

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Biochimie et biologie cellulaire
et moléculaire

قسم الكيمياء الحيوية و علم الاحياء
الخلوي و الجزيئي

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Étude de la diversité génétique au sein de *Medicago polymorpha* Algérienne par
les marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires.

Présenté par : BENM'HAMED Sara.

Le 20/06/2023

BOUMEZÂAR Sara.

LAOUIR Abderrahim.

Jury d'évaluation :

Présidente du jury : Mme MOUSSAOUI S. (MCB - UFM Constantine 1).

Encadrante : Mme MEDOUKALI I. (MCB - UFM Constantine 1).

Examinatrice : Mme GUENDOUZE A. (MCB - UFM Constantine 1).

Année universitaire
2022 – 2023

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à exprimer notre gratitude envers Dieu tout-puissant pour nous avoir accordé le privilège et la chance d'étudier, ainsi que pour nous avoir donné la force, le courage et la patience nécessaires pour mener à bien ce travail.

Notre encadrante, M^{me}. MEDOUKALI I, mérite notre profonde gratitude pour sa précieuse contribution tout au long de notre parcours de recherche. Sa compétence scientifique, ses conseils éclairés et son soutien inconditionnel ont enrichi notre travail. Nous lui sommes profondément reconnaissants pour sa disponibilité, sa bienveillance et son engagement envers notre réussite. Sa contribution significative à notre développement académique est inestimable.

Nous remercions sincèrement les membres du jury pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance, tous particulièrement :

M^{me}. MOUSSAOUI S. pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Nous souhaitons exprimer notre gratitude à M^{me}. GUENDOUZE A. pour nous avoir fait l'honneur d'examiner et évaluer ce mémoire.

Nous exprimons notre profonde gratitude au Professeur Mr KHLIFI D, directeur du laboratoire de génétique biochimie et biotechnologies végétales de l'université Constantine 1, pour avoir généreusement mis à notre disposition son laboratoire, nous permettant ainsi de réaliser notre recherche.

Enfin, nous sommes reconnaissants envers *American Corner* de l'université Constantine 1, l'endroit où nous avons travaillé. L'environnement propice à l'étude a été d'une grande valeur pour notre progression, nous avons pu poursuivre notre travail avec détermination et résilience grâce à cet espace.

Nos remerciements vont également à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Tout d'abord, je voudrais exprimer ma reconnaissance à Allah, le Seigneur de l'univers, qui a illuminé mon chemin vers la science et la connaissance.

Je souhaite exprimer ma dédicace à toutes les personnes qui ont eu confiance en moi et m'ont apporté leur soutien tout au long de cette aventure académique.

Au meilleur des parents,

Votre soutien inébranlable, votre encouragement constant et votre confiance en moi ont été les fondements de ma réussite. Je vous suis infiniment reconnaissante pour tout ce que vous avez fait. Vous êtes mes plus grands supporters et mes guides bienveillants. Votre impact dans ma vie est inestimable.

À ma petite sœur,

Tu es ma source de bonheur et d'amour. Je suis reconnaissante de t'avoir dans ma vie. Je serai toujours là pour toi, prêt à te soutenir inconditionnellement.

À ma précieuse famille,

Ma grand-mère, mon grand-père et ma tante, votre amour et votre soutien inébranlable ont été des forces motrices dans ma vie. Votre présence bienveillante et vos précieux conseils ont contribué à façonner la personne que je suis aujourd'hui. Je vous porte un amour sincère du fond de mon cœur.

À mes chères copines,

Mayssa, Lyna, Sara, Sarah, Imane, Rayene, Boutheina et Asma, que je considère comme mes sœurs. Votre amitié est un trésor que je chéris profondément. Votre soutien et votre présence dans ma vie ont une valeur inestimable. Que notre amitié continue d'être une source de bonheur, de force et de complicité.

À mes amis,

Abderrahmane, Yafet et Ayman, chaque instant partagé en votre compagnie est un trésor qui restera à jamais gravé dans ma mémoire.

A la mémoire de ma grand-mère et mon grand père

A tous ceux que j'aime

BENM'HAMED

Sara

Dédicace

À ma chère famille,

Il est difficile d'exprimer par de simples mots la gratitude infinie que je ressens envers vous. Votre amour, votre soutien inébranlable et votre présence constante ont été les piliers qui ont façonné mon parcours académique. Aujourd'hui, alors que j'achève ce mémoire avec succès, je ne peux que me tourner vers vous pour vous remercier du plus profond de mon cœur.

Particulièrement ma mère et mon père, vous avez été mon guide et ma source inépuisable d'inspiration. Votre dévouement inconditionnel, votre sagesse et votre amour sans limites m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même. Votre présence bienveillante a illuminé mon chemin et a fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.

À vous mes sœurs Wissal et Rihab, vous avez toujours été là pour moi, prêtes à partager mes joies et à alléger mes peines. Votre présence, vos encouragements et votre soutien inconditionnel ont été des cadeaux précieux qui ont égayé mes journées. Chacune d'entre vous a apporté une lumière unique à ma vie, et je vous en suis éternellement reconnaissante.

À mes vrais amis

Je tiens à remercier chaleureusement, Abir, Lyna, Sara, Maïssa, et Abdou, pour votre présence précieuse, votre esprit critique éclairé et votre amitié authentique. Vos encouragements, vos rires partagés et vos moments d'évasion au Coin Américain ont rendu cette expérience encore plus mémorable. Merci d'avoir été présents à mes côtés, d'avoir cru en moi et de m'avoir rappelé l'importance de l'amitié.

À ma chère binôme Sara,

En cet instant où j'achève ce mémoire, je ne peux m'empêcher de me remémorer notre collaboration exceptionnelle tout au long de ce périple académique. À travers les hauts et les bas, les défis et les moments de doute, ta présence a été un véritable pilier, une source constante de motivation et d'inspiration. Nos échanges intellectuels riches, nos discussions animées et notre complémentarité ont contribué de manière significative à la qualité de ce mémoire.

BOUMEZAAR

Sara

Dédicace

Louange au ALLAH tout puissant, qui m'a permis de voir ce jour tant attendu

Je dédie ce mémoire :

A mon très cher père

Tu as constamment incarné un modèle de paternité empreint de respect, d'honnêteté et de méticulosité. Je ressens un profond désir de rendre hommage à la personne exemplaire que tu es.

Grâce à toi, papa, j'ai acquis une compréhension profonde du sens du travail et de la responsabilité. Je tiens à t'exprimer ma gratitude pour ta générosité et ta bienveillance... Ton soutien infailible a illuminé chaque étape de mon parcours. Aucune dédicace ne saurait véritablement traduire l'intensité de l'affection, de l'estime et du respect que j'ai toujours nourris à ton égard.

A ma vie Ma mère

La personne qui a contribué à ma réussite à travers son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, ainsi que son assistance et sa présence dans ma vie, recevra, à travers ce travail humble, l'expression de mes sentiments et de ma gratitude éternelle. Je t'aime, maman, et je prie le Tout-Puissant de t'accorder une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A mes chers frères et sœurs

A tous les moments d'enfance passés avec vous, en gage de ma profonde estime pour l'aide que vous m'avez apporté. À travers les hauts et les bas de la vie, vous avez été mes compagnons, mes confidents et mes amis les plus fidèles. Vos encouragements, votre soutien inconditionnel et votre présence réconfortante ont été les fondations sur lesquelles je me suis appuyé tout au long de ce parcours. Puissent nos liens fraternels se consolider et se pérenniser encore plus.

A mon Beau-frère

Depuis que tu as rejoint notre famille, tu as su apporter une présence chaleureuse et bienveillante. Ta gentillesse, ton humour et ta générosité ont fait de toi bien plus qu'un simple beau-frère, mais un ami précieux. Je te dis merci et je te souhaite bonheur, réussite et prospérité.

A tout ma famille

Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.

A mes amis

Il m'est difficile de trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer toute l'affection et la considération qui m'animent à votre égard. Vous êtes pour moi des frères et des sœurs sur lesquels je peux compter indéfectiblement. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur

LAOUIR

Abderrahim

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale..... 1

Première partie Revue bibliographique

1. Famille des fabacées (<i>Fabaceae</i>)	3
1.1. Généralités	3
1.2. Distribution géographique.....	3
1.3. Classification.....	4
1.4. Intérêts.....	5
2. Genre <i>Medicago</i>	6
2.1. Taxonomie et génétique	6
2.2. Description botanique	7
2.3. Distribution géographique.....	8
3. Espèce <i>Medicago polymorpha</i>	8
3.1. Présentation de l'espèce <i>M. polymorpha</i>	8
3.2. Arbre taxonomique, d'après Lesin et lesins (1979)	9
3.3. Description botanique	9
3.4. Distribution géographique.....	11
3.5. Cycle de vie.....	12
3.6. Intérêts.....	13
4. Diversité génétique.....	14
5. Marqueurs génétiques	15
5.1. Marqueurs morphologiques	15
5.2. Marqueurs biochimiques.....	15
5.3. Marqueurs moléculaires	16

Références bibliographiques

Deuxième Partie Diversité génétique de l'espèce *M. polymorpha*

Abstract.....	18
1. Introduction	19
2. Material and methods	20

3. Results	25
4. Discussion	37
5. References	41
Synthèse et Conclusion générale	45

ANNEXES

Résumés

Liste des abréviations

ADN	Deoxyribonucleic acid
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
APG II	Angiosperm phylogeny group
Cm	Centimeter
DArT	Diversity Arrays Technology
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
LegHb	Leghémoglobine
LPWG	The Legume Phylogeny Working Group
M.	Medicago
Mm	Millimeter
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random amplification polymorpha Dna
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SAMPL	Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSAP	Sequence Specific Amplification Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats

Liste des figures

Première partie : Revue bibliographique

Figure 1 : Carte de répartition de la famille des <i>Fabaceae</i> d'après Heywood	3
Figure 2 : Exemples d'espèces appartenant à la famille des Fabacées.	5
Figure 3 : Exemple d'espèces appartenant au genre <i>Medicago</i>	6
Figure 4 : Carte géographique de la distribution de genre <i>Medicago</i> dans le monde	8
Figure 5 : Espèce <i>Medicago polymorpha</i>	9
Figure 6 : Gousses des variétés de <i>Medicago polymorpha</i>	11
Figure 7 : Carte géographique de répartition de l'espèce <i>M. polymorpha</i> dans le monde.	12

Deuxième partie : Diversité génétique de l'espèce *M. polymorpha*

Fig. 1: Geographical locations of the 56 accessions of the specie <i>M. polymorpha</i> in the Algerian North.	21
Fig. 2: Principal component analysis of twelve morphological characteristics for <i>M. polymorpha</i> (a) and their relationship with ecological parameters (b).	27
Fig. 3: UPGMA dendrogram based on morphological characteristics of 40 accessions of <i>M. polymorpha</i>	29
Fig. 4: Zymograms of the enzymatic system EST and GOT for the 28 accessions of the variety <i>polymorpha</i>	30
Fig. 5: Zymograms of the enzymatic system EST and GOT for the 28 accessions of the variety <i>vulgaris</i>	30
Fig. 6: Hierarchical classification in UPGMA of the 56 accessions of <i>M. polymorpha</i> based on enzyme polymorphism (Got-Est).	31
Fig. 7: Albumin electrophoretic profiles obtained by SDS-PAGE in 58 accessions of <i>M. polymorpha</i> and <i>M. vulgaris</i>	32
Fig. 8: Dendrogram based on UPGMA clustering of albumin data showing relatedness among the studied accessions of <i>M. polymorpha</i> species.	33
Fig. 9: Globulin electrophoretic profiles obtained by SDS-PAGE in 58 accessions of the varieties <i>M. polymorpha</i> and <i>M. vulgaris</i>	34

Fig. 10: UPGMA hierarchical classification of the 58 accessions of <i>M. polymorpha</i> based on globulin polymorphism.	35
Fig. 11: Electrophoretic profiles of <i>M. polymorpha</i> SSR bands revealed by AFctt1 primer ..	36
Fig. 12: Electrophoretic profiles of <i>M. polymorpha</i> SSR bands revealed by AFctt32 primer.	36
Fig. 13: Hierarchical UPGMA classification of 48 accessions of <i>M. polymorpha</i> based on SSR polymorphism.....	37

Liste des tableaux

Première partie : Revue bibliographique

Tableau 1 : Classification en six sous-familles des légumineuses.....	4
Tableau 2 : Description des caractéristiques morphologiques de <i>M. polymorpha</i>	10

Deuxième partie : Diversité génétique de l'espèce *M. polymorpha*

Table 1: Geographical origins of the 56 accessions studied, with the corresponding ecogeographical parameters.	21
Table 2: Sequences and link group of five microsatellite primers test Primer Linkage.....	24
Table 3: Mean, standard deviation and coefficient of variation of the twelve traits analyzed on 40 accessions of <i>M. polymorpha</i> species.	27
Table 4: Correlation matrix between morphological characteristics and ecological parameters.	28
Table 5: Total number of amplified bands and polymorphism in 48 <i>M. polymorpha</i> accessions for each SSR marker.	36

Introduction générale

Introduction générale

L'Algérie renferme une diversité végétale considérable, qui s'étend de la côte méditerranéenne aux montagnes de l'Atlas et aux vastes étendues désertiques du Sahara. Cette diversité floristique est étroitement liée aux caractéristiques géographiques, climatiques et environnementales du pays (Boukri, 2017). En effet, ces conditions naturelles ont favorisé l'émergence d'une multitude d'espèces végétales différentes, conférant à l'Algérie une richesse botanique exceptionnelle (Sakhraoui, et *al.*, 2020).

La famille des *Fabaceae*, communément appelée légumineuses, joue un rôle primordial en Algérie. Cette famille regroupe de nombreuses espèces de plantes annuelles et pérennes, d'arbres et d'arbustes (Tahkoubit, 2018), qui se distinguent par leurs propriétés nutritionnelles importantes et leur rôle écologique clé dans la fixation de l'azote atmosphérique dans le sol (Meriane, 2018).

En particulier, l'espèce *Medicago polymorpha*, également connue sous le nom de luzerne polymorphe, est une plante herbacée annuelle qui s'adapte bien aux sols pauvres et peu fertiles en Algérie (Graziano, et *al.*, 2010). Sur le plan génétique, plusieurs études ont identifié d'importantes variations dans le génome de cette espèce, notamment dans le nombre et la structure des chromosomes, ainsi que dans les séquences d'ADN, les gènes et les allèles. Par ailleurs, cette plante est d'une importance capitale pour l'agriculture et l'économie algériennes, étant donné sa teneur élevée en nutriments et son rôle essentiel dans l'amélioration de la fertilité des sols (Clark, 2014). De plus, les propriétés médicinales de cette espèce, en particulier en tant qu'anti-inflammatoire, antioxydant et antidiabétique, ont suscité un intérêt considérable dans le domaine de la médecine (Sharma, et *al.*, 2017).

Il convient de noter que l'espèce *M. polymorpha* revêt une importance considérable, cependant, peu d'études ont été menées à son sujet, en particulier en Algérie, ce qui met en évidence la nécessité de mener des recherches approfondies afin d'acquérir une meilleure compréhension et appréciation de cette espèce et sa diversité génétique. Dans cette optique, il est nécessaire de recourir à des marqueurs génétiques tels que les marqueurs morphologiques qui évaluent les traits phénotypiques observables chez les plantes (Ollivier et Foulley, 2013), ainsi que les marqueurs protéiques et enzymatiques qui peuvent être séparés et identifiés sur la base de leurs propriétés biochimiques. En outre, les marqueurs moléculaires peuvent être utilisés pour construire des cartes génétiques et identifier des gènes spécifiques (Datta et *al.*, 2011). En effet, Les études sur la diversité génétique revêtent une importance primordiale pour

Introduction générale

la conservation de la biodiversité, l'amélioration de la production agricole, le développement de nouvelles variétés et la compréhension de l'évolution des plantes.

Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est d'évaluer le polymorphisme génétique au sein de 56 accessions de deux variétés de l'espèce *M. polymorpha* (var. *polymorpha* et var. *vulgaris*) par des marqueurs biométriques, protéiques, enzymatiques et moléculaires tels que les microsatellites. Les échantillons ont été collectés dans différentes régions éco-géographiques du Nord Algérien, couvrant une vaste étendue allant de l'est à l'ouest. L'analyse de la variabilité génétique intraspécifique sera réalisée en utilisant la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Ce mémoire est organisé en deux parties distinctes : une revue bibliographique portant sur la famille des légumineuses et du genre *Medicago* en général, en mettant l'accent sur l'espèce *M. polymorpha*. Cette section fournira une vue d'ensemble de l'espèce, de sa distribution géographique, de sa classification, ainsi que de ses intérêts écologiques, agronomiques et médicaux. Elle inclura également une analyse approfondie des concepts de diversité génétique et des différents types de marqueurs génétiques utilisés en recherche végétale.

La deuxième partie quant à elle, fait l'objet d'un article scientifique détaillant une étude approfondie de la diversité génétique de *M. polymorpha*, en utilisant une combinaison de marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires.

Finalement, une synthèse des résultats les plus significatifs obtenus, permettant de tirer des conclusions générales sur la diversité génétique des deux variétés en Algérie. Ces conclusions pourraient également fournir des pistes pour de futures recherches.

Première partie
Revue bibliographique

1. Famille des fabacées (*Fabaceae*)

1.1. Généralités

La famille des fabacées (ex. Légumineuses) est l'une des plus importantes du règne végétal (Berrabah et Chemissa, 2017). Le terme Fabacées vient de « *Faba* » qui est un nom latin désignant la fève '*Vicia faba*' (Guirese, et *al.*, 2010) et Légumineuses vient de « *legumen* » désigne botaniquement la gousse de la graine elle-même, est souvent appliqué à la fois au fruit ou à la graine et à la plante ou à la famille de plantes (Deshpande et Deshpande, 1991).

Elle se classe au troisième rang des plantes à fleurs (angiospermes) après les familles *Orchidaceae* et *Asteraceae* (Singh, et *al.*, 2021) et la deuxième plus importante pour les pâturages d'intérêt agricole, après les Poacées (graminées) (Medoukali, 2016).

Elles comprenant environ 730 genres et plus de 19 000 espèces des plantes dicotylédones, dialypétales, superovariées, herbacées ou arborexentes annuelles, bisannuelles ou pérennes (Tahkoubit, 2018).

1.2. Distribution géographique

Le principal centre de la diversité des Fabacées est situé en Amérique du centre et du sud. D'autres centres de la diversité sont localisés également en Afrique et en Asie (**Figure 1**). En général, les Fabacées sont distribuées dans tous les biomes terrestres. Leur répartition est cependant variable selon la sous-famille (Ndayishimiye, 2011).

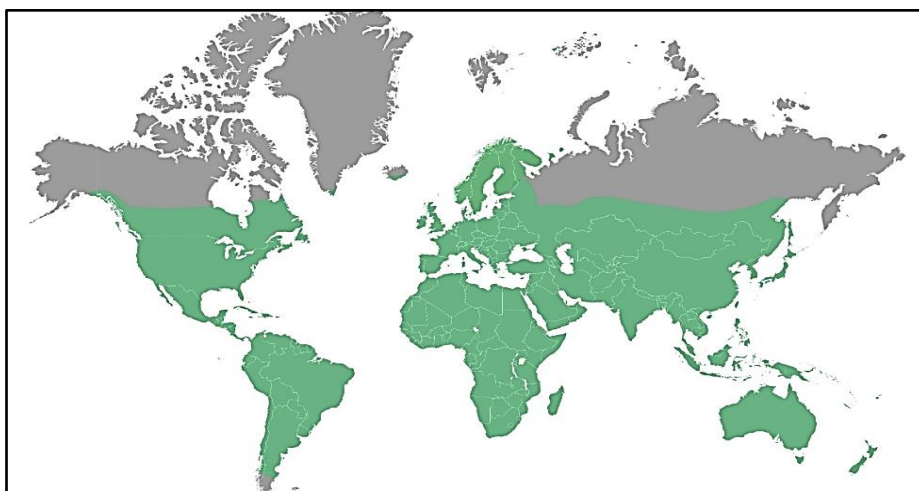


Figure 1 : Carte de répartition de la famille des *Fabaceae* d'après Heywood (Zerdazi et Rebbah, 2017).

1.3. Classification

Selon le système de classification phylogénétique en vigueur APG II (2013), basé sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles distinctes, les *Caesalpinioideae* (3%), les *Mimosoideae* (13%) et les *Papilionoideae* ou *Faboideae* (84%) (Ramdani, 2021).

Une nouvelle classification des sous-familles présentée par le LPWG (2017) divise les Leguminosae en six sous-familles (**Tableau 1**) : *Detarioideae*, *Cercidoideae*, *Duparquetioideae*, *Dialioideae*, *Caesalpinioideae*, *Papilionoideae* (Pérez-Lara, et al., 2019). L'ancienne sous-famille *Mimosoideae* a été incorporée dans les *Caesalpinioideae* en tant que clade *mimosoïde* (Hasanuzzaman, et al., 2020).

Tableau 1 : Classification en six sous-familles des légumineuses.

La famille : <i>Fabaceae</i> / <i>Leguminosae</i>				
Sous-famille	Genre	Espèce	Exemples	Caractéristiques (Azani, et al., 2017)
<i>Detarioideae</i>	84	760	<i>Saraca indica.</i> <i>Copaifera officinalis.</i>	Fleur jamais papilionacée.
				2n principalement 24 chromosomes.
<i>Cercidoideae</i>	12	335	<i>Bauhinia tomentosa.</i> <i>Cercis canadensis.</i>	Fleur parfois papilionacée.
				2n = 14, 24, 26, 28 chromosomes.
<i>Duparquetioideae</i>	1	1	<i>Duparquetia orchidacea</i>	Fleur jamais papilionacée.
				Nombre de chromosome inconnu.
<i>Dialioideae</i>	17	85	<i>Zenia insignis.</i> <i>Poepigia procera.</i>	Fleur parfois papilionacée.
				2n = 28 chromosomes.
<i>Caesalpinioideae</i>	148	4400	<i>Senna siamea.</i> <i>Mimosa tenuiflora.</i>	Fleur parfois papilionacée.
				2n principalement 24, 26, 28 chromosomes.
<i>Papilionoideae</i>	503	14000	<i>Medicago polymorpha.</i> <i>Lupinus luteus.</i>	Fleur à corolle papilionacée.
				2n principalement 16, 18, 20, 22 chromosomes.

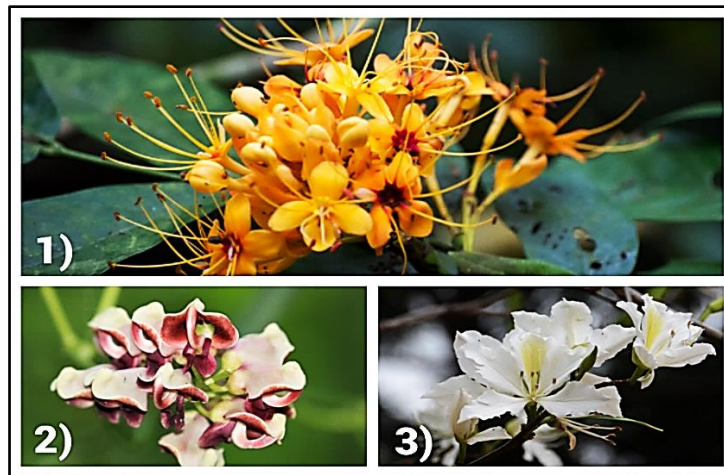


Figure 2 : Exemples d'espèces appartenant à la famille des Fabacées.

(1) *Saraca indica*, (2) *Apios americana*, (3) *Bauhinia variegata*.

(https://www.inaturalist.org/taxa/47122-Fabaceae/browse_photos)

1.4. Intérêts

La particularité de cette famille réside dans sa capacité à former des relations symbiotiques avec des bactéries du sol appelées Rhizobiums (Ati, 2010) pour former des organes racinaires « nodosités » ou « nodules » qui contiennent une hémoprotéine, la leghémoglobine (ou LegHb), très proche de l'hémoglobine permet la fixation de l'oxygène pour créer un milieu anaérobie favorable au développement de cette bactérie (Messioughi, 2016) qui a son tour transforme l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante endomycorhizes (Journet, et *al.*, 2001). Ce caractère permet de rentabiliser les cultures antérieures en enrichissant le sol en azote (Ghiat, 2011).

Depuis le début de la civilisation, les graines et gousses (fruits spécifiques des légumineuses) ont joué un rôle très important dans l'alimentation humaine, car elles constituent une source exceptionnelle de protéines (le pois, la féverole, le haricot) et de lipides (le soja et l'arachide). Les légumineuses sont aussi une source importante de fourrage pour les animaux (luzerne, trèfle) (Karaki, 2013).

Beaucoup d'espèces des Fabacées ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle ; comme *Trigonella foenum graecum* (fenugrec), *Glycine soja* (Siebold et Zucc) (Berrabah et Chemissa, 2017) et peuvent être utiles dans diverses industries chimiques, comme le plastique biodégradable, l'huile et le biodiésel (Ghiat, 2011).

Un nombre non négligeable de fabacées est toxique et il est important de noter que son ordre comporte plus de 16000 espèces dangereuses. Après avoir cité quelques espèces d'intérêt thérapeutique, il serait utile d'attirer l'attention sur un certain nombre d'espèces dangereuses. Les parties le plus souvent incriminées dans les empoisonnements sont les graines où sont accumulés les principes toxiques comme *Tephrosia vogelii*, *Physostigma venenosum* et genre de *Coronilles* (Mekkiou, 2005).

2. Genre *Medicago*

Medicago (la luzerne) est un genre de plantes à fleurs (**Figure 3**) de la famille des *Leguminosae*, communément appelé medick ou trèfle (Haddoudi, et al., 2020).

Le terme "*Medicago*", vient du mot latin "*Medica*" ou « herbes de Médic », il fut modifié par Dale champs en 1587, et devient : *Medicago* (Medoukali, 2016). Notons que le nom de genre « *Medicago* », n'est pas en rapport comme on pourrait le croire, avec des propriétés médicinales de la plante, mais de son lieu d'origine. En effet, la Luzerne sera originaire de Médie (région allant du Nord-Ouest de l'Iran à l'Azerbaïdjan) (Alane, 2019).

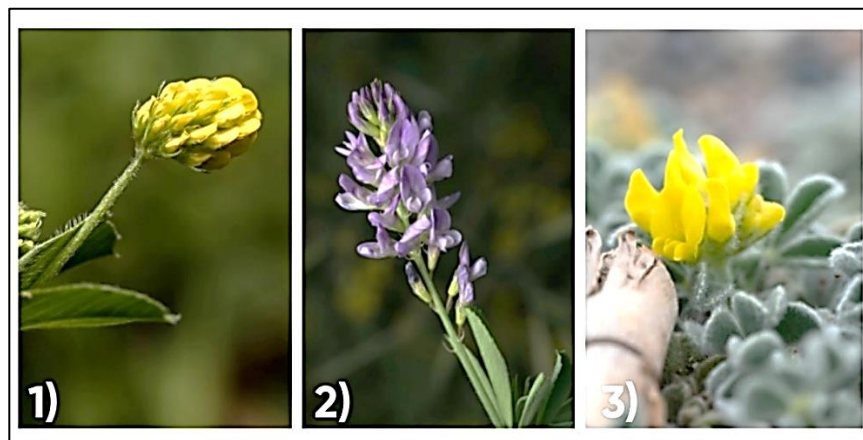


Figure 3 : Exemple d'espèces appartenant au genre *Medicago*.

(1) *Medicago lupulina*, (2) *Medicago sativa*, (3) *Medicago marina*.

(https://www.inaturalist.org/taxa/1092874-Medicago/browse_photos)

2.1. Taxonomie et génétique

Le genre *Medicago* appartient à l'ordre des Fabales, famille des Fabacées et sous-famille des Faboïdées (*Papilionoideae*) (Guines, 2002), tribu des Trifoliées. Cette tribu comprend également la plupart des légumineuses fourragères notamment, les genres *Trifolium* (Exemple

du trèfle, très prolifique en espèces), *Melilotus* (mélilot) et *Trigonella* (fenugrec), proches du genre *Medicago* (Halmi, 2010).

Ce genre est très large et très divers en espèces, environ 87 espèces d'herbes et arbustes (Benmouhoub, 2016) et contient une grande variété de ploïdie et du nombre chromosomique de base (Bena, et al., 1998). Trois niveaux de ploïdie existent dans les différentes espèces du genre (Alane, 2019) :

- Diploïdes ($2n=2x=14$ et $2n=2x=16$).
- Tétraploïdes ($2n=4x=32$) pour la luzerne cultivée (*Medicago sativa*).
- Hexaploïdes ($2n=6x=48$).

Le nombre chromosomique de base est $x = 8$ est le plus répandu, exceptionnellement $x = 7$ (*M. polymorpha*, *M. praecox*, *M. rigidula* et certaines formes de *M. murex*) (Benmouhoub, 2016).

2.2. Description botanique

Les plantes du genre *Medicago* sont annuelles ou pérennes, herbacées ou arbustives. Leurs caractéristiques morphologiques (Belloul, 2016) :

- Les feuilles sont trifoliées pétiolées et non terminées par une vrille et leurs folioles sont dentées sur la partie distale.
- Deux stipules collées aux pétioles.
- Une corolle papilionacée, caduque, constituée d'un étendard de deux ailes libres et d'une carène formée par deux pétales inférieurs soudés.
- Androcée diadelphe (9 + 1) : neuf étamines soudées, formant la colonne staminale, plus une dixième étamine libre.
- Le calice est formé de cinq sépales soudés.
- Les inflorescences pédonculées portent jusqu'à 30 fleurs libres.
- La gousse est soit courbée, soit tordue, soit roulée en hélice, épineuse ou non, indéhiscente ou presque.
- Le port est généralement dressé mais peut être prostré (collé au sol), les tiges peuvent être poilues.
- La fleur du genre *Medicago* est constituée de 5 pétales partiellement joints à la base : 1 grand pétale dorsal (l'étendard), 2 petits pétales latéraux (les ailes) et 2 pétales inférieurs soudés entre eux (la carène) (Benmouhoub, 2007).

2.3. Distribution géographique

Les espèces du genre *Medicago* 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 (**Figure 4**). 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 (Halmi, 2010).

Géographiquement, les espèces pérennes et annuelles genre *Medicago* ne se distribuent pas de la même manière. Les espèces annuelles sont cantonnées particulièrement dans la région méditerranéenne, par contre, les espèces pérennes sont à large distribution, se localisent plutôt à l'est de la méditerranée et principalement au centre et l'ouest asiatique (Alane, 2019).

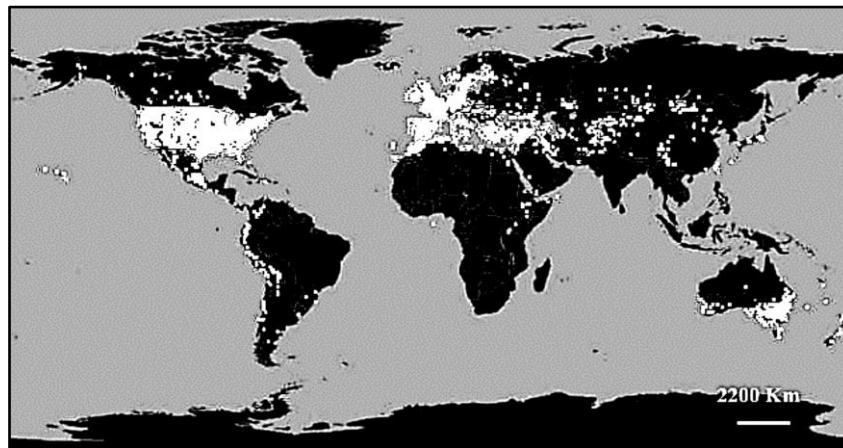


Figure 4 : Carte géographique de la distribution de genre *Medicago* dans le monde (Medoukali, 2016).

3. Espèce *Medicago polymorpha*

3.1. Présentation de l'espèce *M. polymorpha*

Medicago polymorpha L. (Burr Medic) (**Figure 5**) est une légumineuse annuelle d'hiver des régions méditerranéennes, considérée une espèce sauvage relative de luzerne alfalfa (*M. sativa*) et de légumineuses modèle *M. truncatula* (Helliweli, et al., 2018). Il s'agit de l'une des espèces médicinales les plus importantes sur le plan agronomique, principalement utilisée pour le pâturage (Tava, et al., 2011).

Plusieurs noms botaniques lui ont été donnés au cours des années, *M. denticulata* Willd. Et *M. hispida* Gaertn. Étant deux des plus courants. Dans quelques pays comme la Nouvelle-Zélande, le nom préféré est *M. nigra* (L.) (Popay, 2013).



Figure 5 : Espèce *Medicago polymorpha*.

(https://www.inaturalist.org/taxa/53151-Medicago-polymorpha/browse_photos)

3.2. Arbre taxonomique, d'après Lesin et lesins (1979)

Domaine : *Eukaryota*

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophyta*

Sous-embranchement : *Angiospermae*

Classe : *Dicotyledonae*

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabla*

Famille : *Fabaceae*

Sous famille : *Papilionoideae* ou *Faboideae*

Genre: *Medicago* L. 1753

Espèce: *Medicago Polymorpha* L.1753






3.3. Description botanique

M. polymorpha est une plante herbacée annuelle ou bisannuelle de 20-50 cm, couchée ou ascendante, presque glabre à graines dures et auto-ensemencantes (Graziano, et *al.*, 2010). Elle est autogame (auto-pollinisant) et diploïde ($2n = 2x = 14$) (Hannachi, et *al.*, 1998).

L'épithète *polymorpha* est basée sur le grec *polys*, qui signifie plusieurs, plus morphe, qui signifie forme ou forme, une allusion à la large gamme d'apparence des plantes de cette espèce (Small, 2011). Selon Heyn (1963), trois variétés botaniques de cette espèce ont été identifiées en fonction du nombre de rouleaux et d'épines sur les bavures : *M. brevispina*, *M. polymorpha* et *M. vulgaris* (Jing et Esfandani-Bozchaloyi, 2022).

La plante présente les caractéristiques morphologiques suivantes (**Tableau 2**) :

Tableau 2: Description des caractéristiques morphologiques de *M. polymorpha* (Lesins et Lesins, 1979).

	Descriptions	Photos
Tiges	Des nombreuses tiges prostrées ramifiées de la couronne et s'étendant vers l'extérieur de 6 à 30 pouces. Là où les peuplements épais développent des tiges peuvent devenir dressées, obtenant des hauteurs de 18 à 24 pouces dans les années plus favorables.	
Feuilles	Les feuilles sont subglabres et d'apparence trèfle, avec des folioles normalement en forme de coin et dentées vers le haut.	
Fleurs	La grappe de fleurs se compose de 3 à 5 petites fleurs jaunes qui fleurissent au début du printemps. Les fleurs sont vraiment minuscules.	
Fruits	Gousses, enroulées en 2 à 5 spirales, formant un corps en forme de tambour d'environ 5 mm de diamètre, les marges avec des épines droites ou crochues pouvant atteindre 3 mm de long, ou parfois sans épines. Les gousses contiennent plusieurs graines en forme de rein.	
Graines	Brunes, réniformes, de 2 à 4 mm de long, 1 à 2 graines par enroulement de la gousse.	

La différence entre les variétés de cette espèce réside dans le caractère morphologique de ses fruits (Badri et *al.*, 2016), soit :

- *M. polymorpha* var. *polymorpha* (**Figure 6, A**) : Cette variété a des épines plus longues et plus courbées que les autres variétés et se trouve dans les zones sèches et sablonneuses.
- *M. polymorpha* var. *vulgaris* (**Figure 6, B**) : Cette variété se caractérise par des épines plus courtes plus larges que celles des autres variétés de l'espèce et se trouve couramment dans les régions méditerranéennes.
- *M. polymorpha* var. *brevispina* (**Figure 6, C**) : Est généralement caractérisée par des gousses internes ou tuberculées et se trouve souvent dans des habitats perturbés tels que les bords de route et les champs agricoles.

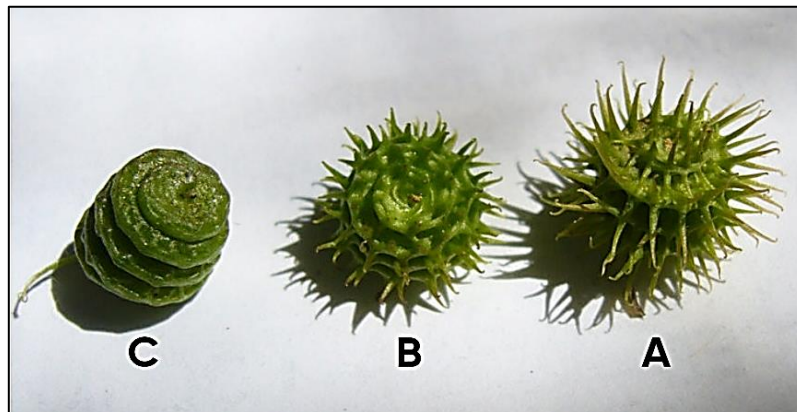


Figure 6 : Gousses des variétés de *Medicago polymorpha*.

(<https://eol.org/ar/pages/703648>)

3.4. Distribution géographique

L'espèce est largement distribuée comme un sauvage dans toute la région méditerranéenne couvrant l'Afrique du Nord, l'Asie et l'Europe et tolère une grande variété d'habitats (Jardins et zones ornementales, zones non aménagées et perturbées, les terres agricoles en particulier le blé champs et bords de route) (Hannachi et *al.*, 2016). Elle se trouve également dans les régions de type méditerranéen ; l'Australie, le Chili, l'Afrique du Sud et les États-Unis, introduit accidentellement et volontairement dans ces zones (Graziano, et *al.*, 2010). Sa répartition géographique indiquerait une préférence pour le stade bioclimatique semi-aride supérieur (Hannachi et *al.*, 1998).

Elle est bien adaptée dans les sols alcalins, aussi capable d'être cultivée sur des sols modérément acides en raison de sa tolérance aux conditions acides pendant la phase de nodulation. Sa résistance au froid est bien documentée (Zaidi et Kared, 2017).

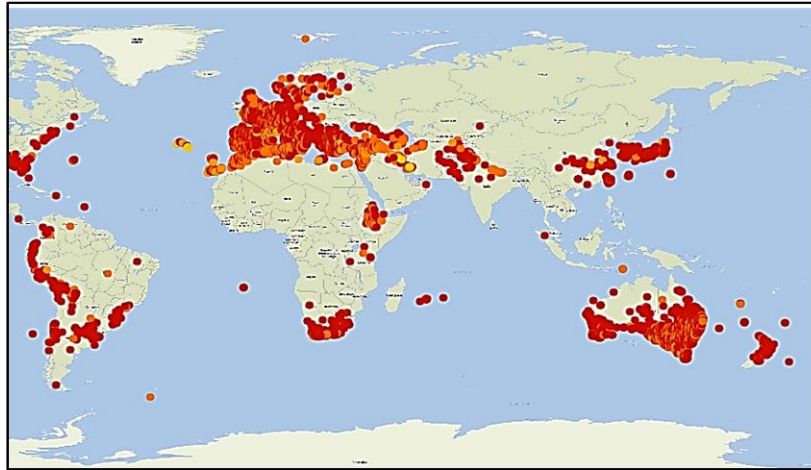


Figure 7 : Carte géographique de répartition de l'espèce *M. polymorpha* dans le monde.

(https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/107689/tab/carte)

3.5. Cycle de vie

M. polymorpha est une plante annuelle, ce qui signifie qu'elle accomplit son cycle de vie en une seule année. Son cycle de vie peut être décrit selon les étapes suivantes (Lesins et Lesins, 1979) :

- **La germination des graines** : Les graines germent à l'automne ou au printemps, en fonction des conditions environnementales telles que la température et l'humidité.
- **Croissance végétative** : Après la germination, la plante se développe de manière végétative, produisant des feuilles, des tiges et des racines. Pendant ce stade, la plante développe une racine pivotante profonde qui lui permet d'accéder aux nutriments et à l'eau en profondeur dans le sol.
- **La floraison** : Elle commence généralement à fleurir au printemps ou au début de l'été, produisant de petites fleurs jaunes sur de longues tiges.
- **Production de graines** : Après la floraison, *M. polymorpha* produit des gousses qui contiennent plusieurs petites graines. Les gousses mûrissent et deviennent brunes à mesure que les graines à l'intérieur mûrissent.
- **Sénescence et mort** : Après la production de graines, la plante commence à sénesce et finit par mourir, généralement à la suite de stress environnementaux tels que la sécheresse ou le gel.

M. polymorpha est une plante à croissance rapide et très adaptable qui peut accomplir son cycle de vie dans un large éventail de conditions environnementales.

3.6. Intérêts

3.6.1. Intérêt agronomique

M. polymorpha est connu pour ses aspects bénéfiques agricoles et environnementaux car elle a le potentiel d'être utilisée comme une espèce de pâturage à régénération spontanée en rotation avec des céréales ou pour améliorer les prairies permanentes (Loi et *al.*, 1995).

En outre, elle est très utile pour la restauration du sol, l'engrais vert et la couverture hivernale pour le contrôle de l'érosion, en particulier dans les zones de sécheresse. Le trèfle de Bur va augmenter la matière organique du sol dans les sols bien drainés. Ses caractéristiques de croissance rapide et dense, sa capacité à fixer l'azote et à augmenter la quantité d'azote disponible dans le sol le rendent très utile en tant qu'engrais vert (Clark, 2014).

3.6.2. Intérêt économique

Bur Medic est reconnue comme une plante fourragère nutritive et appétente. En raison de son contenu nutritionnel élevé et de sa comestibilité, il est consommé cuit et frais en Chine. Au cours des dernières années, *M. polymorpha* a été de plus en plus utilisée pour l'alimentation animale et la consommation humaine (Cui, et *al.*, 2021).

3.6.3. Intérêt médicinal

Notre espèce d'intérêt contient un large éventail de substances phytochimiques, notamment des flavonoïdes, des saponines, des tanins, des alcaloïdes, des composés phénoliques et des terpénoïdes. Il a été démontré que ces composés bioactifs possèdent diverses propriétés pharmacologiques, notamment des effets antioxydants, anti-inflammatoires, antimicrobiens, anti-infectieux, antifongiques, antitumoraux et immunomodulateurs (Sharma, et *al.*, 2017).

L'action biologique, qui comprend la propriété antioxydante rend la plante efficace contre la maladie à médiation de radicaux libres et a donc un potentiel pour traiter le cancer (Khan, et *al.*, 2013) puisque les flavonoïdes ont réduit la teneur en glutathion et en ascorbate.

De plus, elle présente une source remarquable de vitamines pour soutenir l'immunité (Zrig, et *al.*, 2021).

La graine peut être broyée en poudre et mélangée avec de l'eau et utilisée pour traiter différentes maladies comme les maladies de la peau, la dysenterie, la cicatrisation (Ishtiaq, et *al.*, 2022). Les feuilles fraîches de *M. polymorpha* sont cuites dans l'eau sont prises par voie orale pour traiter l'indigestion et la constipation (Ahmad, et *al.*, 2022) et aussi, sont employées pour traiter l'anémie et le diabète (El Alami, et *al.*, 2016).

4. Diversité génétique

La biodiversité a été remarquée dès l'Antiquité et englobe l'ensemble des espèces de plantes, d'animaux et de micro-organismes ainsi que les écosystèmes et les processus écologiques dont ils sont un des éléments, c'est un terme général qui désigne le degré de variété naturelle incluant à la fois le nombre et la fréquence des écosystèmes, des espèces et des gènes dans un ensemble donné. Il y a trois niveaux d'organisation de la diversité biologique ; génétique, spécifique et écosystémique (Chaddadi, 2019).

La diversité génétique ou la variation génétique est une source fondamentale de biodiversité (Hughes, et *al.*, 2008). Elle décrit la variation des gènes au sein des espèces, c'est-à-dire la variation héritable dans et entre les populations d'organismes (Chaoui et Toudjini, 2020). En d'autres termes, la diversité génétique est définie par le niveau de similarité ou de différence dans la composition génétique des individus, des populations et des espèces (Neji, 2014).

Cette diversité est la résultante de la sélection, la mutation, la migration, la dérive génétique et/ou la recombinaison. Tous ces phénomènes provoquent des changements dans les fréquences de gènes et d'allèles, conduisant à l'évolution des populations ; le changement de la séquence d'un gène peut éventuellement entraîner une modification qualitative ou quantitative de son expression, et par conséquent de son produit, la protéine, et in fine du phénotype de l'individu (De Vicente et Fulton, 2003; Khalfaoui et Ghelbi, 2021).

L'intérêt porté à la diversité génétique s'est concentré sur son origine et son maintien, son rôle dans l'évolution de la reproduction sexuée et la manière dont le niveau et les types de variance et les types de variance génétique influent sur le rythme des changements évolution au sein des populations (Hughes, et *al.*, 2008).

5. Marqueurs génétiques

L'étude de la diversité génétique ou polymorphisme génétique est liée au développement de la biologie qui a permis le développement de plusieurs marqueurs (Khalfallah et Lachelah, 2020). Ces marqueurs offrent l'avantage d'une estimation objective de la diversité des génomes, totalement indépendante des conditions de milieu (Ollivier et Foulley, 2013).

La définition classique d'un marqueur génétique donnée par les dictionnaires académiques modernes de biologie, selon laquelle il est tout gène ou allèle dont l'expression phénotypique est généralement facile à identifier (Rieger et *al.*, 1991). Il est également synonyme de "locus marqueur" ; un locus polymorphe qui marque (étiquette) aisément détectable grâce à un emplacement connu sur un chromosome (Chesnokov, et *al.*, 2020).

Selon les molécules utilisées pour révéler le polymorphisme (Prat, et *al.*, 2006), les marqueurs génétiques sont généralement divisés en trois grandes classes : morphologiques ou phénotypiques, moléculaires, biochimiques (Chesnokov, et *al.*, 2020).

5.1. Marqueurs morphologiques

Les marqueurs morphologiques ont été les premiers marqueurs génétiques utilisés (Prat, et *al.*, 2006). Ils sont généralement des indicateurs visuels de caractères phénotypiquement différents et de type qualitatif tels que la couleur, la forme et la taille de la fleur, des graines ou des feuilles ; le type de développement des plantes, des inflorescences ou du système racinaire ; la pigmentation ; ou le port (Chesnokov, et *al.*, 2020).

Le nombre de marqueurs morphologiques ainsi que leur expression sont restreints et souvent fortement influencée par le milieu. Les différents individus doivent être évalués dans les mêmes conditions environnementales. Ces marqueurs ne doivent pas être négligés malgré leurs limites car ce sont encore les critères utilisés pour décrire et identifier les taxons, lignées et variétés chez les végétaux (Prat, et *al.*, 2006).

5.2. Marqueurs biochimiques

Ils sont apparus vers 1970, encore appelés marqueurs protéiques sont des protéines produites par l'expression de gènes dont elle est indépendante de l'environnement et qui peuvent être séparées par électrophorèse afin d'en identifier les allèles. Les marqueurs les plus communément utilisés sont les isoenzymes (Ghalmi, 2011) et ont été utilisés avec succès dans

la détection de la diversité génétique, de la structure des populations, des flux de gènes et de la subdivision des populations (Mateu-Andrés et De Paco, 2004).

Ces marqueurs sont codominants, faciles à utiliser et rentables. Cependant, ils sont moins nombreux, détectent moins de polymorphisme et sont affectés par diverses méthodologies d'extraction, les tissus végétaux et les différents stades de croissance des plantes la facilité d'utilisation et le faible coût (Nadeem, *et al.*, 2017).

5.3. Marqueurs moléculaires

Les marqueurs moléculaires constituent une nouvelle génération de marqueurs génétiques qui ont été apparus en 1990 (Neji, 2014). Ils sont définis comme des fragments spécifiques d'ADN qui peuvent être identifiés dans l'ensemble génome et se trouvent à des emplacements précis du génome (Datta, *et al.*, 2011). Les marqueurs d'ADN sont utilisés pour étudier la variabilité et la diversité directement sur l'ADN c'est-à-dire « marquer » la position d'un gène particulier ou l'héritage d'un caractère particulier (Ghalmi, 2011; Datta, *et al.*, 2011).

De nombreuses méthodes de détection du polymorphisme de l'ADN ont été établies au cours des années, y compris : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP), Polymorphisme de longueur de fragment amplifié (AFLP), Inter Simple Sequence Repeats (ISSR), ADN polymorphe amplifié aléatoire (RAPD), Amplification sélective des locus polymorphes microsatellites (SAMPL), Polymorphisme d'amplification spécifique à la séquence (SSAP), Répétitions séquentielles simples (SSR), Polymorphisme nucléotidique unique (SNP), Technologie Diversity Arrays (DArT) (Henry, 2013).

5.3.1. Microsatellites

Les microsatellites ou répétitions de séquences simples (SSR) sont des séquences constituées par des ensembles de motifs répétés trouvés dans les génomes eucaryotes. Ces séquences comprennent des motifs courts de base (généralement entre 2 et 6 paires de base) répétés en tandem jusqu'à 50 fois dans le génome de la plante. De là, les polymorphismes associés à un locus spécifique sont dus à la variation de la longueur de la séquence microsatellite en fonction du nombre de répétitions du motif de base (Ahuja et Mohan Jain).

Les SSR ont été les marqueurs les plus utilisés pour le génotypage des plantes au cours des 20 dernières années parce qu'ils sont très instructifs, codominants, marqueurs génétiques

multi-allèles qui sont reproductibles expérimentalement et transférables entre les espèces apparentées (Vieira, et *al.*, 2016). Ils sont utilisés pour différents avantages (Henry, 2013) :

- Ils présentent un héritage co-dominant.
- Très répandues dans le génome.
- Très sensibles à la détection d'une énorme diversité allélique.
- Faciles à utiliser et très reproductibles.
- Peuvent être multiplexés en PCR et l'automatisation est possible.

5.4. Critères d'un bon marqueur

Les propriétés les plus importantes sont confirmées par de Vienne (1998) :

- Être hautement polymorphe : condition nécessaire pour évaluer la variabilité génétique.
- Codominant : capable de discriminer entre homozygotes et hétérozygotes états dans les organismes diploïdes.
- Occurrence fréquente dans le génome.
- Résoudre adéquatement les différences génétiques.
- Détecter des loci multiples, indépendants et fiables.
- Comportements neutres sélectifs : les séquences d'ADN de tout organisme sont neutres conditions environnementales ou pratiques de gestion, ce qui permet de conférer la variation uniquement vers une origine génétique.
- Accès facile et dosage rapide : il doit être simple, rapide et peu coûteux.
- Grande reproductibilité : pour garantir des résultats solides entre différents laboratoires et équipe.
- Exiger de petites quantités de tissus et d'échantillons d'ADN.
- Lien avec des phénotypes distincts.
- N'exiger aucune information préalable sur le génome d'un organisme.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

1. Ahmad, I., Afzal, S., & Shahzad, M. A. (2022). α -Amylase Inhibitory, Immunomodulatory, Phytotoxic, Antifungal Activities and Phytochemical Screening of *Medicago Denticulata*. *International Journal of Current Research and Review*, 14(6), 09-16. doi:10.31782/IJCRR.2022.14602
2. Ahuja, M. R., & Mohan Jain, S. (s.d.). *Genetic Diversity and Erosion in Plants : Indicators and Prevention* (Vol. 1). Springer. doi:10.1007/978-3-319-25637-5
3. Alane, F. (2019). Recherches sur des espèces spontanées du genre *Medicago* d'Algérie : caractéristiques phénologiques, biométriques et nutritionnelles. *Thèse de Doctorat : Sciences Agronomiques , Productions animales*. EL-HARRACH, Ecole nationale supérieure agronomique.
4. Algendaby, M. M., & El-Darier, S. M. (2016). Management of the noxious weed; *Medicago polymorpha* L. via allelopathy of some medicinal plants from Taif region, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25(7), 1339-1347. doi: 10.1016/j.sjbs.2016.02.013
5. Ati, S. (2010). Cartographie de l'aire de répartition de l'espèce *Genista numidica* ssp *numidica* et sa valeur biologique dans l'Est algérien. *Mémoire de Magister : écologie végétale*. Annaba, Université Badji Mokhtar.
6. Azani, N., Babineau, M., Bailey, C., Banks, H., Barbosa, A. R., Pinto, R. B., . . . Zimmerman, E. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny : The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon*, 66(1), pp. 44-77. doi: 10.12705/661.3
7. Badri, M., Ben Cheikh, N., Mahjoub, A., & Abdelly, C. (2016). Morpho-phenological diversity among natural populations of *Medicago polymorpha* of different Tunisian ecological areas. *African Journal of Biotechnology*, 15(25), 1330-1338. doi:10.5897/AJB2015.14950
8. Belloul, K. (2016). Etude cytogénétique de *Medicago intertexta* (L.) Miller du Golfe de Béjaïa. *Mémoire de Master : Génétique Appliquée* . Béjaïa, Université Abderrahmane Mira.

Références bibliographiques

9. Benmouhoub , H. (2007). Analyse d'hybrides F1 et F2 intra- et/ou interspécifiques chez *Medicago polymorpha* L., *M. intertexta* (L.) Miller, *M. ciliaris* (L.) Krockner, *M. arabica* (L.) Hudson, *M. orbicularis* (L.) Bartal. et *M. minima* (L.) Bartal.: interprétation taxogénétique. *Mémoire de Magister : Biologie de la Conservation et Ecodéveloppement*. Béjaïa, Université Abderrahmane Mira.
10. Benmouhoub, D. (2016). Les méthodes de reconstruction phylogénétique : Modèles, exploitation des logiciels et applications à *Medicago* L. (*Fabaceae*). *Mémoire de Master : Génomique et Biotechnologie Végétal*. Blida, Université de Saad Dahleb. Departement de Biologie des populations et des organismes.
11. Berrabah, S., & Chemissa, M. (2017). Aperçu ethnobotanique et chimique des Fabacées. *Mémoire de Master : Gestion de l'Environnement*. M'sila, Université Mouhamed Boudiaf .
12. Boukri, M. (2017). Biodiversité végétale et zones refuges du petit Maghreb. *Mémoire de Master : Biologie et Génomique Végétale*. Constantine, Université Des Frères Mentouri.
13. Chaddadi, M. (2019). Valeur écologique et récréative d'un jardin public dans la ville de Souk-Ahras . *Mémoire de Master : Sciences Agronomiques, Protection des végétaux*. Biskra, Université Mohamed Khider.
14. Chaoui, M., & Toudjini, S. (2020). Contribution à l'étude du polymorphisme génétique par les marqueurs biochimique et moléculaires de quelques accessions de l'espèce tétraploïde *Aegilops truinicialis* L. *Mémoire de Master : Biotechnologie végétale*. Oum El Bouaghi, Université Larbi Ben Mhidi .
15. Chesnokov, Y., Kosolapov, V., & Savchenko, I. V. (2020). Morphological Genetic Markers in Plants. *Russian Journal of Genetics*, 50(12), 1406–1415.
16. Clark, S. (2014). Plant guide for bur clover (*Medicago polymorpha* L.). *USDA-Natural Resources Conservation Service, Big Flats Plant Materials Center, corning New York*.
17. Cui, J., Lu, Z., Wang, T., Chen, G., Mostafa, S., Ren, H., . . . Jin, B. (2021). The genome of *Medicago polymorpha* provides insights into its edibility and nutritional value as a vegetable and forage legume. *Horticulture research*, 8(1). doi:10.1038/s41438-021-00483-5

Références bibliographiques

18. Datta, D., Gupta, S., Chaturvedi, S. K., & Nadarajan, N. (2011). *Molecular Markers in Crop Improvement*. Indian Institute of Pulses Research, Kanpur - 208 024.
19. De Vicente, M. C., & Fulton, T. (2003). *Using Molecular Marker Technology in Studies on Plant Genetic Diversity Studies: Learning Module*. Rome, Genetic Resources Institute (IPGRI), Italy.
20. Deshpande, U., & Deshpande, s. s. (1991). Legumes. doi:10.1007/978-1-4615-2039-9_3
21. El Alami, A., Loubna, F., & Chait, A. (2016). Etude ethnobotanique sur les plantes médicinales spontanées poussant dans le versant nord de l'Atlas d'Azilal (Maroc). *Algerian Journal of Natural Products*, 4(2), 271-282. doi:10.1025/ajnp.2016.4.2.282
22. Ghalmi, N. (2011). Etude de la diversité génétique de quelques écotypes locaux de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Cultivé en Algérie. *Thèse de Doctorat : Sciences Agronomiques*, 177. El Harrach- Alger , École Nationale Supérieure Agronomique (ENSA).
23. Ghiat, N. (2011). Etude de la diversité génétique des espèces de *Phoma* spp. inféodées aux *Fabaceae*. *Mémoire de Magister : Sciences Agronomiques, Phytopathologie-Amélioration génétique des plantes aux maladies*. EL-Harrach, Ecole Nationale Supérieure Agronomique.
24. Graziano, D., Di Giorgio, G., Ruisi , P., Amato, G., & Giambalvo , D. (2010). Variation in pheno-morphological and agronomic traits among burr medic (*Medicago polymorpha* L.) populations collected in Sicily, Italy. *Crop and Pasture Science*, 61(1), pp. 59–69. doi:https://doi.org/10.1071/CP09116
25. Guines, F. (2002). Bases génétiques des variations pour la structure histologique des tiges de luzerne (*Medicago sativa* L.). *Thèse de Doctorat : Biologie et Agronomie* . Rennes: Ecole Nationale Supérieur Agronomique .
26. Haddoudi, L., Hdira, S., Ben Cheikh, N., Mahjoub, A., Abdelly, C., Ludidi, N., & Badri, M. (2020). Assessment of genetic diversity in Tunisian populations of *Medicago polymorpha* based on SSR markers. *Chilean journal of agricultural research* , 81(1), 53-61. doi:10.4067/S0718-58392021000100053

Références bibliographiques

27. Halmi, S. (2010). Contribution à l'étude cytogénétique de quelques espèces du genre *Medicago* (L). *Mémoire de Magistère : Biotechnologies Végétales* . Constantine: Université Frères Mentouri.
28. Hannachi, A. S., Boussaid, M., & Marrakchi, M. (1998). Genetic variability organisation and gene flow in natural populations of *Medicago polymorpha* L. prospected in Tunisia. *Genet Sel Evol*, 30(Suppl 1), pp. S121-S135. doi:10.1186/1297-9686-30-S1-S121
29. Hasanuzzaman, M., Araújo, S., & Gill, S. S. (2020). *The Plant Family Fabaceae : Biology and Physiological Responses to Environmental Stresses*. Springer Publishing.
30. Helliweli, E., Faber-Hammond, J., Garoutte, A., Garoutte, A., Wettberg, E. V., Friesen, M. L., & Porter, S. S. (2018). Rapid establishment of a flowering cline in *Medicago polymorpha* after invasion of North America. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/mec.14898
31. Henry, R. J. (2013). *Molecular Markers in Plants*. A John Wiley & Sons.
32. Heyn , C. (1963). *The Annual Species of Medicago*. Magnes Press, Jerusalem.
33. Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), pp. 609–623. doi:10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x
34. Ishtiaq, M., Khanum, H., Hussain, I., Parveen, A., Maqbool, M., Thind, S., . . . Elansary, H. O. (2022). Ethnobotanical inventory and medicinal perspectives of herbal flora of Shivalik mountainous range of District Bhimber, Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *PLoS ONE*, 17(3). doi:10.1371/journal.pone.0265028
35. Jing, H., & Esfandani-Bozchaloyi, S. (2022). Genetic diversity and gene-pool of *Medicago polymorpha* L. based on retrotransposon-based markers. *Caryologia*, 75(1), 131-140. doi:10.36253/caryologia-
36. Journet, E. P., Carreau, V., Gouzy, J., Thoquet, P., Rosenberg, C., Barker, D., . . . Gamas, P. (2001). Génomique de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* : état des lieux et perspectives. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 8(5), pp. 478-484.

Références bibliographiques

37. Karaki, L. (2013). Diversité génétique et fonctionnelle des molécules homologues de PA1b chez *Medicago truncatula* Gaertn. ainsi qu'au sein de légumineuses originaires du Liban. *Thèse de Doctorat : Sciences agricoles*. INSA de Lyon ; Université Libanaise.
38. Khalfallah, L., & Lachelah, R. (2020). Evaluation de la diversité génétique au sein de l'espèce *Trifolium angustifolium* par les marqueurs protéiques (Albumines et globulines). *Mémoire de Master : Biochimie de la nutrition*. Constantine, Université Frères Mentouri .
39. Khalfaoui , R., & Ghelbi, S. (2021). Variabilité de quelques propriétés physiques des graines chez *Medicago truncatula*. *Mémoire de Master : Biochimie de la nutrition*. Constantine, Université Frères Mentouri.
40. Khan, M. I., Asad, S., Zaman, G., Rehman, H., Rehman, S., Iqbal, A., . . . Ali, S. (2013). Antioxidant And Cytotoxic Activities Of Crude Methanolic Extract Of *Medicago Polymorpha*. *IOSR Journal Of Pharmacy*, 3(8), 32-37.
41. Lesins , K., & Lesins , A. (1979). *Genus Medicago (Leguminosae) : a taxogenetic study* (Vol. 50). Plant.
42. Loi, A., Porqueddu, C., Verones, F., & Cocks, P. S. (1995). Distribution, diversity and potential agronomic value of *Medicago polymorpha* in Sardinia. *Journal of Agricultural Science*, 124, 419-426.
43. Mateu-Andrés, I., & De Paco, L. (2004). Allozymic Differentiation of the *Antirrhinum majus* and *A. siculum* Species Groups. *Annals of Botany*, 95(3), pp. 465-473. doi:10.1093/aob/mci055,
44. *Medicago polymorpha* L., 1753 - *Lucerne polymorphe, Lucerne à fruits nombreux*. (n.d.). Retrieved 02 27, 2020, from Inventaire National du Patrimoine Naturel: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/107689/tab/carte
45. Medoukali, i. (2016). Les genres *Medicago* L. et *Trifolium* L. en Algérie : Diversité morphologique, biochimique et moléculaire. *Thèse de Doctorat : Biochimie et Biotechnologies*. Constantine, Université Frères Mentouri.

Références bibliographiques

46. Mekkiou, R. (2005). Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires d'espèces du Genre *Genista* (*Fabaceae*) : *G. saharae*, *G. ferox*. *Thèse de Doctorat*, 9p. Constantine, Université Frères Mentouri.
47. Meriane, D. (2018). Etude biologique et phytochimique de *Calobota saharae* (Coss. & Dur.) Boatwr. & B.E. van Wyk. *Thèse de Doctorat : Biologie Végétale*. Sétif, Université Ferhat Abbas.
48. Messioughi, A. (2016). Etude d'une plante fourragère la luzerne *Medicago sativa*.L: importances phytochimiques, aspects thérapeutiques et essais microbiologiques. *Thèse de Doctorat : Biologie Végétale*. Annaba, Université Badji Mokhtar.
49. Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., . . . Baloch, F. S. (2017). DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 261-285. doi:10.1080/13102818.2017.1400401
50. Ndayishimiye, J. (2011). Diversité, endémisme, géographie et conservation des Fabaceae de l'Afrique Centrale. *Thèse de Doctorat : Service d'Ecologie du Paysage et Systèmes de Production Végétale*, 12 p. Ecole Inter facultaire de Bio ingénieurs, Bruxelles.
51. Neji, M. (2014). Analysis of the genetic diversity of Tunisian natural populations of *Brachypodium*. *Thèse de Doctorat : Genetics and Molecular Biology / Biologia Vegetale E Produttivita Della Pianta Coltivata*. University of Tunis El Manar / University of Milan.
52. Ollivier, L., & Foulley, J.-L. (2013). Mesure et évolution de la diversité génétique des plantes cultivées et des Animaux Domestiques. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture*, 99(2), pp. 31-41.
53. Pérez-Lara, D., Estrada-Ruiz, E., & Castañeda-Posadas, C. (2019). New fossil woods of Fabaceae from El Bosque Formation (Eocene), Chiapas, Mexico. *Journal of South American Earth Sciences*, 94.
54. *Photos de Bur Clover (Medicago polymorpha)*. (n.d.). Retrieved 02 25, 2023, from iNaturaliste : https://www.inaturalist.org/taxa/53151-Medicago-polymorpha/browse_photos

Références bibliographiques

55. *Photos de la Section Medicago*. (n.d.). Retrieved 02 18, 2020, from iNaturalist: https://www.inaturalist.org/taxa/1092874-Medicago/browse_photos
56. *Photos de Légumineuses (Famille des Fabacées)*. (n.d.). Retrieved 02 18, 2023, from iNaturalist: https://www.inaturalist.org/taxa/47122-Fabaceae/browse_photos
57. Prat, D., Rampant, P. F., & Prado, E. (2006). *Analyse du génome et gestion des ressources génétiques forestières* (1ère édition ed.). Éditions Quae.
58. Ramdani, N. (2021). Etude taxonomique et diversité des bactéries nodulant *Spartium junceum* (L.) de la région de Béjaïa. *Thèse de Doctorat : Microbiologie*. Tizi-Ouzou, Université Mouloud Mammeri.
59. Rieger, R., Michaelis, A., & Green, M. M. (1991). *Glossary of Genetics : Classical and Molecular* (Fifth Edition ed.). Springer Berlin Heidelberg eBooks. doi:10.1007/978-3-642-75333-6
60. Sakhraoui, N., Boussouak, R., Metallaoui, S., Chefrour, A., & Hadeif, A. (2020). La flore endémique du Nord-Est algérien face à la menace des espèces envahissantes. *Acta Botanica Malacitana*, 45, pp. 67-79. doi:10.24310/abm.v45i0.6138
61. Sharma, A., Batish, D. R., Negi, K., & Singh, H. P. (2017). Phytochemical screening and assessment of antioxidant potential of leaf extracts of *medicago polymorpha* and *oxalis corniculata*. *Journal of Biology and Nature*, 8(3), 99-105.
62. Tahkoubit, A. (2018). Isolement et caractérisation de souches bactériennes nodulant la légumineuse *Medicago truncatula* en milieu salin. *Mémoire de Master : Biotechnologies et Génomiques Végétale*. Constantine, Université des Frères Mentouri.
63. Tava, A., Pecetti, L., Romani, M., Mella, M., & Avato, P. (2011). Triterpenoid Glycosides from the Leaves of Two Cultivars of *Medicago polymorpha* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(11), 6142-6149. doi:10.1021/jf2005854
64. Vieira, M. L., Santini, L., Diniz, A. L., & de Freitas Munhoz, C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39(3), pp. 312-328. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027

Références bibliographiques

65. Zaidi, F., & Kared, Y. (2017). Isolement et caractérisation des endosymbiotes de *Medicago polymorpha*. *Mémoire de Master : Ecologie Microbienne*. Bejaia, Université A. MIRA.
66. Zrig, A., Saleh, A., Hamouda, F., Okla, M. K., Al-Qahtani, W. H., Alwasel, Y. A., . . . Abdelgawad , H. (2021). Impact of Sprouting under Potassium Nitrate Priming on Nitrogen Assimilation and Bioactivity of Three *Medicago* Species. *Plants* 2022, 11(1), p. 71. doi:10.3390/plants11010071

Deuxième Partie

Diversité génétique de l'espèce

M. polymorpha

(Article scientifique)

Genetic Diversity in Algerian *Medicago polymorpha* by morphological, biochemical and molecular markers.

Imane MEDOUKALI*, Sara BENM'HAMED, Sara BOUMEZÂAR, Abderrahim LAOUIR
and Douadi KHELIFI.

Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Faculté des sciences de la nature et de la vie, Université Frères Mentouri Constantine 1, 25 000, Constantine, Algérie.

*Corresponding author: Dr. Imane MEDOUKALI@yahoo.fr

Submitted in: Bangladesh Journal of Plant Taxonomy.

Abstract

This study aimed to explore the genetic diversity in Algeria, focusing on population of a total of 56 accessions collected from the northern region of the country, distributed between the *polymorpha* and *vulgaris* varieties, with 28 accessions for each variety. Multiple markers were used to characterize this genetic diversity, including 12 biometric traits, isozyme analysis (GOT and EST systems), protein fractions (albumins and globulins), and microsatellites. Significant diversity in the traits was observed, with a substantial contribution to the discrimination of the studied accessions. The two enzymatic systems showed a closes number of band and phenotypes, with the GOT system having two loci, eight alleles, and 13 phenotypes, and the EST system having four isozymes, 11 bands, and 14 phenotypes. Furthermore, analysis of the albumin and globulin fractions highlighted 48 and 41 distinct bands, respectively. SSR analysis demonstrated a greater genetic polymorphism with 11 and 16 fragments identified by the Afct32 and Afctt11 markers, respectively. Dendrograms obtained from the different approaches used in this study highlight significant intraspecific genetic variability, with different classification patterns observed among the analyzed markers. It appears that the genotypic structure of the natural population of *Medicago polymorpha* in Algeria is influenced by eco-geographic parameters and the autogamy of this species.

Keywords: *Medicago polymorpha*, genetic diversity, Algeria, morphological traits, isoenzymes, proteins, microsatellites.

1. Introduction

The *Fabaceae* family is widely acknowledged for its impressive level of biodiversity among angiosperms, ranking as the third largest family of land plants in terms of species numbers, with around 770 genera and nearly 20,000 species (Abusaief et Boasoul, 2021). This family is extensively utilized for agricultural purposes, serving as a vital source of protein for consumption and as used for nitrogen enrichment in soil (Grygier, et al., 2022).

The genus *Medicago L.* belongs to the *Fabaceae (Leguminosae)* family, which is characterized by its showy flowers. Specifically, it belongs to the subfamily *Papilionoideae*, tribe *Trifolieae*, and subtribe *Trigonellinae* (Woods et Orcutt, 2017). This genus is a prominent component of the flora in the Mediterranean, southern Europe, Asia, and northern Africa, where it thrives in moderately fertile soils with a neutral pH (Sanders, et al., 2010). This plant comprises around 87 distinct species of both herbs and shrubs with varying biological cycles ranging from annual to biennial to perennial. Among the primary annual species is *M. polymorpha L.*, which is a small diploid ranging from 470 to 600 Mb with a chromosomal count of $2n = 2x = 14$ and it is distinguished by its autogamous reproduction that enables self-fertilization (Lesins et Lesins, 1979).

According to Heyn (1963), *M. polymorpha* is classified into three botanical varieties, primarily differentiated by the morphological traits of their fruits. They are as follows: *brevispina*, which has spineless or tubercled pods; *polymorpha*, which has spined pods; and *vulgaris*, which also has spined pods but with a smaller size than the *polymorpha* variety (Badri, et al., 2016). This species is of significant interest due to its remarkable adaptability to challenging soil and climate conditions, making it an ideal candidate for rotation with cereals. Additionally, it is enriched with bioactive compounds that exhibit a broad range of pharmacological properties, including antioxidant, anti-inflammatory, and antimicrobial effects, rendering it a valuable source for medicinal purposes (Sharma, et al., 2017).

Therefore, evaluating the genetic diversity of *M. polymorpha* is crucial to expand the genetic background of the preceding varieties. To achieve this assessment, a range of markers must be employed including morphological markers, serving a visual indicator of phenotypic variation; biochemical markers, which refer to proteins synthesized through gene expression and remain

unaffected by external environmental factors; and molecular markers, that are specific DNA fragments located at distinct locations in the genome and can be identified across the genome.

The present study aimed to investigate the similarities and differences between different accessions of two *Medicago polymorpha* varieties: *M. polymorpha* var. *polymorpha* and *M. polymorpha* var. *vulgaris*, cultivated in their natural habitat in the northern regions of Algeria. To conduct the analysis, morphological markers, isozymes, albumin and globulin seed storage proteins, as well as SSRs markers were utilized.

2. Material and methods

2.1. Plant material

A total of 56 accessions of *M. polymorpha* species were examined in this study, consisting of 28 accessions of var. *polymorpha* and 28 accessions of var. *vulgaris*. These accessions were obtained from pods collected from 41 sites between May 15 and July 15, 2013, that extend from the coastal regions to the Tell Atlas Mountains. The collection sites were described based on several parameters: altitude (ALT), latitude (LAT), longitude (LON), average annual rainfall (Pm), average minimum temperature of the coldest month (Tm), and average maximum temperature of the hottest month (TM) as it represented in (**Table 1**).

The mature seeds of each individual were obtained from pods, and then scarified and sterilized using a 3% (v/v) sodium hypochlorite solution. The sterilized seeds were germinated in petri dishes containing 1% water-agar (w/v) at room temperature in the dark for 2 days, then transferred to normal daylight. For enzymatic and molecular analyses, 0.3 g of young leaves from each sample were finely ground into a powder using liquid nitrogen and stored at -20°C. Meanwhile, protein analysis was performed by grinding mature seeds with a mortar and pestle at room temperature until a fine powder was obtained.



Fig. 1: Geographical locations of the 56 accessions of the specie *M. polymorpha* in the Algerian North.

Table 1 : Geographical origins of the 56 accessions studied, with the corresponding ecogeographical parameters.

N°	Region	Provenance	ALT	LAT	LON	Pm	Tm	TM
<i>Mp1</i>	Constantine	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E	704	3,2	31,4
<i>Mp2</i>	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E	558	3	32,2
<i>Mp3</i>	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624	3,3	32
<i>Mp4</i>	Ain Defla	1	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E	593	6	33,5
<i>Mp5</i>	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	593	6	33,5
<i>Mp6</i>	Ain Defla	3	382	36°18'58,41"N	2°25'46,37"E	593	6	33,5
<i>Mp7</i>	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E	707	8,1	28,5
<i>Mp8</i>	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E	670	7,6	29,8
<i>Mp9</i>	Alger	Ben Aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E	762	6,9	28,4
<i>Mp10</i>	Béjaia	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E	659	6,2	31,3
<i>Mp11</i>	Béjaia	Tichy	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E	856	8,7	28,9
<i>Mp12</i>	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E	506	0,2	30,9
<i>Mp13</i>	Bouira	Akhdoria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E	711	5,9	31,9
<i>Mp14</i>	Mostaganem	-	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E	347	8,3	27,8
<i>Mp15</i>	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	791	7	30,9
<i>Mp16</i>	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E	896	6,2	32
<i>Mp17</i>	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E	626	8,4	30,1
<i>Mp18</i>	Sidi Belabbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E	450	4,8	29,7
<i>Mp19</i>	Boumerdès	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E	739	6,8	30,8
<i>Mp20</i>	Relizane	-	49	35°55'35,18"N	0°47'33,24"E	348	6,8	31,1
<i>Mp21</i>	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E	405	6,6	32,6
<i>Mp22</i>	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O	368	7,5	29
<i>Mp23</i>	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	736	2,5	30,6
<i>Mp24</i>	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E	609	1,1	30,1
<i>MP25</i>	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E	564	1,9	32,1
<i>Mp26</i>	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E	712	8,2	28,1
<i>Mp27</i>	Batna	-	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N	335	0,7	32,6

<i>Mp28</i>	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O	383	8,2	26,6
<i>Mpv1</i>	Mila	Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E	568	2,5	31,3
<i>Mpv2</i>	Mila	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	742	4,4	31,1
<i>Mpv3</i>	Constantine	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E	704	3,2	31,4
<i>Mpv4</i>	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E	558	3	32,2
<i>Mpv5</i>	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624	3,3	32
<i>Mpv6</i>	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E	462	0,4	31,3
<i>Mpv7</i>	Oum Bouaghi	Ouled Hemla	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E	454	1,9	31,7
<i>Mpv8</i>	Oum Bouaghi	Ain Fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E	492	0,4	30,8
<i>Mpv9</i>	Bourdj bouarriridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E	368	1,6	33,4
<i>Mpv10</i>		Air lac ain zada						
	Bourdj bouarriridj	2000m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E	495	0,2	31,1
<i>Mpv11</i>	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E	506	0,2	30,9
<i>Mpv12</i>	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E	711	5,9	31,9
<i>Mpv13</i>	Mostaganem	-	94	35°54'44,96"N	0°04'46,54"E	347	8,3	27,8
<i>Mpv14</i>	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E	405	6,6	32,6
<i>Mpv15</i>	Ain Defla	1	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E	593	6	33,5
<i>Mpv16</i>	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	593	6	33,5
<i>Mpv17</i>	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	593	6	33,5
<i>Mpv18</i>	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O	368	7,5	29
<i>Mpv19</i>	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	736	2,5	30,6
<i>Mpv20</i>	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E	609	1,1	30,1
<i>Mpv21</i>	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E	564	1,9	32,1
<i>Mpv22</i>	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E	712	8,2	28,1
<i>Mpv23</i>	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E	482	1	31,3
<i>Mpv24</i>	Batna	-	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"N	335	0,7	32,6
<i>Mpv25</i>	Jijel	Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E	818	8,2	29,3
<i>Mpv26</i>	Jijel	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E	818	8,2	29,3
<i>Mpv27</i>	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E	767	7,1	28,5
<i>Mpv28</i>	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O	383	8,2	26,6

Mp: *Medicago polymorpha* var. *polymorpha*, *Mpv*: *Medicago polymorpha* var. *vulgaris*

2.2. Morphological analysis

Morphological measurements were conducted on a total of 40 accessions, comprising 21 accessions of the *polymorpha* variety and 19 accessions of the *vulgaris* variety. For each accession of *M. polymorpha*, twelve quantitative traits related to seeds, pods, and cotyledons described by Issolah and Abdelguerfi (1999) were analyzed. Dial-micrometers with an accuracy of 0.01 mm were used to measure the following traits: Pod size: length (LP), width (WP); Number of seeds per pod (SP); Seed size: length (LS), width (WS); Weight of 30 pods (WTP); Weight of a thousand seeds (WTS) and the Ratio weight of seed/weight of pods (RW); Seedling characteristics: date of emergence of cotyledons (DCOT), length of first leaf (LGFT6), width

of first leaf (LRFT6) and area of first leaf (SFT6 = LGFT6 * LRFT6). DCOT was measured from the time the seedlings were placed under light. LGFT6, LRFT6 and SFT6 were measured after six days of germination. Each trait was calculated based on ten randomly chosen individuals from that accession.

2.3. Enzymatic analysis

The 56 accessions of *M. polymorpha* were subjected to evaluation through the use of two enzymatic systems: Esterase (EST, E.C. 3.1.-) and Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT, E.C. 2.6.1.1) as described by Weeden and Wendel in 1990. To extract the isozymes, leaves of 15-day-old seedlings were employed using the process established by Bendiab *et al.* in 1993. Subsequently, enzyme separation was carried out through polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) method, as outlined in the methodology of Singh *et al.* in 1991 where the EST system was subjected to analysis using a 10% polyacrylamide gel, while the GOT system necessitated the use of a 7% polyacrylamide gel. The analysis was performed at 40 MA for a duration of 3 hours at 4°C. The gels were stained using the protocols provided by Bendiab *et al.* in 1993.

2.4. Albumin and globulin analysis

The extraction protocol used in this study was based on the technique developed by Freitas *et al.* in 2004, with modifications made at the laboratory level. The resulting powder of each sample (10 mg) was defatted with n-hexane (0.35 mL) with stirring for 30 min, the hexane was decanted and air-dried after centrifugation of 15 min at 14 000 rpm. The albumin fraction was extracted from the defatted powder by stirring with 0.35 mL distilled water (pH 8) containing 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 30 min at 4°C. The albumin-containing solution was centrifuged at 14 000 rpm, 4°C for 20 min and the supernatant was conserved at 4°C as the albumin fraction. This extraction was repeated twice to eliminate as possible as the remaining albumin fraction. The total globulins were extracted by stirring the pellet with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8, containing 10% (w/v) NaCl, 10 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mM ethylene glycol bis (β-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) and 1 mM PMSF for 30 min at 4°C. The suspension was centrifuged at 14 000 rpm for 20 min at 4°C, the supernatant contained the globulin fraction.

Extracted albumin and globulin fractions were precipitated with 1 mL cold acetone (1:4 (v/v)) for 1 h at -20°C and centrifuged at 10 000 rpm for 15 min, then, acetone was decanted

and evaporated, and the pellet was suspended in 100 μ L of sample buffer. Nonreducing SDS-PAGE was carried out in 12,5% polyacrylamide resolving gel and 5% polyacrylamide stacking gel according to Singh et al. (1991) at 60 V over the night.

2.5. SSR analysis

The isolation of genomic DNA was performed using the Cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) protocol developed by Doyle and Doyle in 1990. The quality of the extracted DNA was tested via 0.8% agarose gel electrophoresis, and its concentration was measured using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). The samples were diluted to 50 ng/ μ l in preparation for PCR amplification. After screening five SSR primer pairs, two SSR primers were chosen for further use based on the quality of fragment amplification (**Table 2**).

Table 2: Sequences and link group of five microsatellite primers test Primer Linkage.

Primer	Linkage group	Motif	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
AFctt1*	4	(CTT) ₉ (CAA) ₃	CCCATCATCAACATTTTCA	TTGTGGATTGGAACGAGT
AFct11	7	(CT) ₁₂	GGACAGAGCAAAAGAACAAT	TTGTGTGGAAAAGAATAGGAA
AFct32*	3	(CT) ₁₄	TTTTTGTCCCACCTCATTAG	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC
AFca1	4	(CT) ₄ (CA) ₁₀	CGTATCAATATCGGGCAG	TGTTATCAGAGAGAGAAAGCG
AFca11	6	(CA) ₁₁	CTTGAGGGAACTATTGTTGAGT	AACGTTTCCCAAAACATACTT

*Primers used in this study

PCR amplification was carried out in a 20 μ l final volume containing 3 μ l of genomic DNA (50 ng/ μ l) as template, 2.4 μ l of dNTP mix containing 2.5 mM of each of the four nucleotides, 3 μ l of 10 x reaction buffer, 1.2 μ l of MgCl₂ (25 mM), 1.8 μ l of each SSR forward and reverse primer (10 μ M) and 0.3 μ l of Taq DNA polymerase Thermo Scientific (2.5 U). The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 45 s, annealing at 55°C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, with a final 72°C extension for 10 min. Amplification products (10 μ l per lane) were resolved on 8% non-denaturing polyacrylamide gel, using an acrylamide/bis-acrylamide ratio of 19:1 and a 0.5X TBE buffer. Electrophoresis was performed at 175 V constant voltages, for approximately 2 h 30 min at 4°C, and revealed with ethidium bromide for 5 min.

2.6. DATA analysis

Morphological characteristics were analyzed using the principal component analysis (PCA). Mean, standard deviation (s.d) and coefficient of variation (CV) of the morphological traits were computed. The correlation between morphological variability and bioclimate was

examined by another PCA including the most important ecological parameters (Alt., LAT, LON, Pm, Tm, and TM). Phenetic relationships among accessions were evaluated by UPGMA (Unweighted Pair- Group Method using Arithmetic Averages) cluster analysis based on Euclidean distances. All analyses based on morphological markers were performed using Statistical version 6.0 program.

For isozyme, protein and SSR analysis, electrophoretic profiles are compared according to the mobility of obtained bands. The various samples studied are compared in pairs and the genetic distances were computed using the Jaccard index. From the calculated genetic distances, a hierarchical classification in UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) was developed using the Xlstat 2014 software.

3. Results

3.1. Morphological markers

Morphometric characteristics analysis

The morphological characteristics studied are presented in **Table 3**, along with their mean, range, standard deviation (s,d), and coefficient of variation (CV %) values. Among these characteristics, the "Weight of 30 pods (WTP)" stands out with higher coefficients of variation, recording a value of 55.56%, this indicates a significant variability in pod weight, which ranged from 0.31g to 3.65g. Following closely, the "Ratio of weight of seed to weight of pods (RW)" and "Number of seeds per pod (SP)" also showed relatively high CV values of 50.66% and 43.04% respectively. On the other hand, the characteristics related to Seed size: "width (WS)" exhibit lower CV, measured at 10.12%.

A principal component analysis (PCA) was conducted on the twelve qualitative traits (**fig.2a**). Following the Kaiser criterion, the first three axes were selected, explaining 48.91%, 18.32%, and 10.27% of the total variation, respectively. These axes collectively captured 77.51% of the total variance. The component scores for each variable were projected onto the first two factors (Fact.1 and Fact.2) of the PCA. The distribution of the characteristics was primarily observed along Fact.2 and exhibited negative values on Fact.1, except for DCOT and RW, which displayed a positive relationship with the Fact.1. Furthermore, LGFT6, LRFT6, and SFT6 were found to be highly correlated with each other. Similarly, there were strong positive correlations observed among SP, WTP, LP, LS, WS, and WP. The highest positive contribution (0.92) was observed between WTP and LP, suggesting a strong association between these traits.

On the other hand, the lowest contribution value (-0.69) was recorded between RW and WTP, indicating a weaker correlation between these two traits. Interestingly, the WTS and DCOT traits showed a weak representation in the 1-2 plane of the PCA, but they exerted a significant influence on the construction of the third factor (Fact.3). It is worth noting that RW exhibited a negative correlation with SP, WTP, LP, LS, WS, and WP, while showing a positive correlation with DCOT.

Correlation between morphological characteristics and ecological parameters

A principal component analysis (PCA) was conducted to explore the relationship between morphological characteristics and bioclimatic parameters (**Fig.2b**), incorporating both morphometric traits and six ecological parameters (LON, LAT, ALT, Pm, TM, and Tm). The first four axes collectively explained 75.65% of the total variation, with respective contributions of 40.86%, 14.09%, 11.52%, and 9.18%. The component scores for each variable were projected onto the first two factors (Fact.1 and Fact.2) of the PCA to visualize the structure of these complex relationships. The distribution of the characters was predominantly observed along Fact.2, with LON, LAT, ALT, RW, TM, and DCOT positioned on the positive side of Fact.1, while the remaining characters were located on its negative side. In the PCA analysis, it was observed that LP, LS, WTP, WS, WP, Tm, and SP exhibited strong negative correlations with each other in relation to Fact.1. Similarly, SFT6, LGFT6, and LRFT6 demonstrated high negative correlations with each other in relation to Fact.1. In contrast, the variable TM exhibited a negative correlation with all the other characters in the dataset, showing an inverse relationship. Notably, LON and LAT were found to be perfectly correlated (100%), indicating a strong relationship between these variables. The lowest contribution in terms of correlation was observed between Tm and ALT, with a value of (-0.87). This indicates a weaker relationship between these two variables compared to the other correlations examined in the analysis.

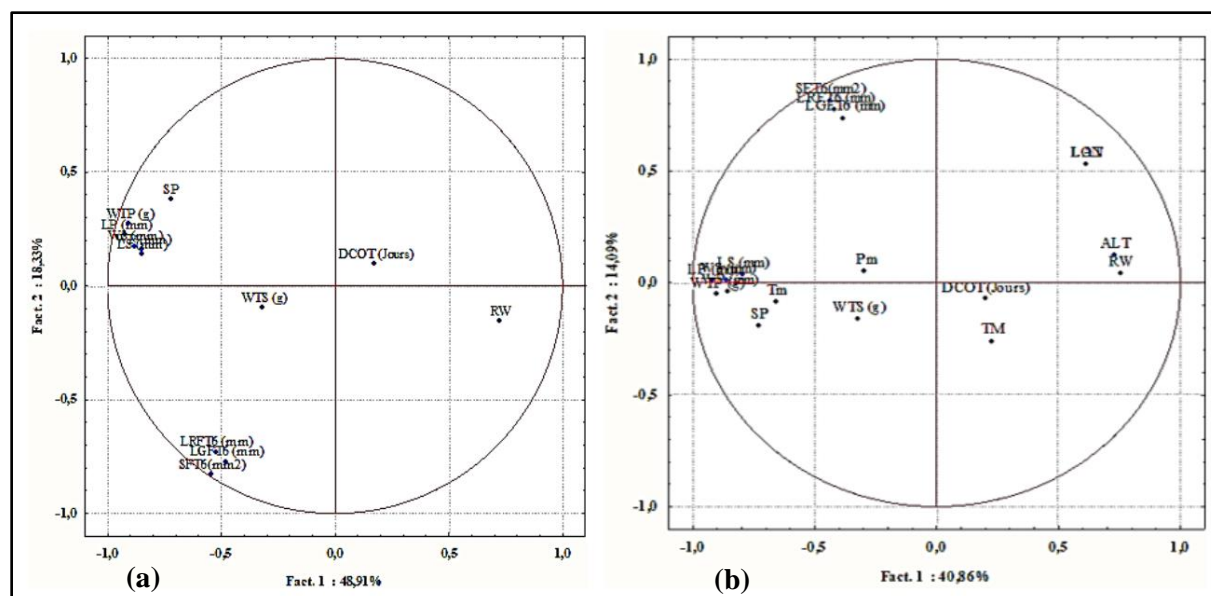


Fig. 2: Principal component analysis of twelve morphological characteristics for *M. polymorpha* (a) and their relationship with ecological parameters (b).

Table 3: Mean, standard deviation and coefficient of variation of the twelve traits analyzed on 40 accessions of *M. polymorpha* species.

Variable	Mean	Min	Max	s.d	CV (%)
LP (mm)	4.75	2.39	8.50	1.57	33.13
WP (mm)	9.38	5.98	12.86	1.86	19.90
WTP (g)	1.57	0.31	3.65	0.87	55.56
SP (score)	4.21	1.67	7.67	1.81	43.04
LS (mm)	3.14	2.34	4.07	0.35	11.20
WS (mm)	1.76	1.46	2.14	0.17	10.12
WTS (g)	3.81	1.87	6.88	1.33	35.06
RW (g/g)	3.00	0.64	9.81	1.51	50.66
DCOT (score)	1.30	1.00	3.00	0.51	39.72
LGFT6 (mm)	7.62	4.72	12.19	1.42	18.72
LRFT6 (mm)	2.95	1.89	4.46	0.57	19.46
SFT6 (mm ²)	22.96	10.48	53.76	0.40	36.61

Min: Minimum, Max: Maximum, s.d.: Standard deviation, CV: Coefficient of Variation, LP: Length of pod, WP: Width of pod, WTP: Weight of 30 pods, SP: Number of seeds per pod, LS: Length of seed, WS: Width of seed, WTS: Weight of thousand seeds, RW: Ratio weight of seeds/Weight of pods, DCOT: Emergence date of cotyledons, LGFT6: Length of the first leaf, LRFT6: Breadth of the first leaf, SFT6: Area of the first leaf.

Table 4: Correlation matrix between morphological characteristics and ecological parameters.

	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LGFT6	LRFT6	SFT6	ALT	LAT	LON	Pm	Tm	TM
LP	1.00	0.77	0.92	0.78	0.77	0.82	0.15	-0.66	-0.04	0.26	0.36	0.33	-0.61	-0.44	-0.44	0.13	0.55	-0.34
WP		1.00	0.78	0.66	0.69	0.72	0.27	-0.56	-0.09	0.34	0.24	0.33	-0.57	-0.48	-0.48	0.12	0.53	-0.13
WTP			1.00	0.70	0.77	0.83	0.16	-0.69	-0.17	0.24	0.25	0.27	-0.55	-0.47	-0.47	0.16	0.50	-0.32
SP				1.00	0.55	0.59	0.15	-0.52	0.05	0.05	0.18	0.12	-0.47	-0.40	-0.40	0.04	0.39	-0.13
LS					1.00	0.90	0.23	-0.50	-0.06	0.29	0.34	0.32	-0.35	-0.42	-0.42	0.04	0.31	-0.14
WS						1.00	0.25	-0.54	-0.08	0.31	0.30	0.31	-0.49	-0.44	-0.44	0.20	0.41	-0.25
WTS							1.00	-0.24	-0.19	0.18	0.15	0.17	-0.05	-0.46	-0.46	0.02	0.07	0.42
RW								1.00	0.38	-0.16	-0.29	-0.25	0.56	0.39	0.39	-0.22	-0.55	0.17
DCOT									1.00	-0.05	-0.12	-0.11	0.08	0.07	0.07	-0.31	-0.23	0.06
LGFT6										1.00	0.65	0.89	-0.13	-0.04	-0.04	0.09	0.11	-0.04
LRFT6											1.00	0.90	-0.18	0.02	0.02	0.16	0.14	-0.11
SFT6												1.00	-0.20	-0.02	-0.02	0.14	0.16	-0.05
ALT													1.00	0.45	0.45	-0.45	-0.87	0.29
LAT														1.00	1.00	-0.16	-0.32	-0.24
LON															1.00	-0.16	-0.32	-0.24
Pm																1.00	0.41	-0.18
Tm																	1.00	-0.31
TM																		1.00

Cluster analysis based on morphological characteristics

The dendrogram constructed using the previous distance matrix revealed the division of the 40 accessions into two distinct clusters at a distance of 94.23. The distance between these two clusters is significant, indicating marked genetic differentiation, where the first cluster consisted of only four accessions (*Mp* 1, *Mp* 4, *Mp* 5, and *Mp* 6) at $D=17.91$. The second cluster is larger, encompassed the remaining accessions at $D=14.13$ with a dominant subcluster consisting of 35 accessions and another with a single accession (*Mp* 19) (**fig.3**).

A genetic distance matrix was constructed using the Euclidean distances values based on twelve quantitative traits that were previously identified (**ANNEXE 1**). The analysis of this matrix provided insights into the genetic relationships among the studied accessions, with distances ranging from 1 to 104. The distance matrix clearly highlights that the four accessions belonging to the polymorpha variety (*Mp* 1, *Mp* 4, *Mp* 5, *Mp* 6) exhibit significantly higher distance values compared to all other accessions, ranging from 94 to 104. In contrast, the remaining accessions displayed lower distance values, ranging from 1 to 44, indicating a relatively lower level of genetic divergence among them. Of particular interest is the observation that the lowest distance ($D = 1$) was observed between accessions *Mp* 4 and *Mp* 1, originating from Constantine and Ain Defla, respectively. This suggests a high level of

similarity or close affinity between these two accessions, despite their geographical separation. Furthermore, it is worth noting that the highest distance value ($D = 104$) was observed between *Mp* 5 and *Mpv* 16, both of which were collected from Ain Defla.

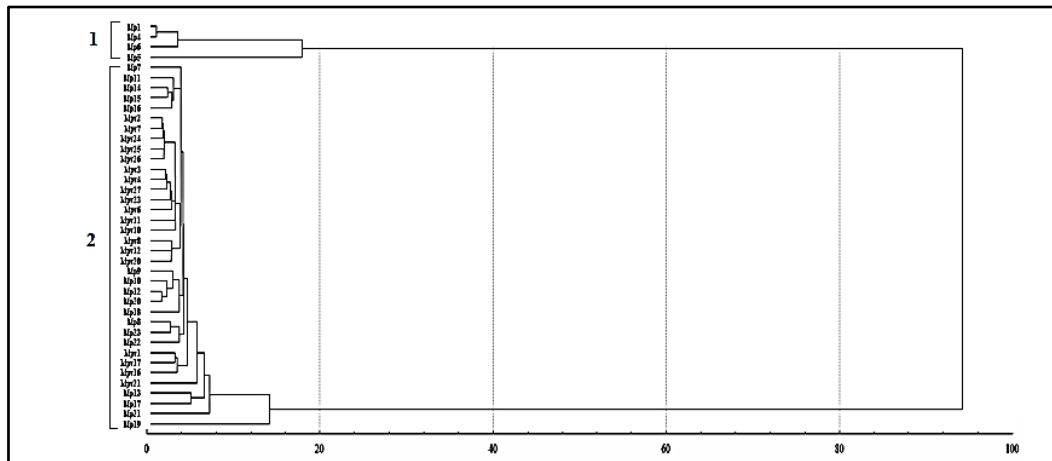


Fig. 3: UPGMA dendrogram based on morphological characteristics of 40 accessions of *M. polymorpha*.

3.2. Isozyme markers

The zymograms and corresponding diagrammatic representations for the two enzymatic systems EST and GOT investigated in this study are represented in (Fig.4; Fig.5). six isozymes were identified, consisting of 19 alleles and 27 phenotypes (ANNEXE3). The GOT enzyme system distinguishes eight bands with 13 phenotypes distributed into two loci (GOT1 and GOT2) equally, each locus containing four bands. GT1 and GT4 bands were observed only in *Mp* 4 and *Mp* 9 accessions, respectively. Furthermore, the GT5 band was found in *polymorpha* variety with 0,13 frequency. For the EST enzymatic system, the analysis revealed the presence of 11 bands attributed to 4 isozymes EST1, EST2, EST3 and EST4, giving rise to 14 phenotypes (ANNEXE3). The E4 allozyme is identified *vulgaris* variety only with 0.25 frequency, while E5 and E11 were present with frequency value 0.30 and 0.16 in *polymorpha* variety, respectively. The E10 allozyme was notably present in all of the accessions of *M. polymorpha* species that were examined. Similarly, the E9 was found in all accessions studied, except for one (*Mpv* 15).

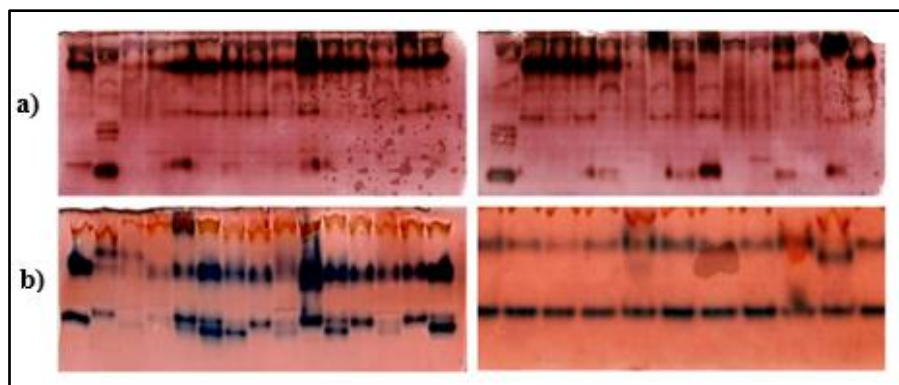


Fig. 4: Zymograms of the enzymatic system EST and GOT for the 28 accessions of the variety *polymorpha*: a) for EST, b) for GOT.

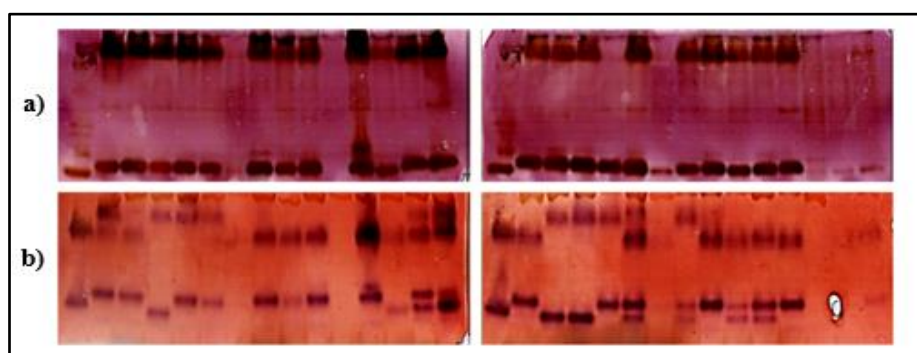


Fig. 5: Zymograms of the enzymatic system EST and GOT for the 28 accessions of the variety *vulgaris*: a) for EST, b) for GOT.

According to the Jaccard index, a genetic similarity matrix was computed based on two enzymatic systems (**ANNEXE 5**). The results indicate a significant similarity between accessions belonging to the same variety, with a coefficient ranging from 0.50 to 0.93. However, between the two varieties, the majority of accessions exhibit a similarity ratio with a coefficient ranging from 0.5 to 0.85. Interestingly, a 100% similarity was observed between Accessions (*Mp26/Mp17*) collected from Annaba/Tipaza, which are two distinct geographical regions but share similar climates, and between (*Mpv 19/Mpv 13*) collected from Medea/Mostaganem, which are two different regions close geographically and ecologically.

Based on the similarity matrix calculated from the wise pooled zymogram, the UPGMA dendrogram (**Fig.6**), revealed the presence of 8 significant clusters at a similarity value of $J=0.58$. The first cluster ($J = 0.60$) was the largest and comprising 28 accessions which were further divided into two main sub-clusters. The first subgroup contained the majority of accessions (26) with a similarity level of ($J = 0.63$), mainly from the *polymorpha* variety, but

also a few accessions from the *vulgaris* variety (*Mpv* 12, *Mpv* 13, *Mpv* 14, and *Mpv* 19) were collected from areas that were similar to those of four accessions from the other variety, while the second sub-cluster comprised only two accessions, *Mp* 23 and *Mp* 25, with a similarity level of ($J = 0.77$).

In terms of the number of accessions, the third cluster came after at $J = 0.59$ with 17 accessions from *vulgaris* variety from different regions subdivided also into two sub-clusters contained 12 and 5 accession with a similarity level of 0.65 and 0.71 respectively. Clusters 2 and 5 were each composed of three accessions, while cluster 8 contained only two accessions, one from each variety, and located in the same region. Finally, *Mpv* 26, *Mp* 20, and *Mpv* 16 were each placed in separate clusters, specifically clusters 4, 6, and 7, and were collected from Jijel, Tissemsilt and Ain Defla, respectively.

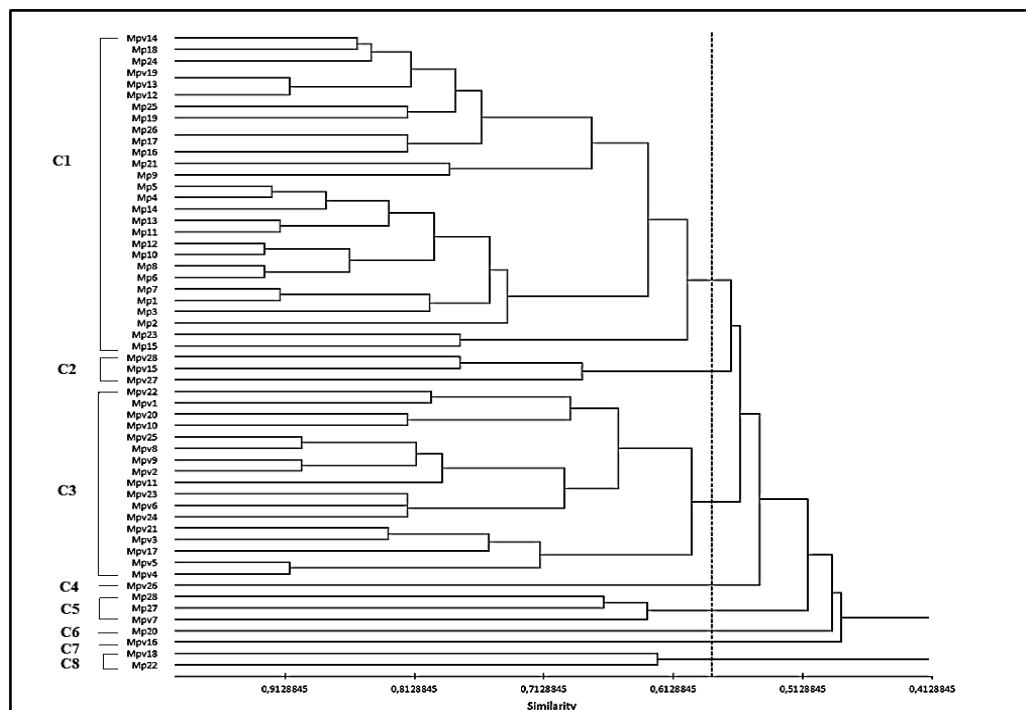


Fig. 6: Hierarchical classification in UPGMA of the 56 accessions of *M. polymorpha* based on enzyme polymorphism (GOT-EST).

3.3. Protein markers

Albumin electrophoresis

The analysis of the albumin fraction revealed the presence of 48 bands in all analyzed accessions, with a molecular weight ranging from 7,5 to 121 kDa for *polymorpha* variety and from 7.5 to 115 kDa for *vulgaris* variety (**Fig.7**). The three bands A32, A36, and A42 were

identified in all accessions at 100%, while A26 and A48 were present in all accessions except *Mpv* 22 and *Mp* 10, respectively. In the accessions of *polymorpha* variety, the bands A38 and A45 were present in all of them with 0.5 frequency, while A1, A6, A11, A13, A14, A15, A17, A18, A19, A29, A31, and A35 were found only in some of the accessions. For *vulgaris* accessions, A33 and A38 were present in all accessions, while A10, A30, A34, A41, and A44 were found in some of them. Notably, the band A3 was obtained in two accessions of *vulgaris* variety (*Mpv* 8 and 14) and 17 of *polymorpha* with 0.34 frequency, while A5 was present in one accession (*Mp* 23) and six of *vulgaris* variety with value frequency of 0.13.

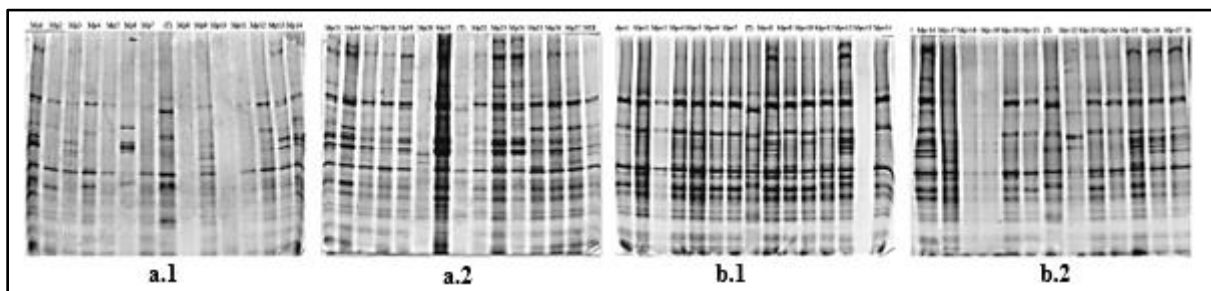


Fig. 7: Albumin electrophoretic profiles obtained by SDS-PAGE in 58 accessions of *M. polymorpha* and *M. vulgaris*: a.1) *Mp* 1 to *Mp* 14, a.2) *Mp* 15 to *Mp* 28, b.1) *Mpv* 1 to *Mpv* 14, b.2) *Mpv* 15 to *Mpv* 28, (T) = Control.

Using the albumin data, a genetic similarity matrix was constructed based on the Jaccard index (ANNEXE 7). The results showed that the similarity coefficient of accessions between the two varieties was relatively low, ranging from 0.2 to 0.4. This indicates that there are significant genetic differences between the two varieties. Besides, the similarity value between the accessions of the same variety is higher, ranging from 0.5 to 0.96 except for one accession with a low similarity rate ($j=0.29$) between *Mp* 23 and *Mp* 8 that are collected from Medea and Algiers which are close geographically. Upon further analysis of the accessions of the *vulgaris* variety, a similarity of 100% was observed between seven accessions (*Mpv* 6/*Mpv* 4, *Mpv* 7/*Mpv* 4, *Mpv* 7/*Mpv* 6, *Mpv* 10/*Mpv* 1, *Mpv* 13/*Mpv* 3, *Mpv* 19/*Mpv* 18 and *Mpv* 24/*Mpv* 23) taken from different regions.

The analysis of the genetic similarity matrix based on the Jaccard index for albumin allowed the construction of a dendrogram revealing the presence of three major clusters with a similarity coefficient of 0.44. The third cluster was found to be the largest, which contained all the accessions of *vulgaris* variety and was further divided into two sub-clusters at a distance level of 0.63 and 0.77, comprising 15 and 13 accessions, respectively. The other two distinct clusters,

with similarity rates of 0.60 and 0.62, comprised 14 accessions each of polymorpha variety (Fig.8).

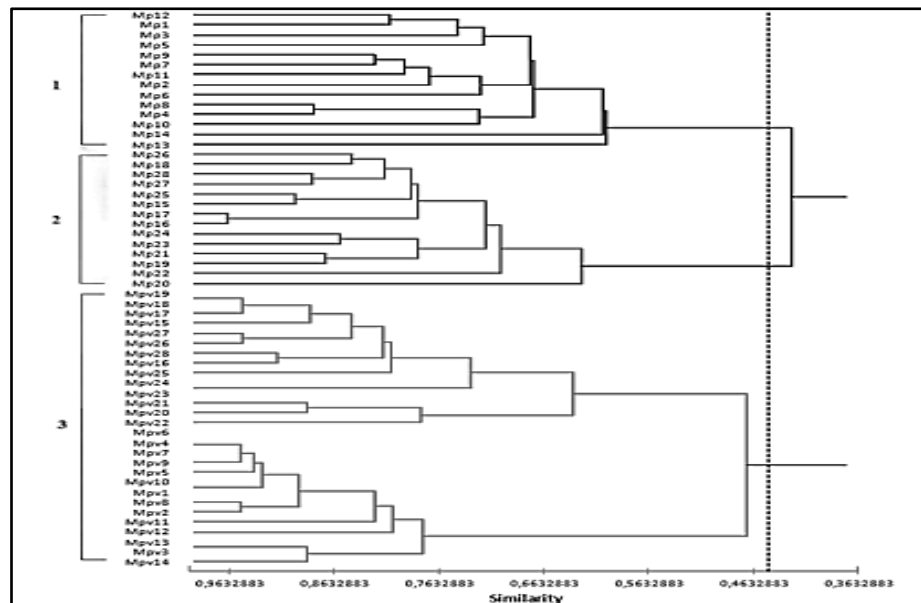


Fig. 8: Dendrogram based on UPGMA clustering of albumin data showing relatedness among the studied accessions of *M. polymorpha* species.

Globulin electrophoresis

The electrophoresis examination of globulin bands detected a total of 41 bands in all analyzed accessions, with a molecular weight ranging from 8 to 97 kDa for *polymorpha* variety and from 8 to 101 kDa for *vulgaris* variety (Fig.9). Out of these, only G38 and G39 were detected in all the 56 accessions. In *vulgaris* variety accessions, certain bands were identified in some accessions, including (G1, G3, G6, G8, G18, G20, G24, G27, G28, G32, G33, and G37), while G29 and G40 were present in all accessions both of them have 0.2 frequency. Notably, G5 was exclusively in (*Mpv* 14) and G19 was only observed detected in (*Mpv* 5), which they have a frequency value 0.1.

Similarly, for *polymorpha* variety accessions, (G7, G13, G14, G17, G26, G35, and G41) were present in some accessions, while G25 was found in all accessions. Additionally, G21, G23, and G34 were each observed in a single accession; (*Mp* 17, *Mp* 16, and *Mp* 4), respectively. Notably, G9 and G11 were only present in two accessions of *polymorpha*, specifically in (*Mp* 15 and *Mp* 18) and (*Mp* 16 and *Mp* 18), respectively, having the same frequency 0.3. An interesting observation, G12 was found in one accession of *polymorpha* (*Mp*

20) and in 21 accessions of *vulgaris*, while G30 was identified in one *vulgaris* variety accession (*Mpv* 5) and in all *polymorpha* variety accessions.

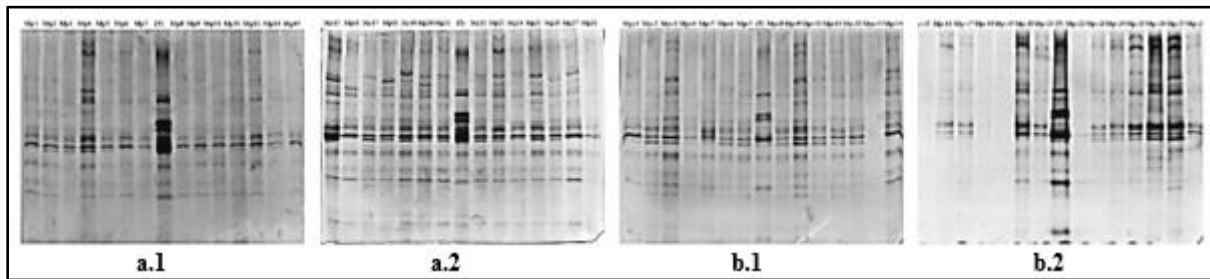


Fig. 9: Globulin electrophoretic profiles obtained by SDS-PAGE in 58 accessions of the varieties *M. polymorpha* and *M. vulgaris*: a.1) *Mp* 1 to *Mp* 14, a.2) *Mp* 15 to *Mp* 28, b.1) *Mpv* 1 to *Mpv* 14, b.2) *Mpv* 15 to *Mpv* 28, (T)=Control

The Jaccard similarity coefficient was used based on the globulin data records to assess the variations among the 56 accessions of *M. polymorpha* (ANNEXE 9). The results showed high similarity among accessions of the same variety, with coefficients ranging from 0.5 to 0.92, while some accessions showed low similarity, with coefficients ranging from 0.28 to 0.3. Moreover, a low Jaccard coefficient was observed between the two varieties, ranging from 0.09 to 0.31. Total similarity was also observed between the following pairs of accessions: (*Mp* 3/*Mp* 2), (*Mpv*12/*Mpv* 11), (*Mpv* 19/ *Mpv* 22), (*Mpv* 18/*Mpv* 22), and (*Mpv* 18/*Mpv* 19), despite being collected from different regions. Conversely, three pairs of accessions displayed extremely low similarity ($J = 0.08$); (*Mpv* 20/*Mp* 6) from Tissemsilt/ Ain Defla, (*Mpv*26/*Mp* 8) from skikda/ Ain Defla, and (*Mpv* 27/*Mp* 6) fom Jijel/ Alger.

According to the UPGMA dendrogram, three clusters were observed at $J = 0.43$. The accessions of *polymorpha* variety were divided into two clusters, each containing 14 accessions, with similarity coefficients of $J = 0.51$ and $J = 0.64$, respectively. On the other hand, 28 accessions of the *vulgaris* variety grouped into a single cluster at $J = 0.47$, which was further divided into two sub-clusters. Each sub-cluster contained 14 accessions with distances of 0.50 and 0.61 (Fig.10).

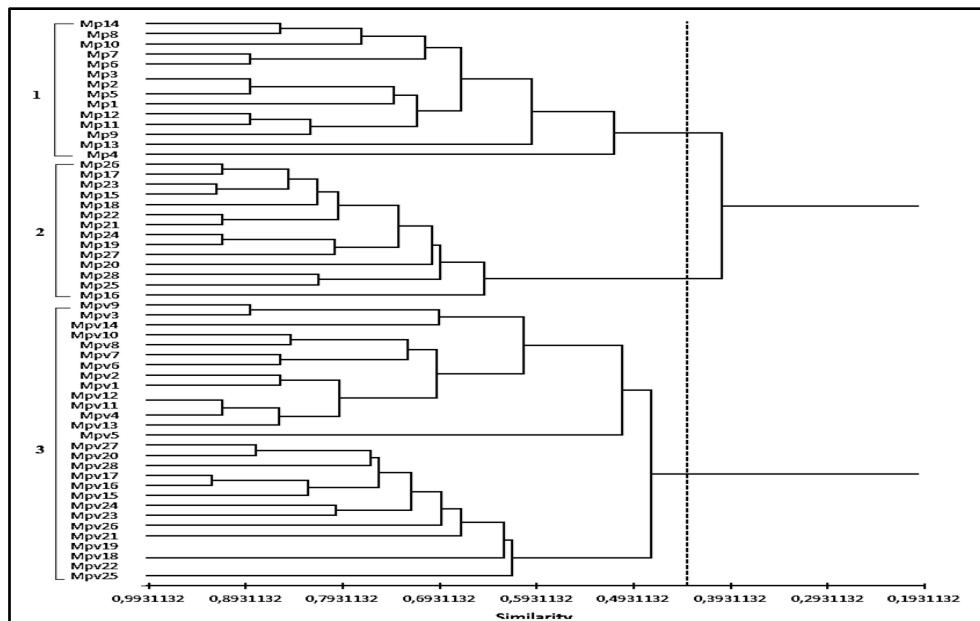


Fig. 10: UPGMA hierarchical classification of the 58 accessions of *M. polymorpha* based on globulin polymorphism.

3.4. SSR markers

Only 48 out of 56 accessions were subjected to SSR measurements. Out of the five chosen SSR markers for assessing polymorphism, three of them failed to produce any fragments. On the other hand, the remaining two markers, namely Afct32 and Afctt1, yielded a combined total of 27 fragments. The AFct32 marker was found to generate 11 fragments (25-132 Pb) (**Fig.11**). AF11 was detected in all accessions. While AF1, AF5, and AF7 were present in some *polymorpha* accessions with frequency 0.1, 0.3 and 0.16, respectively. The fragment AF6 was exclusively identified in some *vulgaris* accessions with 0.2 frequency. The bands AF4 and AF9 were specific to one accession each (*Mp* 11 and *Mp* 19) with the same frequency 0.01. Furthermore, AF2 was observed in two accessions of both *polymorpha* and *vulgaris*, whereas AF8 was present in 2 *vulgaris* and 23 *polymorpha* accessions. As for the Afctt1 marker, it generated a total of 16 fragments (15-207 Pb) (**Fig.12**). The af12 band was detected in 48 accessions, and the af15 band was identified in 47 accessions of *Mpv* 20 with frequency value 0.8. Fragments such as af2, af4, af6, and af16 were detected in some *polymorpha* accessions, while af11 was present in some *vulgaris* accessions. Additionally, the af7 band was specific to *Mpv* 8 and *Mpv* 11 with 0.03 frequency.

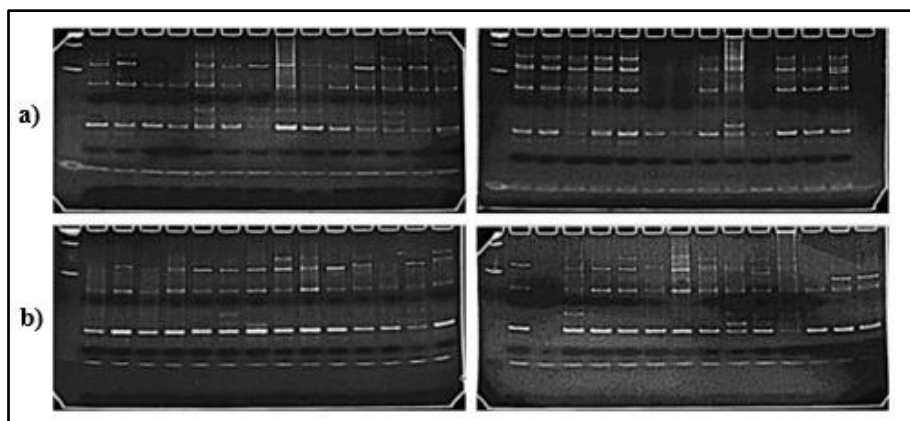


Fig. 11: Electrophoretic profiles of *M. polymorpha* SSR bands revealed by AFctt1 primer: a) var. *polymorpha*, b) var. *vulgaris*.

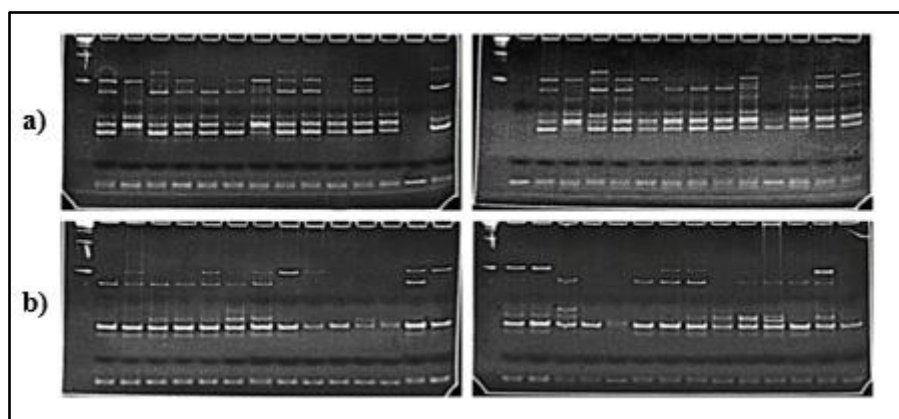


Fig. 12: Electrophoretic profiles of *M. polymorpha* SSR bands revealed by AFctt32 primer: a) var. *polymorpha*, b) var. *vulgaris*.

Table 5: Total number of amplified bands and polymorphism in 48 *M. polymorpha* accessions for each SSR marker.

Loci	Total no. of amplified bands	Average no. of bands	Approx. band size range (pb)	No. of polymorphic bands	Amount of Polymorphism (%)
AFctt1	16	4.85 (2-7)	15-207	15	93,8
AFct32	11	4,12 (1-7)	25-132	10	90,9

Jaccard's similarity coefficient was used to determine the similarity between the accessions (ANNEXE 11). Results indicated that accessions belonging to the same polymorpha variety had high similarity, with coefficients ranging from 0.5 to 0.92. Meanwhile, similarity rates between vulgaris varieties ranged from 0.50 to 0.85. Most accessions in both varieties had a

low Jaccard similarity, ranging from 0.20 to 0.46. Interestingly, complete similarity was observed between *Mpv* 9 and *Mpv* 16 that were taken from Bourdj bouarriridj and Ain Defla, and are geographically distant.

The analysis of Jaccard similarity coefficient has resulted in a tripartite dendrogram with a similarity threshold of $j=0.40$. The large cluster includes 25 accessions of the *polymorpha* variety and 4 accessions of the *vulgaris* variety (*Mpv* 21, *Mpv* 23, *Mpv* 24, *Mpv* 28), which are further divided into two sub-groups at a threshold of $j=0.48$. The first sub-group consists of 11 accessions of the *polymorpha* variety with the 4 *vulgaris* accessions, while the second sub-group includes the remaining 14 accessions of the *polymorpha* variety. The second cluster has a Jaccard coefficient of 0.42 and comprises 18 accessions of the *vulgaris* variety only. This cluster is also divided into two sub-groups, with the first containing 17 accessions and the second containing only 2 accessions (*Mpv* 12 and *Mpv* 10). Finally, *Mpv* 20 forms the last cluster at $j=1$.

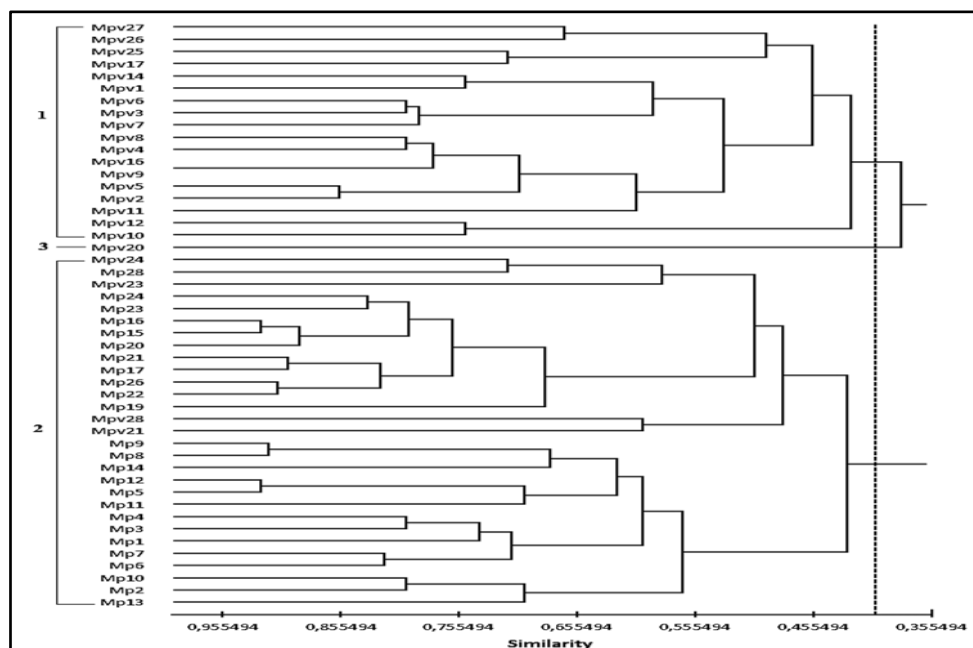


Fig. 13: Hierarchical UPGMA classification of 48 accessions of *M. polymorpha* based on SSR polymorphism.

4. Discussion

Employing an integrated approach that combines morphological, enzymatic, protein, and molecular markers aimed to assess the genetic diversity of 56 accessions of *M. polymorpha*

species from two distinct varieties (*var. polymorpha* and *var. vulgaris*), obtained from diverse eco-geographical conditions in Northern Algeria.

The morphological traits, including size, shape, color, and organ structure, provide valuable insights into the genetic variations within a population (Tripathy, et al., 2015), allowing for the exploration of genetic diversity traits. In fact, a substantial proportion of species belonging to the genus *Medicago* can be identified and characterized solely based on the appearance of their pod morphology (Lesins, et al.). Moreover, phenological traits, as emphasized by (Badri, et al., 2016), are useful tools for detecting variation within and among populations of *M. polymorpha*.

The morphological analysis of the studied traits revealed a high variability, particularly in the WTP, RW, and SP traits, with high coefficients of variation. We can infer that there is significant diversity and range within these traits among the studied accessions. Interestingly, these observations are consistent with a similar study conducted in Iran by Emami et al. (2021).

Furthermore, the principal component analysis (PCA) revealed significant correlations between the morphological traits, demonstrating close genetic associations (**Fig.2a**). The traits SP, WTP, LP, LS, WS, and WP showed strong positive correlations, suggesting a close genetic association among them. On the other hand, the RW trait was negatively correlated with the other characteristics and positively correlated with DCOT, highlighting inverse relationships between these traits. These results highlight significant genetic diversity among the studied accessions. Additionally, a study conducted by Heyn in 1963 demonstrated the existence of three distinct varieties of this species, based on characteristics of the pods. These pod characteristics showed a close relationship with seed traits, suggesting that pod properties can provide useful information about seed characteristics.

A significant correlation was observed between DCOT and certain characteristics of the first leaf, including LGFT6, LRFT6, and SFT6. These results suggest that the emergence date of cotyledons may have an influence on the development and morphology of the first leaves in *M. polymorpha*. Additionally, it was found that these characteristics are closely correlated with each other, an observation also reported by Bonnin et al. (1996) when analyzing the population structure of *M. truncatula* using quantitative genetic markers.

In the second Principal Component Analysis (PCA) examining the correlation between morphological characteristics and ecological parameters (**Fig.2b**), significant findings emerged.

A strong positive correlation was observed among LP, LS, WTP, WS, WP, Tm, and SP, while SFT, LGFT, and LRFT showed another notable positive correlation. Conversely, an inverse relationship was observed between (TM) and the remaining studied characteristics. Moreover, the longitudinal (LON) and latitudinal (LAT) coordinates exhibited a perfect correlation, indicating a complete alignment between these spatial measurements. This suggests that the geographical distribution of *M. polymorpha* is closely linked to these morphological characteristics. Findings by Badri et al. (2016) indicate that the most significant correlations were found between altitude and the measured traits, followed by relative humidity and temperature. This suggests that the degree of trait variation differs based on the region from which the seeds were collected. The adaptability of *M. polymorpha* to challenging soils and climates has been previously documented by Hannachi et al. (1998). This adaptability is believed to contribute to the observed morphological diversity, which is likely a result of the species' ability to adapt to the eco-geographic conditions of different areas. Such adaptation may be facilitated by the presence of co-adapted gene complexes, which are multi-locus genotypes favored by natural selection, as proposed by Badri et al. (2016). Therefore, ensuring sufficient genetic diversity is crucial for plants to withstand changing climate conditions.

Biochemical markers, such as isozymes, have been employed to characterize the genetic diversity of various plant species, including *M. polymorpha*, which is the focal point of the present study. Despite its importance, little is known about the genetic control of isozymes in this species, and comprehensive studies in this regard are still lacking. Nonetheless, a comparable investigation was conducted in Tunisia by Hannachi et al. (1998) and in Italy by Bullitta et al. (1994).

After analyzing the genetic variability of the GOT and EST enzymatic systems, a significant level of diversity was discovered among the studied accessions of *M. polymorpha*. The analysis of the GOT isozyme system demonstrated the existence of two loci (GOT1 and GOT2), containing eight alleles and 13 different phenotypes. Meanwhile, the EST isozymes exhibited remarkable diversity, with the presence of four isozymes, 11 bands, and 14 distinct phenotypes. Taken together, these findings are consistent with a previous study conducted by Weeden and Wendel (1990), which also showed that the EST enzyme system is characterized by high polymorphism, making it an indispensable tool for investigating genetic variation. This could be due to the high levels of autogamy in *M. polymorpha* as it shows previously by Bullitta et al. (1996).

The genetic diversity of seed proteins has been explored in natural populations of annual *Medicago* species (Moulai et Lameche, 2017). The SDS-PAGE method has shown promising potential for assessing the genetic diversity of plant species (Živković, et al., 2012), through the analysis of variations in seed storage proteins (Moulai et Lameche, 2017). However, the specific application of this method to *M. polymorpha* is still limited in scope.

By focusing on the albumin and globulin fractions, our study elucidates substantial intraspecific differentiation within the surveyed accessions of *M. polymorpha*. Analysis of the albumin fraction identified 48 bands, ranging in frequency from 0.05 to 1, while the globulin fraction showcased 41 bands with frequencies spanning from 0.01 to 1. Notably, specific bands were observed at a frequency of 0.5, signifying their exclusive presence in a single variety. These results emphasize the genetic diversity and distinct protein variations among the examined varieties. The unexpected presence of intraspecific polymorphism in both protein fractions challenges the conventional understanding of self-fertilizing annual *Medicago* species and it is known that self-fertilization decreases gene flow and consequently increases local differentiation between populations (Charlesworth, 2003). Nevertheless, the significant autogamy characteristic of this species may underlie the striking pattern of genetic differentiation observed among populations.

In order to evaluate the genetic diversity of *M. polymorpha*, a variety of molecular markers have been developed, including SSR (Simple Sequence Repeat) (Ren, et al, 2023), also known as microsatellites, are commonly used tools for genetic mapping and genotype identification in plant and animal species (Beckmann et Weber, 1992). These markers, which are co-dominant and multi-allelic, are frequently present in plant genomes (Mengoni , et al, 2000). Preliminary studies conducted by Diwan et al. (1997) demonstrated the utility of SSR markers in genetic analysis of the *Medicago* genus, making it a promising approach for assessing genetic diversity and genetic relationships within this group of plants.

Out of the originally planned 56 accessions, our SSR analysis included a total of 48 accessions due to limitations in seed sample availability. The SSR markers (Afct32 and Afctt11) revealed significant results in terms of genetic polymorphism detection. The use of these markers identified a total of 27 fragments, with greater polymorphism observed for the Afct32 marker (11 fragments) compared to the Afctt11 marker (16 fragments), with some fragments being specific to certain accessions only. These results support the presence of marked and significant intraspecific variation among the studied accessions, consistent with previous studies (Bullitta,

et *al.*, 1994; Paredes , et *al.*, 2002), that suggest high selfing rates in this species contribute to genetic differentiation among populations. Our previous work within our research group has also shown similar results when analyzing the same sample collection using enzyme markers (Medoukali, et *al.*, 2015), assessing seed storage protein variation, and examining microsatellite (SSR) diversity in this species (Medoukali, 2016). These consistent findings reinforce the idea that the observed genetic diversity within *M. polymorpha* is an intrinsic characteristic of this species.

During the construction of the dendrogram, two matrices were used: the genetic distance matrix based on Euclidean distances for morphological traits, and the genetic similarity matrix derived from the Jaccard index for isozymes, albumin, globulin and molecular markers. These two matrices were employed to graphically represent the genetic relationships and analyze the population structure of *M. polymorpha*. Across all dendrograms constructed, a significant genetic diversity was observed among the studied accessions, but the classification patterns differed among the analyzed markers. The isozyme analysis resulted in the identification of 8 distinct classes, while albumin, globulin and SSR markers analysis grouped the accessions into three classes. Furthermore, the analysis based on morphological traits resulted in the formation of only two groups. Notably, the clustering of the accessions did not solely depend on their eco-geographic location, but also played a crucial role in grouping them based on their classification as either var. *polymorpha* or var. *vulgaris*. This finding highlights the importance of both eco-geographic factors and genetic distinctions in determining the clustering patterns of the studied accessions. The electrophoretic method employed in this study confirmed previous findings, demonstrating its utility, cost-effectiveness, and reliability, regardless of environmental variations (Moulai et Lameche, 2017). Overall, genetic variation in seed protein profiles has an important role in identification of varieties (Tripathy , et *al.*, 2015).

In conclusion, our study reveals the significant genetic diversity observed in Algerian *M. polymorpha* at the morphological, biochemical, and molecular levels. These findings provide valuable insights for future research and offer opportunities for optimizing its beneficial utilization in diverse fields, including agriculture, medicine, and environmental studies.

5. References

1. Abusaief, H. M.-A., & Boasoul, S. H. (2021). A taxonomic study of twelve wild forage species of Fabaceae. *Heliyon*, 7(2). doi:10.1016/j.heliyon.2021.e06077

2. Badri, M., Ben Cheikh, N., Mahjoub, A., & Abdelly, C. (2016). Morpho-phenological diversity among natural populations of *Medicago polymorpha* of different Tunisian ecological areas. *African Journal of Biotechnology*, *15*(25), 1330-1338. doi:10.5897/AJB2015.14950
3. Beckmann, J., & Weber, J. (1992). Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*, *12*, 627–631.
4. Bendiab, K., Baaziz, M., Brakez, Z., & Sedra, M. (1993). Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny. *Euphytica*, *65*, pp. 23-32.
5. Bonnin I, Prosperi JM, & Olivieri I. (1996). Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): a comparative analysis of population structure. *Genetics*, *143*, 1795-1805.
6. 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.
7. Charlesworth, D. (2003). Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, *358*, 1051-1570.
8. Diwan, N., Bhagwat, A., Bauchan, G., & Cregan, P. (1997). Simple sequence repeat DNA markers in alfalfa and perennial and annual *Medicago* species. *Genome*, *40*, pp. 887-895.
9. Doyle, J.J., Doyle, J.L. . (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, *12*(1), 13-15.
10. Emami, T. S.-S., & Assadi, M. (2021). Genetic and morphological diversity in Iranian *Medicago polymorpha* populations by using morphological and ITS analysis. *Rostaniha*, *22*(2), 194-208. doi:10.22092/BOTANY.2021.355306.1258
11. Freitas, R. L., A.R., Teixeira, & Ferreira, R. (2004). Characterization of the proteins from *Vigna unguiculata* seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *52*, 1682-1687.

12. Grygier, A., Chakradhari, S., Ratusz, K., Rudzińska, M., Patel, K. S., Lazdiņa, D., & Górnas, P. (2022). Seven underutilized species of the Fabaceae family with high potential for industrial application as alternative sources of oil and lipophilic bioactive compounds. *Industrial Crops & Products*, 186, 115251. doi:10.1016/j.indcrop.2022.115251
13. Hannachi, A. S., Boussaid, M., & Marrakchi, M. (1998). Genetic variability organisation and gene flow in natural populations of *Medicago polymorpha* L. prospected in Tunisia. *Genet Sel Evol*, 30(Suppl 1), pp. S121-S135. doi:10.1186/1297-9686-30-S1-S121
14. Heyn, C. (1963). *The Annual Species of Medicago*. Magnes Press, Jerusalem.
15. Issolah, R., & Abdelguerfi, A. (1999). Variability within 31 spontaneous populations of *Trifolium scabrum* L., nature of relations with factors of the site of origin. In: *Etienne M (Ed)*.
16. Lesins, K., & Lesins, A. (1979). *Genus Medicago (Leguminosae) : a taxogenetic study* (Vol. 50). Plant.
17. Lesins, K; Gillies, CB;. (1972). Taxonomy and cytogenetics of *Medicago*. In *Alfalfa science and technology*, 53-86.
18. Medoukali, I. (2016). Les genres *Medicago* L. et *Trifolium* L. en Algérie : Diversité morphologique, biochimique et moléculaire. *Thèse de Doctorat : Biochimie et Biotechnologies*. Université Frères Mentouri Constantine.
19. Medoukali, I., Bellil, I., & Khelifi, D. (2015). Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Medicago* L. Prospected in Northern Algeria. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 43(1), 86-95.
20. Mengoni, A., Gori, A., & Bazzicalupo, M. (2000). Use of RAPD and microsatellite "SSR" variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Breeding*, 11, pp. 311-317.
21. Moulai, D., & Lameche, F. (2017). Comparison of genetic diversity among *Medicago ciliaris* populations prospected from highly salted region (Oran Great Sebkh) using morphological pod descriptors of IBPGR and SDS-PAGE markers. *International Journal of Biosciences*, 11(6), 27-38. doi:10.12692/ijb/11.6.27-5

22. Paredes , M., Becerra , V., Rojo , C., Del Pozo , A., Ovalle , C., & Aronson , J. (2002). Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. RAPDs studies show little genetic divergence. *Euphytica*, 123, pp. 431-439.
23. Ren, H., Wei, Z., Zhou, B., Chen, X., Gao, Q., & Zhang, Z. (2023). Molecular marker development and genetic diversity exploration in *Medicago polymorpha*. *PeerJ*(11), e14698. doi:10.7717/peerj.14698
24. Sanders, I., Sukharnikov, L., Najjar, F. Z., & Roe, B. A. (2010). *Medicago*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-14387-8_10
25. Sharma, A., Batish, D. R., Negi, K., & Singh, H. P. (2017). PHYTOCHEMICAL SCREENING AND ASSESSMENT OF ANTIOXIDANT POTENTIAL OF LEAF EXTRACTS OF *Medicago polymorpha* AND *Oxalis corniculata*. *Journal of Biology and Nature*, 8(3), 99-105.
26. Singh, N. K., Shepherd, K. W., & Cornish, G. B. (1991). A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal Science*, 14, 203-208.
27. Tripathy, S., Ranjan, R., Kar, J., Baisakh , B., Nayak , P., Swain , D., & Dash , S. (2015). Seed storage protein profiling: A method to reveal genetic variation in local land races and wild forms of mungbean. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 5, 6-14.
28. Weeden, N. F., & Wendel, J. F. (1990). Genetics of plant isozymes In: Soltis DE, Soltis PE (Eds). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland pp 46-72.
29. Woods, M., & Orcutt, J. (2017). The genus *Medicago* (Fabaceae) in Alabama. *Phytoneuron*, 2017(52), pp. 1-17.
30. Živković, B., Radović, J., Sokolović, D., Šiler, B., Banjanac, T., & Štrbanović, 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, pp. 285-291.

Synthèse
et
Conclusion générale

Synthèse et Conclusion générale

Ce travail vise à examiner la diversité génétique au sein des populations naturelles de deux variétés de l'espèce *Medicago polymorpha* (var. *Polymorpha* et var. *vulgaris*) par des approches intégrant des caractéristiques morphologiques, ainsi que des marqueurs enzymatiques, protéiques et moléculaires. Nous nous intéressons à analyser les caractéristiques des populations, leur divergence génétique, les relations entre les accessions, ainsi que la corrélation entre les divers marqueurs employés.

La population analysée se compose de 56 accessions de l'espèce *M. polymorpha* réparties de manière équilibrée avec 28 accessions pour chaque variété *vulgaris* et *polymorpha*. Ces accessions ont été récoltées sur 41 sites représentant des diverses conditions éco-géographiques dans le nord de l'Algérie.

Dans le cadre de l'étude morphologique, une analyse des douze caractères quantitatifs liés aux graines, aux gousses et aux cotylédons, décrits par Issolah et Abdelguerfi (1999), a été réalisée. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un comparateur à cadran avec une précision de 0,01 mm. L'échantillon comprenait un total de 40 accessions de l'espèce *M. polymorpha*, dont 21 appartenant à la variété *polymorpha* et 19 à la variété *vulgaris*. Les données utilisées étaient basées sur les moyennes des valeurs mesurées pour chaque accession. Les caractéristiques étudiées ont montré les traits les plus discriminants, à savoir "WTP, RW et SP" avec des coefficients de variation élevés (55,56 %, 50,66 % et 43,04 %, respectivement). Parallèlement, l'analyse en composantes principales (ACP) a mis en évidence la relation entre ces caractères et les six paramètres éco-géographiques où une étroite corrélation a été remarquée. Ces résultats soulignent la prédominance des influences écologiques sur la diversité morphologique observée chez *M. polymorpha*, démontrant ainsi son adaptation aux différents paramètres éco-géographiques.

De plus, l'analyse électrophorétique des systèmes enzymatiques EST (Estérase) et GOT (Glutamate Oxaloacétate Transaminase) selon le protocole décrit par Weeden et Wendel en 1990, a révélé la présence de six isoenzymes, totalisant 19 allèles et 27 phénotypes. Le système enzymatique GOT permet de distinguer huit bandes avec 13 phénotypes répartis en deux loci (GOT1 et GOT2) tandis que le système EST montre la présence de 11 bandes attribuées à 4 isoenzymes (EST1, EST2, EST3 et EST4), ce qui a donné lieu à un total de 14 phénotypes. Le dendrogramme construit à partir de la matrice de l'indice de Jaccard a illustré clairement le polymorphisme élevé dans les isoenzymes, avec la formation de huit classes distinctes. Ces constatations concordent avec les conclusions antérieures de Bullitta et *al.* (1996), qui ont

Synthèse et Conclusion générale

suggéré que l'autogamie élevée chez *M. polymorpha* peut jouer un rôle significatif dans la génération et le maintien de la variation génétique observée.

Par ailleurs, L'analyse protéique en se basant sur la technique développée par Freitas et *al.* en 2004, avec des modifications apportées au niveau du laboratoire. Les fractions protéiques : albumines et globulines, ont révélé l'identification de 48 bandes, dont les fréquences variaient de 0,05 à 1 pour la fraction albumine, tandis que la fraction globuline présentait 41 bandes avec des fréquences allant de 0,01 à 1. Il convient de noter que des bandes spécifiques ont été observées à une fréquence de 0,5, ce qui signifie leur présence exclusive dans une seule variété. Ce constat met en évidence un polymorphisme intraspécifique significatif dans les deux fractions protéiques, remettant en question la compréhension conventionnelle des espèces de *Medicago* annuelles auto-fécondantes.

En outre, une analyse moléculaire a été effectuée sur un ensemble de 48 accessions, en suivant le protocole établi par Doyle et Doyle en 1990. Deux paires d'amorce, AFct32 et AFctt11, ont été utilisées et ont permis de détecter au total 27 fragments, avec 11 fragments spécifiques à Afct32 et 16 fragments spécifiques à Afctt11. Des différences de fréquences des fragments ont été observées entre les accessions de la variété *polymorpha* et *vulgaris*, indiquant une divergence génétique entre les deux variétés, en renforçant l'idée que la diversité génétique observée au sein de *M. polymorpha* est une caractéristique intrinsèque de cette espèce.

L'analyse statistique effectuée, en calculant les fréquences, les distances génétiques et en réalisant une classification hiérarchique, a permis d'évaluer numériquement la diversité morphologique, des isoenzymes, des protéines et des marqueurs moléculaires chez l'espèce *M. polymorpha*. Il est important de noter que le regroupement des accessions était influencé à la fois par leur emplacement éco-géographique et par leur classification en tant que var. *polymorpha* ou var. *vulgaris*.

Au terme de cette étude, des informations précieuses sur la diversité génétique de l'espèce *M. polymorpha* ont été fournies, mais il reste encore beaucoup à faire pour exploiter pleinement leur potentiel :

- Les résultats obtenus constituent une base solide pour des recherches ultérieures visant à identifier les accessions présentant des caractères phénotypiques et génétiques intéressants, afin de les utiliser comme parents dans des programmes de sélection et de croisements visant à développer de nouvelles variétés améliorées et approfondir notre

Synthèse et Conclusion générale

compréhension des mécanismes génétiques qui régissent la diversité génétique de cette espèce.

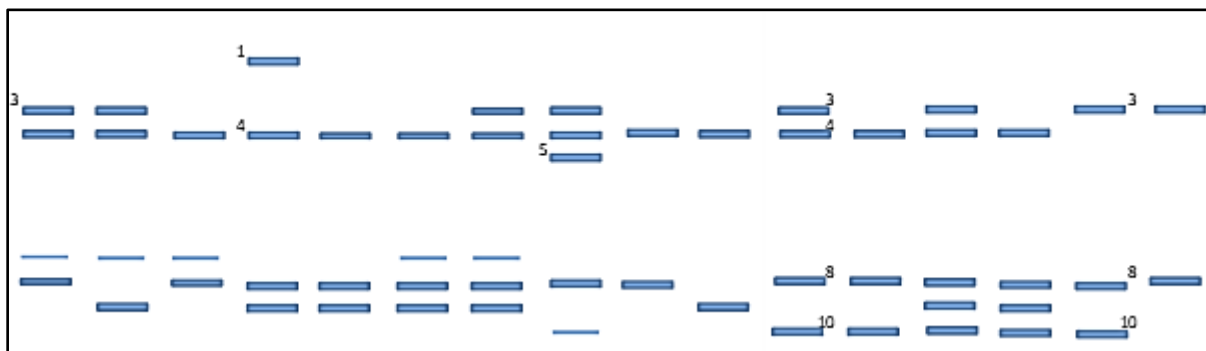
- Une exploitation plus approfondie des ressources génétiques de *M. polymorpha* est nécessaire dans les domaines de l'agriculture et de l'environnement, pour en tirer pleinement profit.
- Une exploration plus poussée des propriétés médicinales et pharmaceutiques potentielles de *M. polymorpha* permettra de développer de nouvelles applications dans le domaine de la santé.

ANNEXES

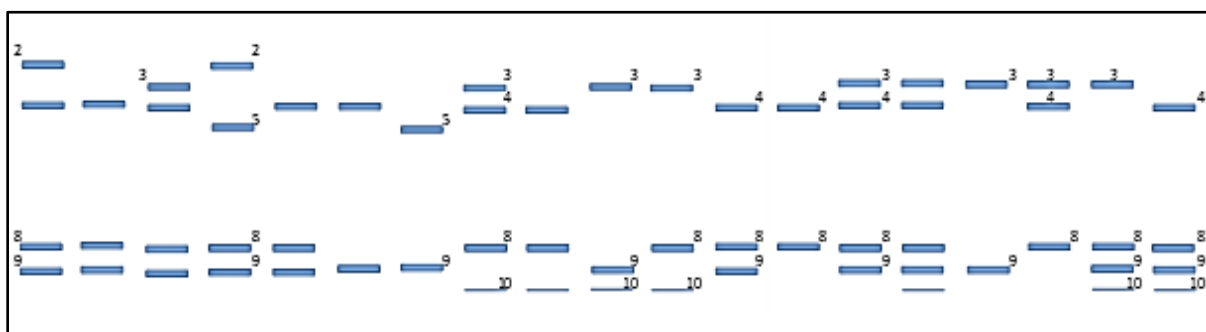
ANNEXE 2. Caractères biométriques mesurées des populations *M. polymorpha*.

Accessions	LP (mm)	WP (mm)	WTP (g)	SP	LS (mm)	WS (mm)	WTS (g)	RW	DCOT (Jours)	LGFT6 (mm)	LRFT6 (mm)	SFT6 (mm2)
Mp1	5.00	9.75	1.99	5	3.28	1.93	4.68	2,35	1	7,39	2,90	21,43
Mp4	5.45	10.51	2.04	6	3.41	1.85	4.92	2,41	1	7,93	2,69	21,33
Mp5	5.51	10.71	1.42	5	3.23	1.79	1.70	1,20	1	9,29	4,46	41,43
Mp6	5.41	11.99	2.24	4	3.46	1.94	4.16	1,86	1	8,83	2,69	23,75
Mp7	7.16	10.27	3.65	4	3.36	1.98	2,34	0,64	1	7,32	2,65	19,40
Mp8	6.24	10.98	2.07	6	3.32	1.93	4,40	2,13	1	7,85	3,58	28,10
Mp9	6.50	12.27	3.29	7	3.51	1.97	6,20	1,88	1	7,67	2,75	21,09
Mp10	6.35	10.63	2.27	5	3.16	1.88	6,68	2,94	2	7,67	2,95	22,63
Mp11	6.36	11.29	1.57	6	3.33	1.93	5,43	3,46	2	7,48	2,39	17,88
Mp12	5.96	10.70	2.29	6	3.40	1.96	5,14	2,24	2	8,37	2,69	22,52
Mp13	6.43	10.42	2.42	7	3.35	1.96	4,15	1,71	1	9,83	4,13	40,60
Mp14	5.28	9.60	1.47	5	3.23	1.73	4,14	2,82	1	6,92	2,79	19,31
Mp15	6.16	9.97	2.27	6	3.17	1.78	4,20	1,85	1	6,25	2,82	17,63
Mp16	5.46	10.04	1.75	8	2.95	1.62	3,17	1,81	1	6,49	3,04	19,73
Mp17	6.03	10.31	2.14	6	2.98	1.68	3,60	1,68	1	10,19	3,51	35,77
Mp18	8.50	10.31	3.58	7	4.07	2.14	6,88	1,92	1	6,88	3,36	23,12
Mp19	5.77	12.00	2.27	3	3.39	1.84	5,34	2,35	1	12,19	4,41	53,76
Mp20	5.43	11.08	1.89	6	3.20	1.74	4,20	2,22	3	7,91	2,83	22,39
Mp21	6.17	11.82	2.17	7	3.54	1.91	5,13	2,36	2	4,72	2,22	10,48
Mp22	6.76	12.86	2.58	5	3.57	1.99	5,50	2,13	1	9,35	3,23	30,20
Mp23	6.01	10.42	2.18	4	3.72	2.01	5,52	2,53	1	7,80	3,45	26,91
Mpv1	2,66	9,38	0,74	3	2,46	1,47	2,67	3,61	1	5,25	2,02	10,61
Mpv2	3,19	8,96	0,96	3	3,25	1,80	3,08	3,21	1	8,24	2,60	21,42
Mpv3	2,96	8,51	1,36	3	3,23	1,77	4,54	3,34	1	6,72	2,69	18,08
Mpv4	3,13	8,12	0,70	3	3,11	1,73	2,62	3,74	1	6,70	2,67	17,89
Mpv6	2,73	5,98	0,52	3	2,51	1,46	2,65	5,10	2	6,45	2,95	19,03
Mpv7	3,43	7,98	0,81	2	2,89	1,51	3,19	3,94	1	7,60	2,81	21,36
Mpv8	3,84	6,88	0,59	4	3,07	1,63	2,15	3,64	2	7,19	3,88	27,90
Mpv10	3,16	6,61	0,59	2	2,83	1,47	2,71	4,59	2	8,38	2,92	24,47
Mpv11	3,71	7,44	0,62	2	2,88	1,62	3,51	5,66	2	6,23	2,52	15,70
Mpv12	3,88	7,50	1,02	3	3,38	1,91	3,63	3,56	2	9,13	3,02	27,57
Mpv16	3,11	6,13	0,52	2	2,68	1,49	1,87	3,60	1	5,91	1,89	11,17
Mpv17	2,87	9,79	0,95	3	2,86	1,58	2,69	2,83	1	5,93	2,29	13,58
Mpv20	3,37	9,52	1,01	4	2,99	1,67	3,00	2,97	1	9,06	2,94	26,64
Mpv21	2,39	8,18	0,31	3	2,69	1,59	3,04	9,81	2	8,42	2,70	22,73
Mpv23	2,67	6,13	0,60	4	2,81	1,50	2,77	4,62	1	6,46	2,57	16,60
Mpv24	3,06	7,21	0,84	3	2,80	1,65	2,66	3,17	1	7,96	2,59	20,62
Mpv25	3,88	8,14	1,01	2	3,09	1,73	3,15	3,12	1	6,46	3,49	22,55
Mpv26	3,84	8,21	1,25	2	2,98	1,66	2,88	2,30	1	7,53	3,15	23,72
Mpv27	4,00	6,71	0,92	3	2,34	1,66	2,44	2,65	1	6,74	2,59	17,46

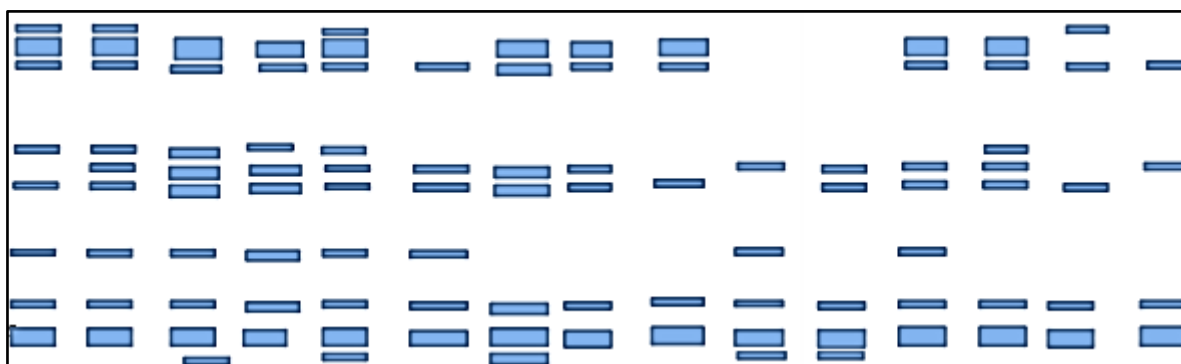
ANNEXE 3. Diagramme types des systèmes enzymatiques (GOT et EST) des deux variétés.



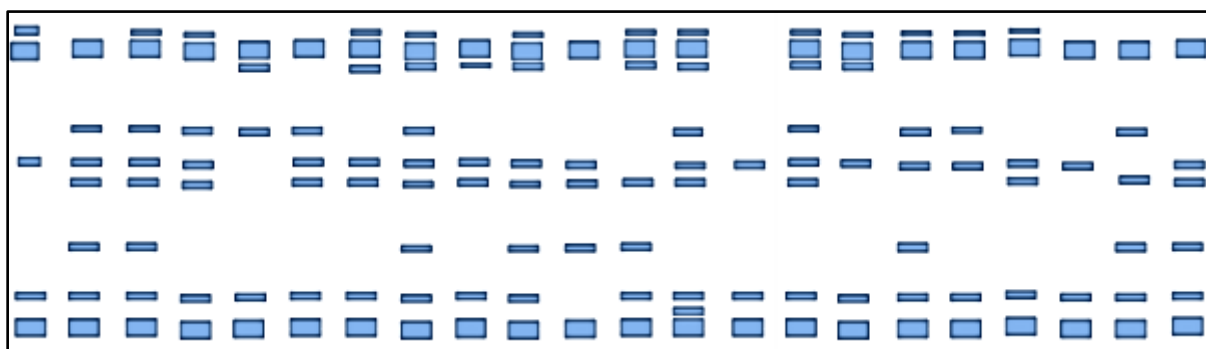
GOT : var. *polymorpha*.



GOT : var. *vulgaris*.



EST : var. *polymorpha*.



EST : var. *vulgaris*.

ANNEXE 4. Matrice présence/absence et fréquences des allozymes des 56 accessions de

l'espèce *M. polymorpha*.

	Bandes/ Acc	Mp1	Mp2	Mp3	Mp4	Mp5	Mp6	Mp7	Mp8	Mp9	Mp10	Mp11	Mp12	Mp13	Mp14	Mp15	Mp16	Mp17	Mp18	Mp19	Mp20	Mp21	Mp22	Mp23	Mp24	Mp25	Mp26	Mp27	Mp28	
GOT 1	Gt1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Gt2	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
	Gt3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
	Gt4	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	0	0	0	0
GOT 2	Gt5	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	Gt6	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	
	Gt7	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	
	Gt8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
EST 1	E1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
	E2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	
	E3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	
EST 2	E4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	E5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
	E6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	
	E7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
EST 3	E8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0		
EST 4	E9	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	1	1	1	
	E10	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	1	1	1	
	E11	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	

	Bandes/ ACC	Mpv1	Mpv2	Mpv3	Mpv4	Mpv5	Mpv6	Mpv7	Mpv8	Mpv9	Mpv10	Mpv11	Mpv12	Mpv13	Mpv14	Mpv15	Mpv16	Mpv17	Mpv18	Mpv19	Mpv20	Mpv21	Mpv22	Mpv23	Mpv24	Mpv25	Mpv26	Mpv27	Mpv28	Somme	Fréquences
Gt1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01
Gt2	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	22	0.39
Gt3	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	47	0.83
Gt4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.01	
Gt5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.12	
Gt6	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	50	0.89	
Gt7	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	28	0.5	
Gt8	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	29	0.51	
E1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	25	0.44	
E2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	50	0.89	
E3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	37	0.66	
E4	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	14	0.02	
E5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0.30	
E6	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	50	0.89	
E7	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	47	0.83	
E8	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	31	0.55	
E9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	55	0.98	
E10	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	1	1	1	56	1	
E11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0.16	

Mpv1	1,00	0,58	0,58	0,67	0,58	0,55	0,73	0,64	0,64	0,62	0,58	0,67	0,69	0,45	0,38	0,46	0,67	0,67	0,67	0,62	0,80	0,58	0,73	0,80	0,70	0,42	0,50
Mpv2	1,00	0,54	0,82	0,75	0,67	0,64	0,82	0,90	0,58	0,83	0,54	0,62	0,64	0,70	0,36	0,54	0,45	0,62	0,62	0,57	0,58	0,67	0,67	0,73	0,50	0,80	0,73
Mpv3	1,00	0,67	0,75	0,67	0,38	0,67	0,58	0,46	0,57	0,54	0,62	0,64	0,31	0,58	0,82	0,45	0,62	0,50	0,83	0,46	0,54	0,67	0,58	0,50	0,38	0,46	
Mpv4	1,00	0,91	0,54	0,50	0,67	0,73	0,46	0,69	0,54	0,62	0,64	0,55	0,46	0,67	0,60	0,62	0,62	0,69	0,46	0,54	0,54	0,58	0,50	0,64	0,58		
Mpv5	1,00	0,62	0,46	0,75	0,67	0,54	0,77	0,50	0,57	0,71	0,50	0,54	0,75	0,55	0,57	0,69	0,77	0,54	0,62	0,62	0,67	0,46	0,58	0,54			
Mpv6	1,00	0,50	0,82	0,73	0,73	0,69	0,67	0,62	0,64	0,55	0,46	0,67	0,33	0,62	0,62	0,69	0,58	0,82	0,82	0,73	0,64	0,64	0,73				
Mpv7	1,00	0,64	0,70	0,55	0,67	0,50	0,58	0,50	0,36	0,31	0,29	0,40	0,58	0,46	0,54	0,70	0,50	0,64	0,55	0,45	0,60	0,42					
Mpv8	1,00	0,50	0,73	0,83	0,54	0,62	0,64	0,55	0,36	0,54	0,45	0,62	0,62	0,69	0,73	0,67	0,82	0,90	0,50	0,64	0,58						
Mpv9	1,00	0,64	0,75	0,58	0,67	0,57	0,60	0,29	0,46	0,50	0,67	0,54	0,62	0,64	0,58	0,73	0,80	0,55	0,70	0,64							
Mpv10	1,00	0,75	0,73	0,67	0,69	0,60	0,50	0,46	0,36	0,67	0,82	0,62	0,80	0,58	0,58	0,80	0,55	0,55	0,64								
Mpv11	1,00	0,57	0,64	0,79	0,58	0,50	0,57	0,38	0,64	0,77	0,71	0,75	0,69	0,69	0,75	0,43	0,67	0,62									
Mpv12	1,00	0,91	0,77	0,55	0,58	0,54	0,45	0,91	0,75	0,69	0,58	0,54	0,54	0,58	0,80	0,50	0,73										
Mpv13	1,00	0,85	0,50	0,54	0,50	0,55	1,00	0,69	0,77	0,67	0,50	0,62	0,67	0,73	0,46	0,67											
Mpv14	1,00	0,54	0,69	0,64	0,46	0,85	0,85	0,79	0,69	0,64	0,64	0,69	0,62	0,50	0,69												
Mpv15	1,00	0,33	0,42	0,30	0,50	0,64	0,36	0,45	0,55	0,42	0,60	0,50	0,67	0,78													
Mpv16	1,00	0,73	0,25	0,54	0,67	0,62	0,38	0,46	0,36	0,38	0,42	0,42	0,50														
Mpv17	1,00	0,33	0,50	0,62	0,69	0,36	0,67	0,54	0,46	0,50	0,50	0,58															
Mpv18	1,00	0,55	0,42	0,50	0,50	0,33	0,45	0,50	0,56	0,27	0,36																
Mpv19	1,00	0,69	0,77	0,67	0,50	0,62	0,67	0,73	0,46	0,67																	
Mpv20	1,00	0,64	0,67	0,62	0,50	0,67	0,58	0,58	0,67																		
Mpv21	1,00	0,62	0,57	0,69	0,62	0,54	0,43	0,50																			
Mpv22	1,00	0,58	0,73	0,80	0,55	0,42	0,50																				
Mpv23	1,00	0,82	0,58	0,64	0,64	0,73																					
Mpv24	1,00	0,73	0,64	0,50	0,58																						
Mpv25	1,00	0,55	0,55	0,64																							
Mpv26	1,00	0,45	0,70																								
Mpv27	1,00	0,70																									
Mpv28	1,00																										

Ифv1	0,95	0,84	0,95	0,90	0,95	0,95	0,90	0,90	1,00	0,81	0,83	0,84	0,76	0,46	0,48	0,30	0,52	0,52	0,37	0,40	0,36	0,42	0,42	0,52	0,58	0,63	0,52
Ифv2	0,80	0,90	0,86	0,90	0,90	0,95	0,95	0,95	0,77	0,87	0,80	0,73	0,44	0,52	0,48	0,30	0,30	0,36	0,38	0,40	0,41	0,41	0,30	0,56	0,60	0,50	
Ифv3	0,80	0,84	0,80	0,80	0,76	0,76	0,84	0,84	0,70	1,00	0,89	0,46	0,43	0,30	0,52	0,52	0,42	0,45	0,41	0,42	0,42	0,46	0,52	0,57	0,46		
Ифv4	0,95	1,00	1,00	0,86	0,95	0,95	0,86	0,79	0,80	0,73	0,50	0,52	0,48	0,30	0,30	0,36	0,38	0,35	0,41	0,41	0,56	0,56	0,60	0,56			
Ифv5	0,95	0,95	0,82	0,90	0,90	0,90	0,75	0,84	0,76	0,46	0,48	0,44	0,46	0,46	0,37	0,40	0,36	0,37	0,37	0,52	0,52	0,56	0,52				
Ифv6	1,00	0,86	0,95	0,95	0,86	0,79	0,80	0,73	0,50	0,52	0,48	0,30	0,30	0,36	0,38	0,35	0,41	0,41	0,56	0,56	0,60	0,56					
Ифv7	0,86	0,95	0,95	0,86	0,79	0,80	0,73	0,50	0,52	0,48	0,30	0,30	0,36	0,38	0,35	0,41	0,41	0,56	0,56	0,60	0,56						
Ифv8	0,91	0,90	0,74	0,83	0,76	0,77	0,43	0,30	0,46	0,48	0,48	0,34	0,37	0,38	0,39	0,39	0,39	0,48	0,54	0,58	0,48						
Ифv9	0,90	0,82	0,83	0,76	0,70	0,48	0,55	0,46	0,48	0,48	0,34	0,37	0,38	0,39	0,39	0,39	0,54	0,54	0,58	0,54							
Ифv10	0,81	0,83	0,84	0,76	0,46	0,48	0,30	0,52	0,52	0,37	0,40	0,36	0,42	0,42	0,52	0,58	0,63	0,52									
Ифv11	0,75	0,84	0,76	0,52	0,54	0,30	0,52	0,52	0,42	0,46	0,42	0,42	0,42	0,38	0,58	0,63	0,58										
Ифv12	0,70	0,71	0,45	0,57	0,48	0,30	0,30	0,37	0,39	0,41	0,41	0,41	0,30	0,56	0,59	0,55											
Ифv13	0,89	0,46	0,43	0,30	0,52	0,52	0,42	0,45	0,41	0,42	0,42	0,46	0,52	0,57	0,46												
Ифv14	0,42	0,40	0,46	0,48	0,48	0,38	0,42	0,38	0,38	0,38	0,43	0,48	0,52	0,43													
Ифv15	0,79	0,86	0,90	0,90	0,68	0,75	0,62	0,76	0,76	0,78	0,81	0,77	0,86														
Ифv16	0,76	0,79	0,79	0,56	0,60	0,56	0,68	0,68	0,77	0,79	0,76	0,92															
Ифv17	0,95	0,95	0,73	0,71	0,39	0,73	0,73	0,83	0,86	0,82	0,83																
Ифv18	1,00	0,68	0,75	0,62	0,76	0,76	0,78	0,90	0,86	0,86																	
Ифv19	0,68	0,75	0,62	0,76	0,76	0,78	0,90	0,86	0,86																		
Ифv20	1,00	0,89	0,74	0,71	0,71	0,67	0,61	0,58	0,60																		
Ифv21	0,82	0,70	0,70	0,58	0,67	0,64	0,65																				
Ифv22	0,57	0,57	0,48	0,55	0,52	0,54																					
Ифv23	1,00	0,74	0,76	0,73	0,67																						
Ифv24	0,74	0,76	0,73	0,67																							
Ифv25	0,86	0,83	0,83																								
Ифv26	0,95	0,86																									
Ифv27	0,83																										
Ифv28																											

Amorces	Bandes	Mpv1	Mpv2	Mpv3	Mpv4	Mpv5	Mpv6	Mpv7	Mpv8	Mpv9	Mpv10	Mpv11	Mpv12	Mpv14	Mpv16	Mpv17	Mpv20	Mpv21	Mpv23	Mpv24	Mpv25	Mpv26	Mpv27	Mpv28	Mpv1	Mpv2	Sommes	Fréquences	
		afct32	AF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
AF2	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	4	0,07
AF3	0		1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	36	0,64
AF4	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01
AF5	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	0,33
AF6	1		1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	14	0,25
AF7	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0,16
AF8	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	25	0,44
AF9	0		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,01
AF10	0		0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	35	0,62
AF11	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	1	48	0,85
Afctt1	af1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,01	
	af2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,08
	af3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,01
	af4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	0,16
	af5	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	20	0,35
	af6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,05
	af7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,03
	af8	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	15	0,26
	af9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	19	0,33
	af10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	17	0,30
	af11	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	0,17
	af12	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	1	48	0,85
	af13	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	12	0,21
	af14	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	12	0,21
	af15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	47	0,83
	af16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	0,21

ANNEXE 11. Matrice de similarité génétique des SRR entre les accessions de l'espèce *M. polymorpha* basée sur l'indice de Jaccard.

Mp1	Mp2	Mp3	Mp4	Mp5	Mp6	Mp7	Mp8	Mp9	Mp10	Mp11	Mp12	Mp13	Mp14	Mp15	Mp16	Mp17	Mp19	Mp20	Mp21	Mp22	Mp23	Mp24	Mp26	Mp28	Mpv1	Mpv2	Mpv3	Mpv4	Mpv5	Mpv6	Mpv7	Mpv8	Mpv9	Mpv10	Mpv11	Mpv12	Mpv14	Mpv16	Mpv17	Mpv20	Mpv21	Mpv23	Mpv24	Mpv25	Mpv26	Mpv27	Mpv28	
Mp1	0,67	0,75	0,73	0,60	0,67	0,69	0,64	0,57	0,67	0,60	0,64	0,46	0,64	0,53	0,60	0,40	0,41	0,50	0,43	0,50	0,50	0,53	0,57	0,29	0,21	0,29	0,36	0,33	0,31	0,31	0,36	0,25	0,29	0,25	0,36	0,27	0,27	0,29	0,50	0,33	0,38	0,33	0,23	0,33	0,24	0,40	0,43	
Mp2		0,58	0,70	0,57	0,50	0,54	0,62	0,54	0,80	0,47	0,62	0,70	0,62	0,40	0,47	0,46	0,29	0,38	0,50	0,46	0,36	0,40	0,54	0,33	0,25	0,45	0,42	0,50	0,36	0,36	0,42	0,38	0,45	0,30	0,55	0,33	0,42	0,45	0,45	0,40	0,45	0,40	0,27	0,27	0,27	0,36	0,38	
Mp3			0,80	0,64	0,73	0,75	0,57	0,62	0,58	0,64	0,57	0,38	0,69	0,57	0,64	0,43	0,44	0,53	0,46	0,54	0,54	0,57	0,62	0,31	0,23	0,31	0,38	0,36	0,33	0,33	0,38	0,27	0,31	0,27	0,38	0,30	0,29	0,31	0,55	0,36	0,42	0,36	0,25	0,36	0,25	0,43	0,46	
Mp4				0,50	0,70	0,73	0,54	0,58	0,55	0,50	0,54	0,45	0,54	0,54	0,62	0,50	0,40	0,50	0,55	0,64	0,50	0,54	0,73	0,36	0,27	0,36	0,45	0,42	0,40	0,38	0,45	0,31	0,36	0,33	0,45	0,38	0,33	0,36	0,50	0,44	0,50	0,44	0,30	0,30	0,29	0,38	0,42	
Mp5					0,57	0,71	0,67	0,60	0,57	0,73	0,92	0,62	0,67	0,39	0,44	0,28	0,30	0,37	0,29	0,35	0,44	0,47	0,41	0,25	0,36	0,25	0,31	0,29	0,19	0,35	0,31	0,22	0,25	0,21	0,31	0,23	0,40	0,25	0,33	0,29	0,33	0,20	0,30	0,29	0,15	0,28	0,57	
Mp6						0,82	0,50	0,54	0,64	0,69	0,62	0,55	0,62	0,62	0,57	0,46	0,47	0,57	0,50	0,58	0,58	0,75	0,54	0,33	0,36	0,33	0,42	0,38	0,36	0,46	0,55	0,29	0,33	0,30	0,42	0,33	0,60	0,40	0,45	0,40	0,27	0,40	0,27	0,46	0,64			
Mp7							0,53	0,57	0,54	0,71	0,77	0,46	0,53	0,53	0,60	0,40	0,41	0,50	0,43	0,50	0,50	0,64	0,57	0,29	0,42	0,29	0,46	0,33	0,31	0,50	0,46	0,25	0,29	0,25	0,36	0,27	0,46	0,29	0,50	0,45	0,38	0,33	0,23	0,33	0,24	0,40	0,67	
Mp8								0,92	0,62	0,67	0,60	0,54	0,71	0,41	0,39	0,38	0,30	0,39	0,40	0,47	0,38	0,41	0,44	0,27	0,29	0,36	0,43	0,40	0,29	0,38	0,33	0,31	0,36	0,23	0,43	0,25	0,43	0,36	0,36	0,42	0,36	0,31	0,21	0,21	0,22	0,29	0,40	
Mp9									0,54	0,60	0,53	0,46	0,64	0,44	0,41	0,40	0,33	0,41	0,43	0,50	0,40	0,44	0,47	0,29	0,31	0,38	0,46	0,43	0,31	0,40	0,36	0,33	0,38	0,25	0,46	0,38	0,38	0,45	0,38	0,33	0,23	0,23	0,24	0,31	0,16	0,29	0,62	
Mp10										0,57	0,62	0,70	0,75	0,50	0,47	0,46	0,38	0,47	0,50	0,46	0,46	0,50	0,43	0,33	0,25	0,45	0,42	0,50	0,36	0,36	0,42	0,38	0,45	0,30	0,55	0,33	0,42	0,45	0,60	0,40	0,45	0,40	0,27	0,40	0,27	0,46	0,50	
Mp11											0,67	0,50	0,67	0,47	0,44	0,35	0,37	0,44	0,38	0,44	0,44	0,56	0,41	0,25	0,36	0,25	0,40	0,29	0,27	0,44	0,40	0,22	0,25	0,21	0,31	0,23	0,40	0,25	0,43	0,38	0,33	0,29	0,20	0,29	0,21	0,35	0,57	
Mp12												0,67	0,67	0,67	0,47	0,44	0,29	0,30	0,39	0,31	0,38	0,47	0,50	0,44	0,27	0,38	0,27	0,33	0,31	0,20	0,38	0,33	0,24	0,27	0,23	0,31	0,23	0,43	0,27	0,36	0,31	0,36	0,21	0,21	0,31	0,16	0,29	0,62
Mp13													0,54	0,33	0,31	0,38	0,24	0,31	0,42	0,38	0,38	0,43	0,36	0,36	0,40	0,36	0,33	0,42	0,27	0,38	0,45	0,31	0,36	0,33	0,45	0,38	0,45	0,36	0,36	0,30	0,30	0,30	0,30	0,30	0,20	0,29	0,55	
Mp14														0,60	0,56	0,47	0,47	0,56	0,50	0,57	0,60	0,53	0,36	0,20	0,36	0,33	0,40	0,29	0,29	0,33	0,31	0,36	0,23	0,43	0,25	0,33	0,36	0,46	0,31	0,36	0,31	0,21	0,31	0,22	0,38	0,40		
Mp15															0,92	0,83	0,79	0,92	0,75	0,83	0,83	0,85	0,77	0,58	0,20	0,27	0,33	0,40	0,29	0,38	0,33	0,31	0,36	0,23	0,43	0,25	0,25	0,35	0,46	0,31	0,46	0,42	0,42	0,31	0,38	0,57	0,50	
Mp16																0,77	0,73	0,86	0,69	0,77	0,77	0,79	0,85	0,54	0,19	0,25	0,31	0,38	0,27	0,35	0,31	0,29	0,33	0,21	0,40	0,23	0,24	0,33	0,43	0,29	0,43	0,38	0,38	0,29	0,35	0,53	0,47	
Mp17																	0,64	0,77	0,90	0,82	0,67	0,69	0,75	0,70	0,23	0,31	0,38	0,46	0,33	0,43	0,38	0,36	0,42	0,27	0,50	0,30	0,29	0,42	0,42	0,36	0,55	0,50	0,50	0,25	0,43	0,54	0,46	
Mp19																		0,86	0,57	0,64	0,64	0,67	0,60	0,54	0,19	0,25	0,31	0,38	0,27	0,35	0,31	0,29	0,33	0,21	0,40	0,23	0,24	0,33	0,43	0,29	0,33	0,38	0,38	0,29	0,44	0,64	0,38	
Mp20																			0,69	0,77	0,77	0,79	0,71	0,54	0,19	0,25	0,31	0,38	0,27	0,35	0,31	0,29	0,33	0,21	0,40	0,23	0,24	0,33	0,43	0,29	0,43	0,38	0,38	0,29	0,44	0,64	0,47	
Mp21																				0,90	0,73	0,75	0,82	0,78	0,25	0,33	0,42	0,50	0,36	0,46	0,42	0,38	0,45	0,30	0,55	0,33	0,31	0,45	0,45	0,40	0,60	0,56	0,56	0,27	0,46	0,58	0,50	
Mp22																					0,82	0,83	0,91	0,70	0,23	0,31	0,38	0,46	0,33	0,43	0,38	0,36	0,42	0,27	0,50	0,30	0,29	0,42	0,42	0,36	0,55	0,50	0,50	0,25	0,43	0,54	0,46	
Mp23																						0,83	0,75	0,70	0,23	0,21	0,29	0,36	0,23	0,33	0,29	0,27	0,31	0,27	0,38	0,30	0,20	0,31	0,42	0,25	0,55	0,36	0,50	0,36	0,33	0,54	0,58	
Mp24																							0,77	0,58	0,29	0,27	0,33	0,40	0,29	0,47	0,43	0,31	0,36	0,23	0,43	0,25	0,33	0,36	0,46	0,31	0,46	0,42	0,42	0,31	0,38	0,57	0,62	
Mp26																							0,64	0,21	0,29	0,36	0,43	0,31	0,40	0,36	0,33	0,38	0,25	0,46	0,27	0,27	0,38	0,38	0,33	0,50	0,45	0,45	0,23	0,40	0,50	0,43		
Mp28																								0,50	0,27	0,36	0,45	0,30	0,42	0,36	0,33	0,40	0,38	0,50	0,43	0,25	0,40	0,40	0,33	0,56	0,50	0,71	0,33	0,42	0,55	0,45		
Mpv1																										0,44	0,56	0,36	0,50	0,60	0,56	0,36	0,30	0,43	0,27	0,50	0,75	0,30	0,44	0,38	0,44	0,38	0,38	0,57	0,33	0,33	0,50	
Mpv2																											0,67	0,78	0,86	0,55	0,67	0,78	0,75	0,57	0,50	0,43	0,67	0,75	0,56	0,33	0,40	0,50	0,33	0,50	0,42	0,42	0,23	
Mpv3																												0,70	0,75	0,80	0,78	0,55	0,50	0,50	0,45	0,38	0,60	0,50	0,67	0,63	0,50	0,44	0,30	0,44	0,38	0,50	0,42	
Mpv4																												0,67	0,73	0,70	0,80	0,78	0,44	0,70	0,33	0,55	0,78	0,60	0,40	0,45	0,40	0,40	0,40	0,46	0,58	0,29		
Mpv5																												0,60	0,75	0,67	0,63	0,67	0,40	0,50	0,56	0,63	0,63	0,38	0,44	0,57	0,38	0,57	0,45	0,45	0,25			
Mpv6																												0,80	0,98	0,55	0,40	0,50	0,30	0,64	0,55	0,55	0,50	0,42	0,36	0,36	0,36	0,36	0,43	0,54	0,46			
Mpv7																													0,55	0,50	0,50	0,45	0,38	0,60	0,50	0,67	0,44	0,50	0,44	0,30	0,44	0,38	0,50	0,42				
Mpv8																													0,78	0,44	0,70	0,33	0,55	0,78	0,45	0,27	0,33	0,40	0,40	0,40	0,40	0,46	0,46	0,20				
Mpv9																														0,57	0,67	0,43	0,50	1,00	0,40	0,33	0,27	0,										

ANNEXE 12. Révélation des enzymes

D'après Bendiab *et al.* 1993

Estérases (EST). E.C. 3.1.1.

- 0.03 g α -Naphtylacétate (se dissout dans l'acétone à 50%).
- 100 ml (q.s.p) de tampon Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2.
- Incuber 15 minutes à 37°C.
- Rincer le gel deux fois avec de l'eau courante.
- Incuber 20 min dans la solution de coloration :
- 0.14 g Fast Blue RR salt.
- 25 ml de tampon Tris-HCl pH 7,2.
- 100 ml (q.s.p) H₂O.

Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT) = Aspartate aminotransferase (AAT).

E.C. 2.6.1.1

- 0.25 g Acide -L- Aspartique.
- 0.1 g Acide alpha-cétoglutarique.
- 50 ml de tampon Tris-Hcl 0,5 M, pH 7,2.
- 100 ml (q.s.p) H₂O.
- Incuber 15 min à 37°C puis rincer avec de l'eau courante et rajouter la solution de coloration:
 - 0.2 g Fast Blue BB.
 - 25 ml de tampon Tris-Hcl 0,5M, pH 7,2.
 - 100 ml (q.s.p) H₂O.
- Incuber à 37 °C jusqu'à l'apparition des bandes.

ANNEXE 13. Séparation des albumines et des globulines par SDS-PAGE.

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 distillée 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 μ L
- TEMED 4 μ L

Tampon d'électrophorèse (Stocker à température ambiante)

- Glycine 70.55 g
- Tris 15 g
- SDS 5 g
- Eau distillée Qsp 5 L

Le tampon des cuves doit être renouvelé lorsque le voltage dépasse 500V en fin de migration (environ 20 utilisations), prévoir 4 litres par cuve. Prévoir 1 litre pour le bac supérieur à chaque électrophorèse.

Solution de coloration (pour les gels monodimensionnels), à préparer le jour même

- TCA 30 g
- Solution mère de Bleu de Coomassie
- R250
- 12,5 mL
- Eau distillée Qsp 250 mL

Bien mettre en agitation avant utilisation

Solution mère de Bleu de Coomassie R250

- Bleu de Coomassie R250 10 g
- Ethanol 95° Qsp 1 L

Laisser en agitation au moins 2 heures. Filtrer cette solution avec un filtre plissé n°3.

Attention : mettre en premier l'alcool dans le bûcher avec un barreau aimanté en agitation, puis mettre le bleu de Coomassie dans le bûcher en agitation (sinon le bleu prend en masse au fond du contenant)

ANNEXE 14. 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
- Décanter 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 déplacées 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 15. 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 (\approx 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 supérieur 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 supérieur 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
- Eliminer le surnageant et ajouter 500 µl de **solution de lavage 2**.
- Ne pas incuber plus de 5 min
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Eliminer 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.

Contrôle de qualité

- Préparer un gel 0.8% dans du **TBE 1X**
- Déposer 5 µL (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 µg/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

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
- Na₂ EDTA 7.44 g 20 mM
- NaCl 81.8 g 1.4 M
- PVP 40 10 g 1 % (p/v)
- H₂O 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

- H₂O 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.

ANNEXE 16. 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
- MgCl₂ 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 :

Etape	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
- EDTANa₂ 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 (un agent mutagène), pour le manipuler, porter des gants doubles en latex ou des gants simples en nitrile.

Résumés

Résumé

Résumé

Cette étude visait à explorer la diversité génétique au sein de l'espèce *Medicago polymorpha* en Algérie, une légumineuse fourragère. Les 56 accessions ont été réparties de manière équilibrée entre deux variétés *polymorpha* et *vulgaris*, avec 28 accessions pour chaque variété, prélevées dans diverses régions du nord Algérien. Pour cela, plusieurs marqueurs ont été utilisés, notamment des caractères biométriques, des isoenzymes, des fractions protéiques (albumines et globulines) et des microsatellites (SSR). L'étude morphologique a impliqué l'analyse de 12 caractères biométriques, ainsi que leur relation avec six paramètres écologiques par le biais de l'analyse en composantes principales (ACP). Une diversité significative des caractères a été constatée, avec une contribution substantielle à la discrimination des accessions étudiées. De plus, des corrélations éco-géographiques ont été mises en évidence, témoignant de l'association entre les caractéristiques morphologiques et les facteurs environnementaux. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a permis d'examiner les systèmes enzymatiques EST et GOT, ainsi que les fractions d'albumines et de globulines. Les résultats obtenus ont révélé une diversité génétique considérable. Pour le système EST, 4 loci, 11 bandes et 14 phénotypes ont été identifiés, tandis que le système GOT a montré 2 loci, 8 bandes et 13 phénotypes. Quant à l'analyse des fractions protéiques, une différenciation intraspécifique significative a été révélée, avec 48 et 41 bandes pour la fraction de l'albumine et la globuline, respectivement. Au niveau moléculaire, les deux paires d'amorces, AFct32 et AFctt1, ont permis de détecter un total de 27 fragments génétiques, avec 11 et 16 fragments pour les deux marqueurs, respectivement. Ces résultats mettent en évidence une variabilité génétique significative au niveau intraspécifique de *M. polymorpha* dans diverses régions du nord Algérien, soulignant l'importance de la conservation et de la gestion durable de cette espèce.

Mots clés : *Medicago polymorpha*, diversité génétique, Algérie, caractères morphologiques, isoenzymes, protéines, microsatellites.

Résumé

Abstract

This study aimed to explore the genetic diversity within the species *Medicago polymorpha* in Algeria, a forage legume. The 56 accessions were evenly distributed between two varieties, *polymorpha* and *vulgaris*, with 28 accessions for each variety, collected from various regions in northern Algeria. To achieve this, several markers were used, including biometric traits, isoenzymes, protein fractions (albumins and globulins), and microsatellites (SSR). The morphological study involved analyzing 12 biometric traits and their relationship with six ecological parameters through principal component analysis (PCA). Significant diversity in the traits was observed, making a substantial contribution to the discrimination of the studied accessions. Additionally, eco-geographical correlations were identified, demonstrating the association between morphological characteristics and environmental factors. Polyacrylamide gel electrophoresis was used to examine the EST and GOT enzyme systems, as well as the albumin and globulin fractions. The results revealed considerable genetic diversity. For the EST system, 4 loci, 11 bands, and 14 phenotypes were identified, while the GOT system showed 2 loci, 8 bands, and 13 phenotypes. Regarding the analysis of protein fractions, significant intraspecific differentiation was revealed, with 48 and 41 bands for the albumin and globulin fractions, respectively. At the molecular level, the two primer pairs, AFct32 and AFct1, allowed the detection of a total of 27 genetic fragments, with 11 and 16 fragments for the respective markers. These results highlight significant intraspecific genetic variability of *M. polymorpha* in various regions of northern Algeria, emphasizing the importance of conservation and sustainable management of this species.

Keywords: *Medicago polymorpha*, genetic diversity, Algeria, morphological traits, isoenzymes, proteins, microsatellites.

ملخص

هدفت هذه الدراسة الى استكشاف التنوع الوراثي داخل النوع *Medicago polymorpha* في الجزائر، وهي نوع من البقوليات العلفية. تم توزيع الـ 56 ملحقة بشكل متوازن بين الأصناف *vulgaris* و *polymorpha*، مع 28 انضمامًا لكل منها، تم جمعها من مناطق مختلفة في شمال الجزائر. بهدف استكشاف هذا التنوع الوراثي، تم استخدام عدة طرق تقييم، بما في ذلك الخصائص البيومترية والإنزيمات والفصائل البروتينية (الألبومينات والجلوبولينات) والميكروساتلات. تضمنت الدراسة المورفولوجية تحليل 12 صفة بيومترية، بالإضافة إلى علاقتها بستة معايير بيئية من خلال التحليل في المكونات الرئيسية (ACP). لوحظ وجود تنوع كبير في الصفات، مع مساهمة هامة في تمييز المدخلات المدروسة. بالإضافة إلى ذلك، تم تسليط الضوء على الارتباطات البيئية والجغرافية، مما يشير إلى العلاقة بين الصفات المورفولوجية والعوامل البيئية. تم استخدام التحليل الكهربائي للهلام متعدد الأكريلاميد، لفحص أنظمة إنزيم EST و GOT، بالإضافة إلى فصائل الألبومين والجلوبولين. كشفت النتائج التي تم الحصول عليها تنوعًا وراثيًا كبيرًا. بالنسبة لنظام EST، تم تحديد 4 مواضع و 11 نطاقًا و 14 نمطًا ظاهريًا، بينما أظهر نظام GOT موقعين و 8 نطاقات و 13 نمطًا ظاهريًا. علاوة على ذلك، أظهر تحليل فصائل البروتين تمايزًا معنويًا بين الأنواع، مع 48 و 41 نطاقًا لفصائل الألبومين والجلوبولين، على التوالي. على المستوى الجزيئي، تم تقييم التنوع الجيني باستخدام علامات SSR (Simple Sequence Repeats) مع زوجين من البرايمر، AFctt1 و AFct32. كشفت تحليل علامات SRR عما مجموعه 27 شريط جيني مختلفة، مع 11 و 16 شريط تم تحديدها بواسطة العلامات AFct32 و Afctt11، على التوالي. تسلط النتائج الضوء على تنوع وراثي كبير على المستوى داخل النوعي لـ *M. polymorpha* في مختلف مناطق شمال الجزائر، مما يعكس أهمية الحفاظ على هذا النوع وإدارته المستدامة.

الكلمات المفتاحية: *Medicago polymorpha*، التنوع الجيني، الجزائر، الصفات المورفولوجية، الإنزيمات، البروتينات.

البروتينات.

Nom : BENM'HAMED BOUMEZÂAR LAOUIR Prénom : Sara Sara Abderrahim	Date de soutenance : 19/06/2023
Thème : Etude de la diversité génétique au sein de <i>Medicago polymorpha</i> algérienne par les marqueurs morphologiques, biochimiques et moléculaires.	
Diplôme : Master en sciences Biologiques	Spécialité : Biochimie Appliquée
<p>Résumé</p> <p>Cette étude visait à explorer la diversité génétique au sein de l'espèce <i>Medicago polymorpha</i> en Algérie, une légumineuse fourragère. Les 56 accessions ont été réparties de manière équilibrée entre deux variétés <i>polymorpha</i> et <i>vulgaris</i>, avec 28 accessions pour chaque variété, prélevées dans diverses régions du nord Algérien. Pour cela, plusieurs marqueurs ont été utilisés, notamment des caractères biométriques, des isoenzymes, des fractions protéiques (albumines et globulines) et des microsatellites (SSR). L'étude morphologique a impliqué l'analyse de 12 caractères biométriques, ainsi que leur relation avec six paramètres écologiques par le biais de l'analyse en composantes principales (ACP). Une diversité significative des caractères a été constatée, avec une contribution substantielle à la discrimination des accessions étudiées. De plus, des corrélations éco-géographiques ont été mises en évidence, témoignant de l'association entre les caractéristiques morphologiques et les facteurs environnementaux. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a permis d'examiner les systèmes enzymatiques EST et GOT, ainsi que les fractions d'albumines et de globulines. Les résultats obtenus ont révélé une diversité génétique considérable. Pour le système EST, 4 loci, 11 bandes et 14 phénotypes ont été identifiés, tandis que le système GOT a montré 2 loci, 8 bandes et 13 phénotypes. Quant à l'analyse des fractions protéiques, une différenciation intraspécifique significative a été révélée, avec 48 et 41 bandes pour la fraction de l'albumine et la globuline, respectivement. Au niveau moléculaire, les deux paires d'amorces, AFct32 et AFct1, ont permis de détecter un total de 27 fragments génétiques, avec 11 et 16 fragments pour les deux marqueurs, respectivement. Ces résultats mettent en évidence une variabilité génétique significative au niveau intraspécifique de <i>M. polymorpha</i> dans diverses régions du nord Algérien, soulignant l'importance de la conservation et de la gestion durable de cette espèce.</p> <p>Mots clés : <i>Medicago polymorpha</i>, diversité génétique, Algérie, caractères morphologiques, isoenzymes, protéines, microsatellites.</p>	
Laboratoire de recherche : Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales – UFMC 1	
<p>Jury</p> <p>Présidente : M^{me}. MOUSSAOUI S. (MCB – UFM Constantine 1). Encadrante : M^{me}. MEDOUKALI I. (MCB – UFM Constantine 1). Examinatrice : M^{me}. GUENDOUZE A. (MCB – UFM Constantine 1).</p>	