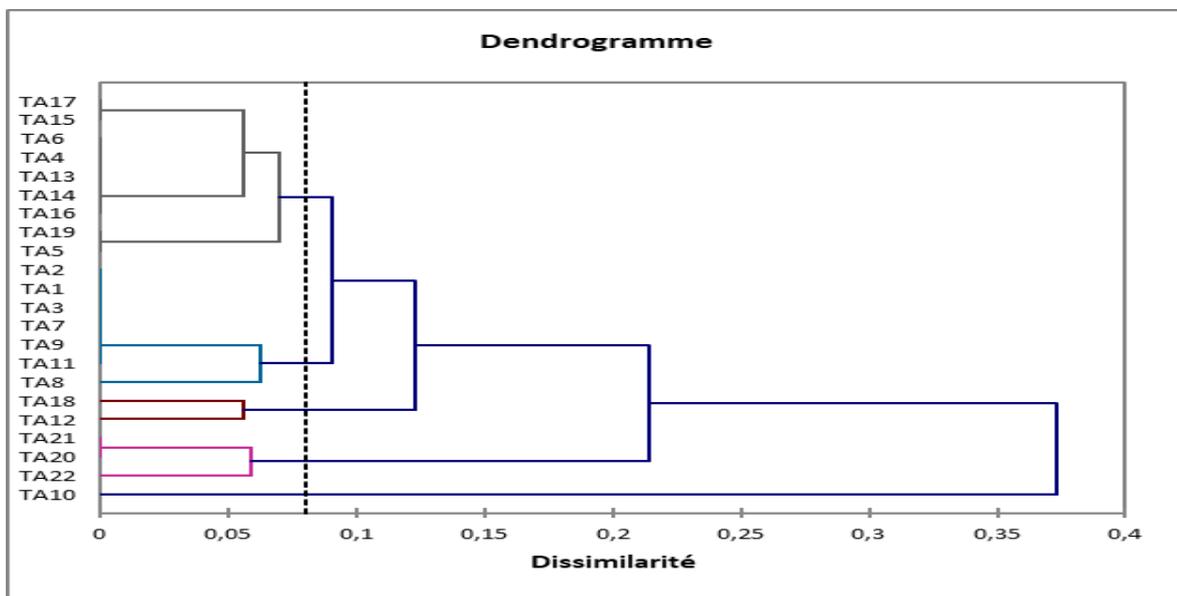


Figure 11. Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de l'espèce *T. angustifolium* selon le polymorphisme des globulines.

2. Discussion

Les protéines de réserve des graines de différentes espèces ont été étudiées en détail à partir de la fin du siècle, quand Osborne en 1924, les classait en quatre groupes sur la base de leurs critères de solubilité : les albumines (solubles dans l'eau), les globulines (solubles dans les solutions salines), les gluténines (solubles dans des solutions légèrement acides ou basiques) et les prolamines (solubles dans l'alcool).

Toutefois, il est bien connu qu'une distinction claire entre ces groupes de protéines n'est pas toujours possible, à cause de nombreuses protéines montrant des comportements de solubilité intermédiaires. À cet égard, certaines albumines de semences ont été identifiées à partir de

plusieurs espèces de plantes qui se comportent comme des globulines lors de leur solubilisation (Youle et Huang, 1978). Blagrove et Gillespie (1975) ont également noté que les globulines sont en partie solubles dans de l'eau dés ionisée. Dans le présent travail, nous avons réussi à mettre au point une procédure d'extraction efficace des fractions totales des albumines et des globulines (Franco et al., 1997).

L'hétérogénéité électrophorétique des protéines de réserve représentent un caractère biochimique génétiquement stable. Nos résultats, basés sur 22 accessions de l'espèce *angustifolium* du genre *Trifolium*, échantillonnées dans diverses conditions éco-géographiques en Algérie du Nord, mettent en évidence une différenciation significative au niveau intra-spécifique. L'électrophorèse des albumines et des globulines par SDS-PAGE a révélé trois zones de migration (1, 2 et 3). À travers les trois marqueurs étudiés, Ces deux fractions protéiques ont montré une hétérogénéité aux niveaux intra spécifique avec 22 bandes d'albumines et de 23 globulines, Le grand intervalle de variation des fréquences de ces bandes (de 0 à 100%) reflète la grande diversité existante à l'échelle intra-spécifique. Ce polymorphisme protéique peut être expliqué par le fait que ces populations ne vivent pas dans le même climat, et subissent donc des conditions différentes.

Ainsi que, la composition protéique peut être sous la dépendance des facteurs génétiques et agro-climatique (Doekes et Wennekes, 1982).

A la lumière des résultats obtenus, une classification hiérarchique a été élaborée, et les distances génétiques entre les accessions étudiées ont été représentées. La structuration des différentes accessions et la classification hiérarchique des groupes obtenus mettent en relief le degré de similarité et de diversité entre les accessions étudiées. Les indices de similarité de Jaccard allaient de 0.00 et 0.40 avec une moyenne de 0.20 pour la fraction albumine et entre 0.00 et 0.455 avec une moyenne de 0.222 pour les globulines. On note que les accessions s'organisent en groupes et sous- groupes, nous avons défini quatre groupes majeurs pour les albumines et cinq groupes majeurs pour les globulines.

Les 22 accessions étudiées ont déjà été analysées (Medoukali et al., 2015) en utilisant 12 caractères morphologiques liés à la taille des graines, des gousses et des cotylédons, ainsi que deux systèmes enzymatiques (Estérases et Glutamate oxaloacétate transaminase). Un polymorphisme élevé a été mis en évidence et tous les caractères étudiés ont contribué à la discrimination des espèces et des accessions. Pareillement, La relation entre les marqueurs morphologiques et les paramètres éco géographique a été estimée faible.

*Conclusion générale
et perspectives*

Ce travail de recherche s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources phylogénétiques. Il a pour objectif l'appréciation de la variabilité génétique au sein de l'espèce *T. Angustifolium* représentée par 22 accessions collectées dans différentes régions dans le Nord Algérien, en se basant sur le polymorphisme des protéines de réserve de la graine (albumines et globulines).

Notre première préoccupation est d'obtenir la meilleure expression possible des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (SDS-PAGE). Pour cela, nous avons mis au point un protocole d'extraction des protéines à partir des graines matures des 22 accessions concernées.

L'analyse électrophorétique des fractions protéiques analysées nous a permis de :

- Répertorier un total de 45 bandes à travers les deux fractions étudiées, avec des fréquences très variables, 22 bandes ont été notées pour les albumines et 23 bandes pour les globulines.
- Mesurer les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques présentes sur le gel.
- Dénombrer des bandes protéiques rares et communes entre les différentes accessions
- Distinguer les différences dans les profils protéiques des accessions.
- Analyser la diversité génétique au niveau intra-spécifique ce qui nous a aidé à estimer les distances génétiques entre pools géniques en comparant leurs origines géographiques.
- 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 albumines et globuline, et les facteurs climatiques et géographiques des régions d'origine de chaque accession.

L'utilisation d'autres marqueurs biochimiques et moléculaires devrait permettre de mieux comprendre la structuration de la diversité génétique et le rôle des facteurs écologiques dans la différenciation de ces accessions de *T. angustifolium*, ce qui peut donner une indication sur le modèle d'évolution appliqué aux accessions étudiées dans leurs conditions environnementales.

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 au moyen d'autres marqueurs biochimiques et moléculaires.

- 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 techniques de l'électrophorèse PAGE et SDS PAGE, et étudier d'autres genres et d'autres espèces pour la préservation de la diversité biologique et des ressources génétiques.
- Essayer de corrélérer cette diversité protéique avec d'autres études.

*Références
bibliographiques*

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

Applewhite T.H. 1989. Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs. The American oil chemists society.

Amrani Nadia., Matheus Sachs et Allain Jacobson., 2006. Early nonsense; mRNA decay solves a translational problem. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7, P 415.

Auld B; Morita H; Nishida T; Ito M; Michael P, 2003. Shared exotica-plant invasions of Japan and south eastern Australia. *Journal of Weed Science and Technology*, 48(3):143-154.

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 studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 233 :78-93.

Blagrove, Gillespie. 1978. comparative studies on the proteines from seeds of *Lupinus angustifolius* L. *journal of plant physiology*. 5: 651-663.

Blake SF, 1923. Two Mediterranean clovers new to the United States. *Science*, 57(1484):665-665.

Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J 2003 Beans (*Phaseolus* spp.): model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128.

Coombe DE 1972 *Trifolium* L. In: Tutin TG et al (eds) *Flora Europaea*, vol 2. Cambridge University Press, Cambridge, pp 157–172.

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.

Driouech N; Fayad FA; Ghanem A; Al-Bitar L, 2008. Agronomic performance of annual self-reseeding legumes and their self-establishment potential in the Apulia region of Italy.

El Aoufir A., 2001. Etude du flétrissement vasculaire du Pois chiche causé par le *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceri. Evaluation de la fiabilité de l'analyse isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec.

Erfanzadeh R; Kahnuj SHH; Azarnivand H; Pétilion J, 2013. Comparison of soil seed banks of habitats distributed along an altitudinal gradient in northern Iran. *Flora (Jena)*, 208(5/6):312-320(<http://www.sciencedirect.com/science/journal/03672530>).

FAO. 2007(<http://www.fao.org/corp/statistics/fr/>).

Fletcher N, 2007. Mediterranean wildflowers. China: Sheck Wah Tong Printing Press.

Foriers A., Lebrun E., Van Rapenbusch R., De Neve R., Strosberg A.D., 1981. The structure of the lentil (*Lens culinaris*) lectin. Amino acid sequence determination and prediction of the secondary structure. *J. Biol. Chem.*, 256, 5550-5560.

Frame J, 2015. *Trifolium incarnatum* L. Grassland Species Profiles. Rome, Italy: FAO.(<http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/Gbase/data/pf000502.htm>).

Franco E, Ferreira RB, Teixeira AR. 1997. Utilization of an Improved Methodology To Isolate *Lupinus albus* Conglutins in the Study of Their Sedimentation Coefficients.

Frank vincentz 2007, self-made Date: created 30. Nov. 2007 Permission: GFDL (self made)

Gary Morgret 2017-05-25 County Sonoma Number of Plants>10000 Coordinates 38.571203, -122.694368

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.

Gillet JMX, Taylor NL (2001) *The World of Clovers*. Iowa State University Press, Ames, USA

Goldblatt P 1981 Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: *Advances in Legume Systematics, Part 2*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 427-463.

- Goldblatt P, Johnson DE 2003** Tropicos database: index to plant chromosome numbers, Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA. <<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/ipcn.html>>.
- Gomez O.J, Blair M.W, Frankow-Lindberg B.E, Gullberg U. 2004.** Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sci.* 44: 1412-1418.
- Handberg K, Stougaard J. 1992.** Lotus japonicus, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2: 487-496.
- Harry. 2001.** Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine, Paris.
- Harshberger JW, 1922.** Ecologic and morphologic study of the clovers (Trifolium). In: *Proceedings of the American Philosophical Society*, 61(2). 136-50.
- Harshberger JW, 1922.** Ecologic and morphologic study of the clovers (Trifolium). In: *Proceedings of the American Philosophical Society*, 61(2). 136-50.
- Helentjaris, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J 1986** Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 72: 761-769.
- Hendrych R 1976** Vorläufige Mitteilung zur Gattung Chrysopsis Desvaux (1818). *Preslia* 48: 216-224.
- Hendrych R 1978** Ein Versuch, die Arealentwicklung der Gattung Chrysopsis zu erläutern. *Preslia* 50: 119-137.
- Hossain M 1961** A revision of Trifolium in the Nearer East. *Notes from the Royal Botanic Garden, Edinburgh* 23: 387-481.
- Jean-Pierre 2007,** protection de la nature à la gouvernance de la biodiversité, no 30 p97- 109
- Judd WS, Campbell CS, Jules Bouharmont, Kellogg EA, Stevens P 2001** Botanique systématique: une perspective phylogénétique. Edition de boeck, Amazon France.

Kamalak A; Canbolat O, 2010. Determination of nutritive value of wild narrow-leaved clover (*Trifolium angustifolium*) hay harvested at three maturity stages using chemical composition and *in vitro* gas production. *Tropical Grasslands*, 44:128-133. ([http://www.tropicalgrasslands.asn.au/Tropical%20Grasslands%20Journal%20archive/PDFs/Vol_44%20\(1_2_3_4\)/Vol%2044%20\(2\)%20Adem%20et%20al%20128.pdf](http://www.tropicalgrasslands.asn.au/Tropical%20Grasslands%20Journal%20archive/PDFs/Vol_44%20(1_2_3_4)/Vol%2044%20(2)%20Adem%20et%20al%20128.pdf)).

Khokhrjakov AP 1998 BobroviaA. Khokhr: genus novum familia Fabaceae. *Novosti Sistematiki Vysshikh Rastenii* 137-139.

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

Lawrence M.C., Izard T., Beuchat M., Blagrove R.J., Colman P.M., 1994. Structure of phaseolin at 2-center-dot- 2 angstrom resolution. Implication for a common vicilin/legumin structure and the genetic-engineering of seed storage proteins. *J. Mol. Biol.*, 238, 748-776.

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

Lewis GP, Schrire BD, Mackinder BA, Lock M, editors 2005 *Legumes of the World*. Royal Botanic Garden, Kew, UK (in press).

Lokil (2008), - Description= |Source=self-made |Date= |Author= Loki1 |Permission= |other_versions= }} bloemdiagram **Lopez Poveda L, 2012.** *Trifolium angustifolium*. T176423A20120853. The IUCN Red List of Threatened Species(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T176423A20120853.aspx>).

Löve Á, 1980. Chromosome number reports LXVIII. *Taxon*, 29(4):533-547.

MARCHAND, L. L., 1999 Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 101-105.

Markert CL, Moller F. 1959. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 45: 753-763.

Marticorena C; Quezada M, 1985. *Gayana, Botánica*, 42. 1-157.

Medoukali 2016, carte de répartition du genre trifolium (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trifolium_Distribution.png).

Michel Botineau 2010, Botanique systématique et appliquée des plantes à fleurs, Lavoisier,p. 604

Moraes PLR, Nehme CJ, Alves MC, Teresa M, Derbyshire MT, Cavaleiro AJ 2007 Chemical composition of flavonoids and styrylpyrones and the genetic variability of isozymes in natural populations of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). *Biochemical systematics and Ecology* 35: 233-244.

Nordborg M, Borevitz JO, Bergelson J, Berry CC, Chory J, Hagenblad J, Kreitman M, Maloof JN, Noyes T, Oefner PJ, Stahl EA, Weigel D 2002 The Extent of Linkage Disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 30: 190-193.

Norman HC; Cocks PS; Galwey NW, 2005. Annual clovers (*Trifolium* spp.) have different reproductive strategies to achieve persistence in Mediterranean-type climates. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56(1):33-43.

Osborne J, 2013. (*Trifolium angustifolium*). In: The IUCN Red List of Threatened Species, (<http://www.iucnredlist.org/details/176423/1>).

Parizeau ME 1997 La biodiversité. Edition de boeck, Bruxelles.

Pérez-Fernández MA; Rodríguez-Echeverría S, 2003. Effect of smoke, charred wood, and nitrogenous compounds on seed germination of ten species from woodland in Central-Western Spain. *Journal of Chemical Ecology*, 29(1):237-251.

Polhill RM, Raven PH, Stirton CH 1981 Evolution and systematics of the leguminosae. In: *Advances in legume systematics Part 1*. Royal Botanic Gardens Kew, UK. Pp.1-26.

Prat. D , Faivre Rampant. A , Prado. 2006 : « Analyse du Génome et Gestion des ressources génétique forestières » . INRA Edition. p456.

Presl CB 1831 *Trifolium*. In: *Symbolae Botanicae*. Calve JG, Prague. pp. 44-50.

Roskov YR 1990 The new species and the new nomenclature combinations in the genera *Lupinaster*, *Chrysaspis*, *Trifolium* and *Amoria* (Fabaceae). *Botanicheskii Zhurnal* 75: 715-720.

Russelle M. 2001. Alfalfa. *Am. Sci.* 89: 252-259(<http://www.americanscientist.org/template/IssueTOC/issue/390>).

Shewry P. R, Napier J. A et Tatham A. S. 1995. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 945-956.

Singh N.K, Shepherd K.W, Cornish G.B. 1991. A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin. *Journal of Cereal Science.* 14: 203-208.

Small E 1987 Reduction of *Ursiatio Trifolium*. *Taxon* 36: 578-583.

Soják J 1986 Nové jméno pro *Galearia* Presl. *Cas. Nár. Muz. (Prague)* 154, 35.

Sprent JI 2001 Nodulation in Legumes. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

Taylor NL, Quesenberry KH, Anderson MK 1979 Genetic system relationships in *Trifolium*. *Economic Botany* 33: 431-441.

Trifi-Farah N., Chatti W.S., Marrakchi M., Pernes J. 1989. Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie. *Agronomie*, 9 : 591-598.

USDA-ARS, 2016. Germplasm Resources Information Network (GRIN). National Plant Germplasm System. Online Database. Beltsville, Maryland, USA: National Germplasm Resources Laboratory(<https://npgsweb.arsgrin.gov/gringlobal/taxon/taxonomysearch.aspx>).

Webb CJ; Sykes WR; Garnock-Jones PJ, 1988. Flora of New Zealand, Volume IV: Naturalised pteridophytes, gymnosperms, dicotyledons. Christchurch, New Zealand: Botany Division, DSIR, 1365 pp.

Wenzel M., Gers-Barlag H., Schimpl A., Rudiger H., 1993. Time course of lectin and storage protein biosynthesis in developing pea (*Pisum sativum*) seeds. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.*, 374, 887-894.

Western Australian Herbarium, 2015. *Trifolium angustifolium* L. FloraBase - the Western Australian Flora. Western Australia: Department of Parks and Wildlife. (<https://florabase.dpaw.wa.gov.au/>).

Zaghouane, O., Ardjout, N., Bouchata, K., Bouhouchine, L., Branki, N. & Seba, N.2000. La réhabilitation et le développement des légumineuses alimentaires dans le cadre du programme de reconversion. *Céréaliculture ITGC*. 34: 61- 66.

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

Zohary M 1972 Origins and evolution in the genus *Trifolium*. *Botaniska Notiser* 125: 501-511.

Zohary M; Heller D, 1984. The genus *Trifolium* L. Jerusalem, Israel: The Israel Academy of Sciences and Humanities.

Annexes

Annexe. Solutions pour la préparation des gels.**Tampon Tris-HCl pH : 8,8** (Conserver à 4°C)

- Tris 60.57 g
- Eau distillé ~ 400 mL
- Ajuster à pH 8,8 avec du HCl fumant ~ 8 à 10 mL
- Eau distillé Qsp 500 mL

Tampon Tris-HCl pH : 6,8 (Conserver à 4°C.)

- Tris (hydroxyméthyl aminomethan) 30.285 g
- Eau distillée ~200 mL
- Ajuster à pH 6,8 avec du HCl fumant ~ 19,5 mL
- Eau distillée Qsp 250 mL

Solution stock de SDS à 10% Stocker à température ambiante

- Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 1 g
- Eau distillée Qsp 10 mL

Solution d'ammonium persulfate (APS) à 1% (A préparer le jour même)

- APS (stocké au frigo) 0,2 g
- Eau distillée Qsp 20 mL

Gel de séparation (migration= running gel) à 12,52%

- Acrylamide 40% 12.4 mL
- Bisacrylamide 2% 2.4 mL
- Eau permutée 8.6 mL
- Tampon Tris-HCL pH 8.8 15.2 mL
- SDS 10% 0.4 mL
- APS 1% 1 mL
- TEMED 0.02 mL
- Volume total 40 mL

Gel de concentration (stacking gel) à 5%

- Acrylamide-bisacrylamide (30 : 0.8)	0.5 mL
- Eau permutée	3.25 mL
- Tampon Tris-HCL pH 6.8	1.25 mL
- SDS 10%	0.14 mL
- APS 20%	25 µL
- TEMED	4 µL

Résumés

Le contenu en protéines contribue de manière directe à la compréhension du monde végétal, il est désormais un caractère clé aussi bien à l'étude de la biodiversité qu'en recherche fondamentale, tout en conditionnant un certain nombre de caractères écologiques de la plante elle-même.

Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des fractions des albumines et globulines par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), en rapportant sur une espèce du genre *Trifolium* (*T. angustifolium.*), représentées par des accessions collectées dans 22 sites éco-géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien.

La variabilité des protéines a été analysée en se basant sur la matrice de présence et absence des bandes. Leur fréquence a été calculée à travers toutes les accessions. Pour chaque fraction protéique, les distances Euclidiennes ont été calculées et un dendrogramme a été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les accessions ont été élaborées également.

Globalement, l'espèce étudiée a généré 22 bandes d'albumines et 23 bandes de globulines, dont les fréquences sont variables d'une accession à une autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, néanmoins, aucune bande spécifique n'a été enregistrée. La corrélation avec les origines géographiques des accessions ainsi que, la corrélation entre le polymorphisme généré par les deux fractions protéiques a été faible.

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

Mots clés : Protéines, globulines, albumines, *Trifolium*, polymorphisme, SDS-PAGE, Algérie.

The protein content directly contributes to the understanding of the plant world; it is now a key character both in the study of biodiversity and in fundamental research, while conditioning a certain number of ecological characteristics of the plant itself. Even.

Our study aims to highlight a possible genetic variability of the fractions of albumins and globulins by the technique of electrophoresis on polyacrylamide gel (SDS-PAGE) , by reporting on a species of the genus *Trifolium* (*T. angustifolium*) , represented by accessions collected in 22 eco-geographic sites, covering a wide range of bioclimatic stages in northern Algeria.

Protein variability was analyzed based on the presence and absence matrix of the bands. Their frequency was calculated across all accessions. For each protein fraction, Euclidean distances were calculated and a dendrogram was constructed according to the UPGMA aggregative method. Matrices of genetic distances between accessions have also been developed.

Overall, the species studied generated 25 albumin bands and 22 globulin bands, the frequencies of which varied from accession to accession. Of these, several bands have been shared by two or three accessions; however, no specific band has been recorded. The correlation with the geographical origins of the accessions as well as the correlation between the polymorphism generated by the two protein fractions was weak.

The results obtained allow us to conclude that there is a protein polymorphism between the different accessions studied, which is reflected in the number of bands listed and their variability

Key words: Protein, globulins, albumins, *Trifolium*, polymorphism, SDS-PAGE, Algeria.

يساهم محتوى البروتين بشكل مباشر في فهم عالم النبات، وهو الآن سمة رئيسية في كل من دراسة التنوع البيولوجي وفي الأبحاث الأساسية، مع تكييف عدد معين من الخصائص البيئية للنبات نفسه.

تهدف دراستنا إلى تسليط الضوء على التباين الوراثي المحتمل لأجزاء الألبومين والغلوبيولين من خلال تقنية الرحلان الكهربائي على هلام بولي أكريلاميد (SDS-PAGE)، المتعلقة بنوع من جنس *Trifolium (T. angustifolium)*، ممثلة بمدخلات تم جمعها في 22 موقعًا جغرافيًا بيئيًا، تغطي مجموعة واسعة من المراحل المناخية الحيوية في شمال الجزائر.

تم تحليل تباين البروتين بناءً على وجود مصفوفة وجود وغياب العصابت. تم حساب تواترها عبر جميع المدخلات.

لكل جزء من البروتين، تم حساب المسافات الإقليدية وتم إنشاء مخطط شجري وفقًا لطريقة UPGMA التجميعية.

كما تم تطوير مصفوفات المسافات الجينية بين المدخلات بشكل عام، أنتجت الأنواع المدروسة 25 نطاقًا من الألبومين و22 نطاقًا من الغلوبيولين، وتباينت تردداتها من انضمام إلى مدخل. من بين هذه النطاقات، تم تقاسم العديد من النطاقات من قبل اثنين أو ثلاثة مدخلات، ومع ذلك، لم يتم تسجيل أي نطاق محدد. كان الارتباط ضعيفًا مع الأصول الجغرافية للمدخلات وكذلك الارتباط بين تعدد الأشكال الناتج عن كسري البروتين.

تسمح لنا النتائج التي تم الحصول عليها باستنتاج أن هناك تعدد أشكال البروتين بين المدخلات المختلفة التي تمت دراستها، وهو ما يعكس في عدد النطاقات المدرجة وتنوعها.

الكلمات المفتاحية: بروتينات، جلوبيولين، ألبومين، تريفلويوم، تعدد الأشكال، الهجرة الكهربائية، الجزائر.

Nom: KHALFALLAH LACHELAH prénom : Linda Rokia	Date de soutenance :10/11/2020
Thème : Evaluation de la diversité génétique au sein de l'espèce <i>Trifolium angustifolium</i> par les marqueurs protéiques (albumines et globulines)	
Diplôme : Master en sciences alimentaire Spécialité : Biochimie de la nutrition	
<p>Résumé</p> <p>Le contenu en protéines contribue de manière directe à la compréhension du monde végétal, il est désormais un caractère clé aussi bien à l'étude de la biodiversité qu'en recherche fondamentale, tout en conditionnant un certain nombre de caractères écologiques de la plante elle-même.</p> <p>Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des fractions des albumines et globulines par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), en rapportant sur une espèce du genre <i>Trifolium</i> (<i>T. angustifolium.</i>), représentées par des accessions collectées dans 22 sites éco-géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien.</p> <p>La variabilité des protéines a été analysée en se basant sur la matrice de présence et absence des bandes. Leur fréquence a été calculée à travers toutes les accessions. Pour chaque fraction protéique, les distances Euclidiennes ont été calculées et un dendrogramme a été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les accessions ont été élaborées également.</p> <p>Globalement, l'espèce étudiée a généré 22 bandes d'albumines et 23 bandes de globulines, dont les fréquences sont variables d'une accession à une autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, néanmoins, aucune bande spécifique n'a été enregistrée. La corrélation avec les origines géographiques des accessions ainsi que, la corrélation entre le polymorphisme généré par les deux fractions protéiques a été faible.</p> <p>Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il existe un polymorphisme protéique entre les différentes accessions étudiées, qui se traduit par le nombre des bandes répertoriées et leur variabilité.</p>	
Mots clés : Protéines, globulines, albumines, <i>Trifolium</i> , polymorphisme, SDS-PAGE, Algérie.	
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	
<p>Jury de soutenance</p> <p>Présidente: M^{me}. GUENDOUZE A. Maitre de Conférences. UFM - Constantine</p> <p>Rapporteur : M^{me}. MEDOUKALI I. Maitre de Conférences. UFM - Constantine</p> <p>Examinatrice : M^{me}. MOUSSAOUI S. Maitre de Conférences. UFM - Constantine.</p>	