



Université Constantine 1 Frères Mentouri
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biochimie et Biologie cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

**La diversité génétique au sein de l'espèce *Trifolium campestre*
(leguminoaseae), évaluée par les marqueurs enzymatiques et protéiques**

Présenté par : BECHKIT FATIMA ZOHRA

Le : 09 /06/2024

ELGOUACEM YASMINE ZOHRA

Jury d'évaluation :

Président : Mr. KHEDARA A.K. (MCA- U Constantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : M^{me} MEDOUKALI I. (MCB - U Constantine1 Frères Mentouri).

Examinatrice : M^{me} MOUSSAOUI S. (MCB - U Constantine 1 Frères Mentouri)

Année universitaire

2023 – 2024

Remerciements

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

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

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

Nous exprimons toutes nos reconnaissances à M KHEDARA A. pour avoir bien voulu accepter de présider le jury de ce mémoire et d'évaluer notre travail. Trouvez ici l'expression de nos respectueuses gratitude et de nos remerciements pour avoir bien voulu juger ce travail.

Nous tenons à remercier sincèrement avec plus grande gratitude et profonds respects à Mme MOUSSAOUI S. De l'honneur qu'elle nous fait d'avoir acceptée de se joindre à ce jury en tant qu'examinatrice et de nous consacrer son temps.

Nos remercions aussi toute personne qui nous a aidé de près ou de loin afin d'effectuer ce mémoire. Enfin, de peur d'oublier des noms nos remerciements vont à tous nos enseignants qui nous ont soutenu et encouragé durant notre parcours universitaire.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

A mes très chers parents :

A ma très chère mère Boulkroun Noura et mon très cher père BECHKIT Ali :

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

Vos encouragements, vos prières et vos innombrables sacrifices ont été pour moi d'une grande aide. Je vous remercie tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours.

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

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

A mon cher oncle et deuxième père Hacene et mes tantes Fatiha et Houria, qui ont été comme une mère pour moi :

Je ne peux pas exprimer l'affection et l'appréciation que j'ai pour vous. Merci pour tout...

Merci pour vos sacrifices et vos prières. Merci pour votre amour et vos encouragements constants. Que Dieu vous accorde la santé, le bien-être, le bonheur et une longue vie.

A ma jumelle et ma chère sœur Zineb et à mon frère bien-aimé Hamza :

Merci pour votre amour et votre soutien à mon égard. Je vous souhaite à tous les deux une belle vie.

A mes jeunes cousins, Amina, Meriem, Abd El Mouman, Hadjer, Ibrahim à la femme de mon cousin Nawel et à toute ma famille :

Merci pour tout, je vous souhaite une vie heureuse, avec tout mon amour et mon respect

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

fatima

Dédicace

Je dédie ce travail à:

A MON TRÈS CHÈRE PÈRE EL GOUACEM KAMEL

A toi qui m'as tout donné, sans rien demander, à la seule personne au monde qui est toujours avec moi, école de mon enfance ma plus grande fierté et le soleil de ma vie. Pour toi qui été toujours eu les bras ouverts et ton cœur plein d'amour envers moi, je te souhaite tout le bonheur du monde. Merci de m'aider, de m'encourager et de me pousser vers le bonheur que j'ai atteint. Sans vous, rien n'aurait été possible

Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie. Ja t'aime tant papa

A MA TRÈS CHÈRE MÈRE

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur et le symbole de tendresse. Vous êtes l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, puisse Dieu, le tout puissant, vous préserve et vous accorde santé, longue vie et bonheur. Je t'aime tant maman

A mes très chères sœurs

Rayane et Fatima pour leur tendresse, leur complicité et leur présence de me prêter leur épaule quand j'en ai besoin. Merci pour votre amour et votre soutien à mon égard. Je vous souhaite une belle vie.

À mon très cher frère

Sofiane je ne peux exprimer à travers ces lignes mes sentiments d'amour et de tendresse envers toi. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent a jamais. Je te souhaite la réussite dans votre vie avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler je t'aime plus fort.

yasmine

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... **Erreur ! Signet non défini.**

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.Présentation générale des légumineuses	3
2. Présentation du genre <i>Trifolium</i>	5
2.1. Caractères généraux	5
2.2. Taxonomie et génétique	7
2.3. Position systématique.....	8
2.4. Origine et aire de répartition	8
2.5. Caractéristiques botaniques.....	9
2.5.1. Appareil végétatif	9
2.5.2. Appareil floral	10
3. Présentation de l'espèce d'étude <i>T. campestre</i>	10
3.1. Description botanique	10
3.2. Position systématique.....	12
3.3. Origine et distribution éco-géographique.....	12
3.4. Caractéristique de l'espèce.....	13
3.5. Intérêt de l'espèce étudiée	13
4. Diversité génétique	14
5. Marqueurs génétiques	15
5.1. Marqueurs biochimiques	15
5.1.1. Marqueurs enzymatiques.....	16
5.1.2. Marqueurs protéiques	16

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

1.Matière végétale.....	17
2.Méthodes d'étude.....	18
2.1. Analyse enzymatique	18
2.2. Analyse protéique.....	19
2.2.1. Préparation des échantillons	19

2.2.2. Extraction des protéines totales	19
2.2.3. Extraction séquentielle des albumines et des globulines.....	19
2.2.4. Technique d'électrophorèse.....	20
2.3. Analyse des données	22

CHAPIRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION
--

1. Analyse de la diversité génétique des accessions de <i>T. campestris</i>	23
2. Analyses de la diversité enzymatique	23
2.1. Fréquences alléliques des enzymes	25
2.2. Distances génétiques	27
2.3. Classification hiérarchique	29
3. Analyses de la diversité protéique	30
3.1. Diversité des Protéines totales	30
3.1.1. Fractionnement des protéines totales et lecture des profils électrophorétiques	30
3.1.2. Fréquences des protéines totales	32
3.1.3. Distances génétiques	34
3.1.4. Classification hiérarchique.....	36
3.2. Diversité des albumines	37
3.2.1. Fractionnement des albumines et lecture des profil électrophorétiques.....	37
3.2.2. Fréquences des albumines	38
3.2.3. Distances génétiques	40
3.2.4. Classification hiérarchique	42
3.3. Diversité des globulines	43
3.3.1. Fractionnement des globulines et lecture des profils électrophorétiques.....	43
3.3.2. Fréquences des globulines	45
3.3.3. Distances génétiques	47
3.3.4. Classification hiérarchique	49
4. Discussion.....	50
Conclusion générale et perspectives.....	51

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

Liste des abréviations

ALT	Altitude
APS	Solution d'ammonium persulfate
CaCl₂	Chlorure de calcium
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGTA	Ethylène glycol tetraacetic Acid
EST	Estérases
GOT	Glutamate Oxaloacétate Transaminase.
H	Humide
HH	Hyper-Humide.
KDa	Kilo dalton
LAT	Latitude
LON	Longitude
Mg	Milli gramme
Mg Cl₂	Chlorure de magnesium
Min	Minute
NaCl	Chlore de sodium
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
Rpm	Rotation par minute
SA	Semi-Aride
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SH	Subhumide.
TCA	Trichloracétique Acide
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
UI	Micro litre
UPGMA	Unweighted pair group method arithmetic average

Liste des figures

Figure 1 . Classification phylogénique des Légumineuses	3
Figure 2. Classification des légumineuses de la famille des <i>Papilionoideae</i>	4
Figure 3. Présentation morphologique du genre <i>Trifoliums</i>	7
Figure 4. Distribution géographique du genre <i>Trifolium</i>	9
Figure 5. Les trois folioles d'une feuille de <i>Trifolium</i>	9
Figure 6. Diagramme floral du <i>Trifolium</i>	10
Figure 7. Présentation morphologique du genre <i>Trifolium Campestre</i>	11
Figure 1. Zymogramme de système enzymatique GOT pour 23 accessions de l'espèce <i>T. campestre</i> : a) de <i>Tcp1</i> à <i>Tcp15</i> , b) de <i>Tcp16</i> à <i>Tcp23</i> , (T)= Témoin.....	24
Figure 10. Zymogrammes du système enzymatique EST pour les 23 accessions de l'espèce <i>T. campestre</i> : a) de <i>Tcp1</i> à <i>Tcp15</i> , b) de <i>Tcp16</i> à <i>Tcp23</i> , (T)= Témoin. Erreur ! Signet non défini.	
Figure 11. Classification hiérarchique en UPGMA des 23 accessions de <i>T. campestre</i> basée sur le polymorphisme des enzymes (Got-Est) : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe.....	30
Figure 12. Profils électrophorétiques des protéines totales obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes chez 19 accessions de <i>T. campestre</i>	31
Figure 13. Classification hiérarchique en UPGMA des 19 accessions de <i>T. campestre</i> basée sur le polymorphisme des protéines totale.....	36
Figure 14. Profils électrophorétiques des albumines obtenus par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez 22 accessions de <i>Trifolium campestre</i> : a) de <i>Tcp1</i> à <i>Tcp14</i> , b) de <i>Tcp15</i> à <i>Tcp22</i> , (T)= Témoin.	38
Figure 15. Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de <i>T. campestre</i> basée sur le polymorphisme des albumines : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe.	43
Figure 16. Profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez 22 accessions de <i>Trifolium campestre</i> : a) de <i>Tcp1</i> à <i>Tcp14</i> , b) de <i>Tcp15</i> à <i>Tcp22</i> , (T)= Témoin.	44
Figure 17. Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de <i>T. campestre</i> basée sur le polymorphisme des globulines : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe.	49

Liste des tableaux

Tableau 1. Sites des collectes et leurs paramètres bioclimatiques des 23 accessions de <i>T. campestre</i> utilisées dans cette étude.	17
Tableau 2. Matrice présence/absence, fréquences des allozymes des 23 accessions de <i>T. campestre</i>	26
Tableau 3. Distances génétiques basées sur la diversité enzymatique obtenues entre les 23 accessions de <i>T. campestre</i>	28
Tableau 4. Matrice Présence/Absence, fréquences des protéines totales dans les 19 accessions de l'espèce <i>T. campestre</i>	34
Tableau 5. Distances génétiques calculées entre les 19 accessions de l'espèce <i>T. campestre</i> en se basant sur les données des protéines totales.	35
Tableau 6. Matrice Présence/Absence, et fréquences des albumines dans les 22 accessions de l'espèce <i>T. campestre</i>	39
Tableau 7. Distances génétiques obtenues entre les 22 accessions de <i>T. campestre</i> en se basant sur les données des albumines.	41
Tableau 8. Matrice Présence/Absence, et fréquences des globulines dans les 22 accessions de l'espèce <i>T. campestre</i>	46
Tableau 9. Distances génétiques calculées entre les 22 accessions de l'espèce <i>T. campestre</i> . En se basant sur le polymorphisme des globulines.	49

INTRODUCTION

L'Algérie présente une remarquable diversité de climats et d'environnements, engendrée par des variations importantes de température, d'altitude, de pluviométrie, ainsi que de types de sols, tels que leur texture et leur salinité. Cette diversité a favorisé l'émergence d'une grande variété d'espèces végétales utilisées comme fourrage pour le bétail ou comme plantes alimentaires. Nombre de ces espèces poussent de manière naturelle et endémique, tandis que certaines se distinguent par leur grande valeur agronomique. De plus, certaines possèdent des propriétés médicinales (Armani, 2006).

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

Notre étude s'intéresse à l'espèce *Trifolium campestre* qui présente un intérêt agro-économique du fait de son excellente qualité fourragère et de l'enrichissement du sol par sa capacité à fixer l'azote atmosphérique grâce à des bactéries symbiotiques hébergées dans leurs racines (Ellison et al.,2006). Cette espèce, possède une valeur alimentaire exceptionnelle, elle est utilisée comme culture fourragère pour le bétail en particulier pour les animaux de pâturage tels que les bovins et les moutons en raison de sa valeur nutritive. (Burris et Roberts, 1993), aussi, Il s'adapte bien aux mauvaises conditions du sol, ce qui en fait un ajout précieux aux pratiques agricoles (Zatout et al., 1989). *Trifolium campestre* est utilisée pour leur propriété expectorante, analgésique, antiseptique et également pour traiter les douleurs rhumatismales (Beck et al., 2005).

Sa croissance rapide et sa capacité à se propager rapidement lui permettent d'établir une couverture végétale dense. Cela le rend bénéfique pour contrôler les mauvaises herbes dans les champs agricoles ou les zones perturbées (Issolah, 1991). *T. campestre* peut se révéler très intéressant dans l'amélioration des terres de parcours et l'enrichissement des régions marginales notamment celles des zones humides et subhumides (Issolah et Abdelguerfil,1998). Cette espèce de trèfles est le plus fréquemment visitée par les insectes (Issolah, 1991), notamment les abeilles, ce qui contribue à la production de miel.

La description de la diversité génétique à différents niveaux hiérarchiques d'organisations peut grandement bénéficier à la biologie des populations et à la biologie de l'évolution. Cette discipline contribue à un concept intégré de la conservation de la

biodiversité. Ainsi, l'information génétique est devenue un outil important pour l'étude de la variabilité génétique, et aussi pour la biologie de la conservation, au même titre que les considérations écologiques, éthiques et économiques.

L'amélioration des plantes est basée sur l'utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiables de cette diversité dans les programmes de sélection (Eagles et al., 2001 ; Dekker et Hospital, 2002). Les marqueurs enzymatiques et protéiques directement issus du polymorphisme, sont utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'améliorations des plantes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la diversité génétique au sein de 23 accessions de l'espèce *T. campestre*, qui sont prélevés dans différentes régions éco-géographiques dans le Nord Algérien, par des marqueurs enzymatiques (estérases et glutamate oxaloacétate transaminase) on se basant sur la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) et protéiques (protéine totale, albumines et globulines) pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Notre étude se structure en trois chapitres distincts. Le premier chapitre consiste en une revue bibliographique, abordant de manière générale les légumineuses, avec un focus particulier sur le genre *Trifolium* et notamment sur l'espèce *T. campestre*. Cette section offre également un aperçu de la diversité génétique ainsi que des marqueurs enzymatiques et protéiques.

Le deuxième chapitre détaille le matériel biologique utilisé ainsi que l'ensemble des méthodes employées dans notre étude.

Les résultats sont ensuite analysés et discutés dans un troisième chapitre. Enfin, une conclusion générale ainsi que des perspectives sont fournies.

Revue
Bibliographique

1.Présentation générale des légumineuses

Les légumineuses appartiennent à la famille des Fabacées et représentent un groupe de plantes à fleur constituant les familles les plus abondantes et diversifiées. Elles sont classées parmi les Angiospermes, dicotylédones (Tourene, 2018). Il s’agit de la troisième plus grande famille des plantes supérieure en nombre d’espèces (après les Orchidaceae et les Asteraceae), avec environ 750 genres (Polhill *et al.*, 1981) et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.*, 2006), et la deuxième plus importante pour les pâturages d’intérêt agricole, après les Poacées (graminées) qui incluent la canne à sucre et les céréales tels le maïs, le riz, le blé, l’orge, l’avoine, le seigle et le millet (Young *et al.*, 2003).

La famille des légumineuses a une origine monophylétique qui en se basant sur les caractères morphologiques des fleurs était, traditionnellement, répartie en trois sous-familles, les *Caesalpinioideae*, les *Mimosoideae* et les *Papilionoideae*.

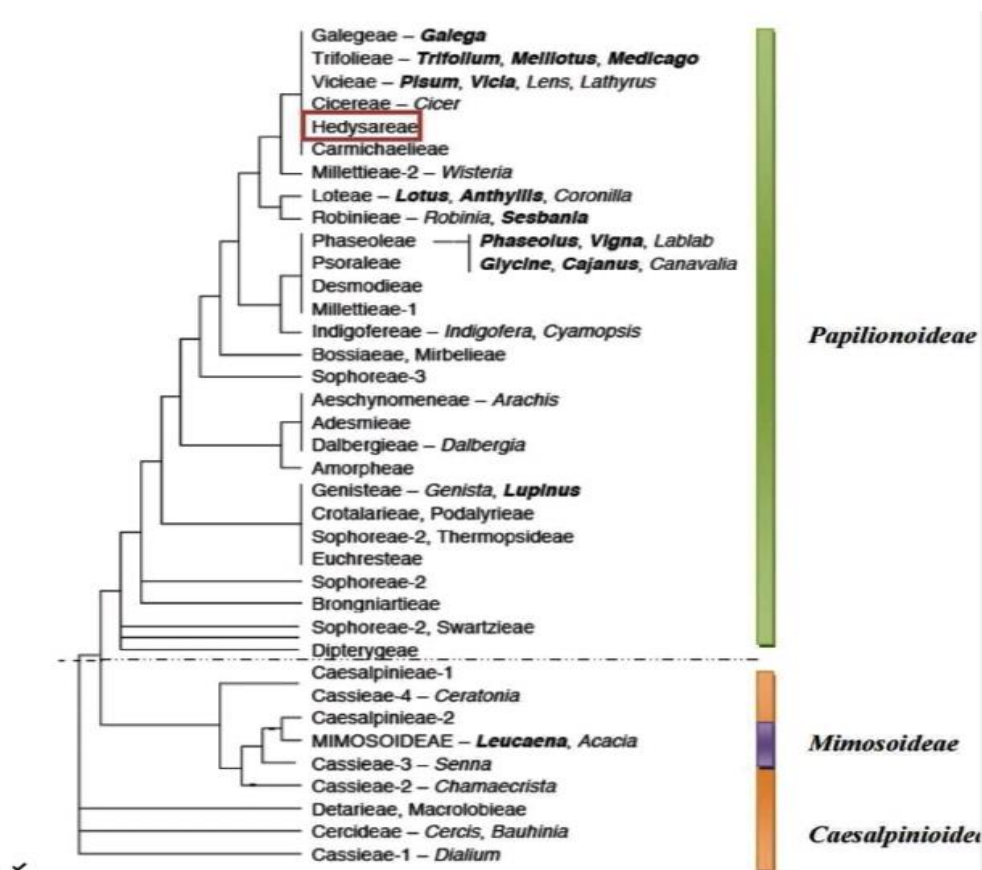


Figure 2 . Classification phylogénique des Légumineuses (Doyle et al., 1998).

Les *Papilionoideae* : représente la plus grande sous-famille des Fabacées avec environ 14000 espèces regroupées dans 503 genres (Azani et al., 2017).

Cette appellation est due à la forme de la corolle qui se présente sous forme de « papillon » (Guignard et Dupont, 2005). La sous-famille monophylétique des *Papilionoideae* renferme plus des deux tiers des espèces et inclut presque toutes les légumineuses économiquement importantes (Sprent 1995) : le soja (*Glycine max*, $2n = 4x = 40$), le haricot (*Phaseolus vulgaris*, $2n = 2x = 22$), le pois (*Pisum sativum*, $2n = 2x = 14$), la luzerne (*Medicago sativa*, $2n = 4x = 32$), l'arachide (*Arachis hypogaea*, $2n = 4x = 40$), le pois chiche (*Cicer arietinum*, $2n = 2x = 16$), et la fève (*Vicia faba*, $2n = 2x = 16$). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés Galegoides et Phaseoloides (Fig.2), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des *Aeschynomeneae* (Broughton et al., 2003).

Les Papilionoideae sont utilisées pour la production des graines alimentaires (pois, haricot...), pour l'alimentation du bétail, sous forme de fourrage (luzerne, sainfoin, trèfle...), le soja est utilisé sur une large échelle dans l'élevage industriel.

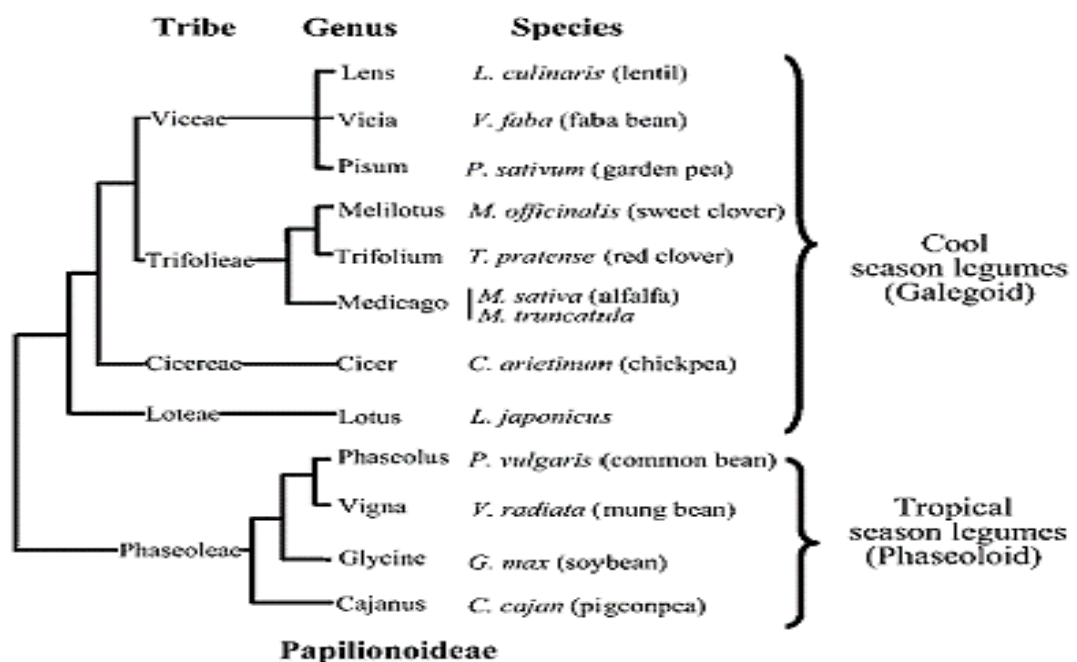


Figure 3. Classification des légumineuses de la famille des *Papilionoideae* (Zhu et al., 2005).

Les Mimosoideae : Ce sont pour la plupart des arbres tropicaux avec environ 3000 espèces regroupées dans 77 genres ex : *Mimosa*, *Acacia* (Cannon, 2008). Leurs fleurs sont régulières, petites, groupées souvent sous forme de pompons. Les étamines sont les parties les plus visibles de la fleur (Judd *et al.*, 2001).

Les Caesalpinoideae : considérée comme la plus primitive, compte environ 2 800 espèces (Azani *et al.*, 2017). Ce sont majoritairement des arbres ou des arbustes tropicaux ou subtropicaux. Leur fleur irrégulière possède 5 pétales non différenciés et des étamines visibles à l'extérieure (Judd *et al.*, 2001).

En effet les légumineuses jouent des rôles très importants dans différents domaines :

- Les légumineuses améliorent les pratiques agricoles et contribuent au maintien de la fertilité des sols par l'accumulation des concentrations importantes d'azote dans leurs tissus (Simon, 2005).
- Elles constituent une importance alimentaire pour les humains (soja, haricot, pois chiche...) et les animaux (*luzerne, Trèfle, fenugrec...*), là où c'est une source essentielle en une variété de nutriments de base (Protéines, vitamines, glucides et des fibres, éléments minéraux, zinc, magnésium et la matière grasse).
- Les légumineuses sont une source très importante de matières premières pour l'industrie, notamment pour la fabrication de dérivés alimentaires tels que les huiles, les farines et les conserves, ainsi que pour la fabrication de produits cosmétiques et pharmaceutiques (Lee *et al.*, 2007).
- Les légumineuses jouent un rôle crucial à la fois sur le plan écologique et agricole, car elles sont responsables d'une partie du flux d'azote atmosphérique N₂ vers des formes fixées comme l'ammoniac, le nitrate et l'azote organique (Sobti *et al.*, 2015).
- Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques (Raven *et al.*, 2000).

2. Présentation du genre *Trifolium*

2.1. Caractères généraux

Le genre *Trifolium* communément appelé *Trèfle*, vient du mot latine (tri=trois + filium = feuille) comprend des plantes herbacées appartenant à la famille des Fabacées (légumineuse). Qui se caractérisent par Leurs feuilles composées à trois folioles, et Leurs fleurs groupées en têtes sous forme de grappe ou de capitule, de couleur variable selon

les espèces (blanche, rose, rouge, pourpre, jaune, etc.) (Zohary et Heler, 1984 ; Gillet et Taylor, 2001) (Fig.3).

Le genre *Trifolium* renferme environ 290 espèces réparties à travers les régions tempérées et subtropicales mais principalement dans les régions tempérées du nord (Clapham et al., 1962).

Le genre *Trifolium* caractérise aussi par leurs capacités de fixer l'azote atmosphérique grâce à des bactéries symbiotiques hébergées dans leurs racines (Ellison et al., 2006). Ce qui les rend utiles pour l'enrichissement des sols et l'alimentation des ruminants.

Cette plante est très souvent utilisée comme engrais vert. On sème le trèfle sur une parcelle qui vient d'être labourée. Une fois la plante mature, on la retourne dans la terre pour l'enrichir et l'aérer, particulièrement dans le cas de sol pauvre, caillouteux ou argileux (Williams et al., 1990). Pour les animaux, la plante est utilisée comme fourrage pour le pâturage ou comme foin sec, et ils fournissent non seulement des protéines de haute qualité, mais aussi une variété de molécules biologiquement actives telles que des vitamines, et d'autres nutriments (Burriss et Roberts, 1993).

Ce genre comporte un grand nombre d'espèces annuelles et pérennes (environ 255 espèces) que sont bien adaptées à la croissance dans différentes régions agroécologique (principalement dans les régions tempérées et méditerranéennes) et utilisé fréquemment comme plante fourragère (Zohary et Heler, 1984 ; Gillet et Taylor, 2001).

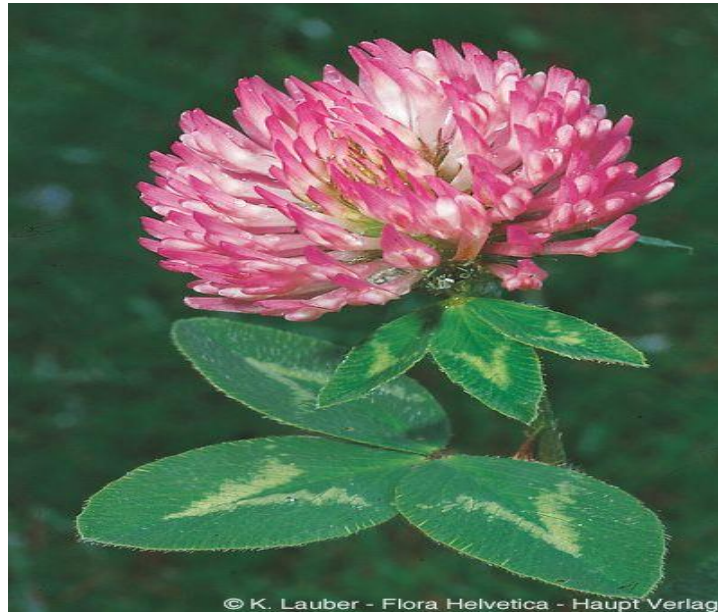


Figure 4. Présentation morphologique du genre *Trifolium* (konarad, 2012).

2.2. Taxonomie et génétique

Comme les autres grands genres de la famille des légumineuses (e.g. *Astragalus*, *Indigofera* et *Mimosa*), une spéciation dans le genre *Trifolium* est accompagnée par une diversification des structures liées à la dispersion des graines. Contrairement à ces genres, les fruits du trèfle sont assez invariables, mais la corolle et le calice sont plus variables et responsables de la diversité des mécanismes de dispersion (Zohary, 1972). Cette diversité florale a conduit à des propositions classiques (Presl, 1831) et récentes pour diviser le genre *Trifolium* en séries de genres plus petits (Hendrych 1976 ; 1978 ; Khokhrjakov, 1998 ; Roskov, 1990 ; Soják, 1986 ; see also Small, 1987). Presl en 1831 reconnut 9 sections, dont la majorité sont encore retenues aujourd'hui, mais certaines sous des noms différents.

Dans une classification des espèces en fonction de la morphologie, les taxons ont été divisés en 8 sections (Zohary et Heller, 1984). Ces sections ont été nommées : Lotoidea, Ces sections ont été nommées : Lotoidea, Paramèses (C. PRESL), Mystillus (C. PRESL), Vesicaria, Chronosemium, *Trifolium*, Tricocephalum Koch et Involucrarium Hooker. Six sections sur ces 8 ont été limitées à l'Ancien Monde ou l'Eurasie et certaines s'étendent à l'Afrique. Seule la section *Involucrarium* a été distribuée dans le Nouveau Monde, dans le Nord et le sud d'Amérique (Zohary et Heller, 1984 ; Steiner *et al.*, 1997).

Les nombres chromosomiques dans le genre *Trifolium* sont connus pour au moins 184 espèces (résumées dans Taylor et al., 1979 ; Zohary et Heller, 1984 ; voir également Goldblatt et Johnson, 2003). Plus de 80% des espèces examinées ont $2n = 16$ et $x = 8$ est le nombre de base déduit du genre (Goldblatt, 1981). L'aneuploïdie ($2n=10, 12$ ou 14) est connue de 31 espèces, Dont 11 à la fois aneuploïdes et diploïdes ($2n= 16$) ou dénombrements polyploïdes.

2.3. Position systématique

Règne : *Planta*

Embranchement : *Spermatophyte*

Sous embranchement : *Angiospermes*

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

Sous classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabacée*

Genre : *Trifolium*

2.4. Origine et aire de répartition

La distribution native de *Trifolium* englobe les régions tempérées et, dans une moindre étendue, les régions subtropicales des hémisphères Nord et Sud. Il est particulièrement fréquent dans l'hémisphère Nord. Les principaux centres se trouvent en Eurasie (150-160 espèces), en Amérique du Nord (60-65 espèces) et en Afrique (25-30 espèces) (Zohary et Heller, 1984). Les espèces de *Trifolium* se produisent dans un large éventail d'habitats, y compris les pâturages, les prairies, les forêts ouvertes, les régions semi-désertiques, les montagnes et les sommets des Alpes. Une caractéristique commune de ces habitats divers est la haute radiation solaire ; peu d'espèces de trèfle tolèrent l'ombre (Ellison *et al.*, 2006) (Fig.4).



Figure 5. Distribution géographique du genre *Trifolium* (Medoukali, 2016).

Le bassin méditerranéen, le Nord-Ouest de l'Amérique et les hauts plateaux de l'Est d'Afrique sont les trois régions géographiques qui présentent la plus grande diversité des espèces du genre *Trifolium* (Zohary et Heller, 1984). Des travaux récents soutiennent l'origine méditerranéenne du genre dans la période du Miocène précoce (Ellison *et al.*, 2006). Les trèfles autochtones sont absents dans le Sud-est de l'Asie et en Australie.

2.5. Caractéristiques botaniques

2.5.1. Appareil végétatif

Toutes les espèces sont des plantes herbacées annuelles, bisannuelles ou vivaces. Souvent prostrées et rarement de plus de 50 cm de hauteur. En général, les espèces annuelles sont auto-fertiles et les plantes vivaces auto-incompatibles. Les feuilles sont généralement à trois folioles (parfois quatre), et sont à l'origine du nom de la plante, ces folioles sont presque toujours dentées, parfois maculées en leur centre (Fig.5) (Ellison *et al.*, 2006).



Figure 6. Les trois folioles d'une feuille de *Trifolium* (Frank, 2007).

2.5.2. Appareil floral

L'inflorescence comporte de nombreuses fleurs de taille petite à moyenne (environ 0.3- 2.5 cm), groupées en têtes sous forme d'une grappe, et qui ressemble soit à un capitule en boule, soit à un épi. Les pédoncules s'alignent en étages serrés le long de l'extrémité de la tige. Le calice de la fleur compte cinq dents, avec une corolle typique des Fabacées (étendard, ailes et carène), avec des ailes plus longues que la carène et un étendard érigé généralement recourbé vers le haut dans la majorité des espèces. L'androcée est diadelphie (étamines assemblées en deux groupes). Les fruits sont des petites gousses à l'intérieur du calice, contenant d'une à quatre graines (Ellison *et al.*, 2006) (Fig.6).

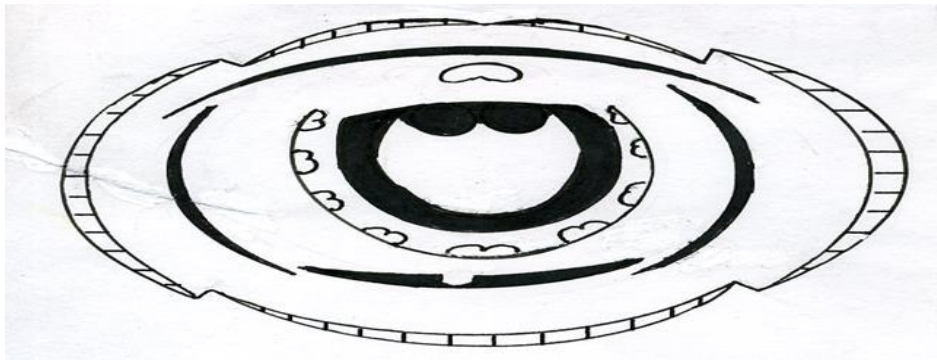


Figure 7. Diagramme floral du *Trifolium* (Lokil, 2008).

3. Présentation de l'espèce d'étude *T. campestre*

Le *Trifolium campestre* (*Trèfle champêtre*), aussi appelé *Trèfle couché* ou *Trèfle jaune*, est une plante herbacée basse, annuelle, parfois bisannuelle, appartenant au genre trifolium et à la famille des Fabacées (ou légumineuses).

3.1. Description botanique

Le *Trifolium campestre*, ou *Trèfle des champs*, est une plante annuelle qui varie en taille de 5 à 50 cm. Elle se caractérise par une tige pubescente, robuste, qui peut être droite ou ascendante. Les feuilles supérieures sont disposées de manière alterne le long de la tige. Chaque feuille est composée de trois folioles, qui sont obovales et ressemblent à un coin, avec des bords denticulés. La foliole terminale est distincte car elle est attachée par un petit pétiole (pétiolulée).

Les stipules, qui sont les structures à la base de chaque feuille, ont une forme ovale-lancéolée et sont dilatées à leur base, mais restent plus courtes que le pétiole de la feuille.

Les fleurs du *Trèfle des champs* sont remarquables pour leur couleur jaune doré qui, avec le temps, vire au roussâtre. Elles sont regroupées en têtes florales assez grosses, ovales et serrées, comptant entre 20 et 40 fleurs. Les pédoncules, qui sont les tiges des fleurs, sont assez raides et s'étendent au-delà des feuilles.

L'étendard, qui est la partie supérieure de la fleur, est fortement strié et aplani sur le dos, prenant une forme courbée semblable à une cuillère. Il est nettement plus long que les ailes, qui sont les parties latérales de la fleur et qui tendent à diverger.

Enfin, le style de la fleur est 3 à 4 fois plus court que la gousse, qui est portée sur un petit support (stipitée) (Fig.7) (Vescovi,1978).



Figure 8. Présentation morphologique du genre *Trifolium Campestre* (Fabre,2013).

3.2. Position systématique

Règne : *Plantae*

Sous-règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille : *Faboideae*

Genre : *Trifolium*

Espèce : *T. campestre*

3.3. Origine et distribution éco-géographique

Trifolium campestre est originaire d'Eurasie et d'Afrique du Nord. Cette plante s'est répandue dans la plupart des régions tempérées du monde. Aux États-Unis, cette plante est commune de la Floride à l'est du Texas. Le *Trèfle* à houblon, mieux connu sous le nom de *trèfle des champs* dans certaines régions, a été trouvé autour des pentes du Pacifique et est commun en Californie (Zohary et Heller, 1984).

Ce trèfle est commun dans presque toute l'Europe. C'est plante annuelle, parfois bisannuelle, poussant en plaine et en altitude jusqu'à 1 400 mètres, à l'exception des régions les plus froides (Rdonald,2020).

Le *Trifolium campestre* peut être trouvé dans les prés, le long des frontières des champs, des pelouses, des bords de routes, des lieux de déchets, et surtout dans les pâturages de repos. Il est plus facile à trouver au printemps, quand il prospère le plus (Foote et Duncan 1975).

3.4. Caractéristique de l'espèce

- La période de floraison du *Trifolium campestre* s'étend de mai à septembre (Vescovi, 1978).

- *Trifolium campestre* est rencontrée au sein des pâturages et des broussailles (Quezel et Santa, 1962).

- Ce Trèfle est plus fréquent sous les fortes pluviométries, aux faibles altitudes, sur les sols peu à moyennement calcaires, semble préférer les sols légèrement acides ou neutres à légèrement basiques et devient moins fréquent quand la salinité augmente (Zatout et al., 1989).

- Il supporte l'eau stagnante (Lapeyronie, 1982) et se ressème naturellement si on le laisse venir à graines (Foury, 1954).

- *T. campestre* est une plante mellifère à nectar très sucré (Foury, 1954), parmi les espèces de trèfles les plus fréquemment visitées par les insectes (Issolah, 1991).

- Cette espèce prospère dans les régions tempérées et ne se porte pas aussi bien dans les climats secs ou chauds et humides (Edsall, 1985).

- Peut être coupé 2 ou 3 fois pendant la saison de croissance, avec des intervalles de coupe optimaux de 6 à 9 semaines dans les champs irrigués, permettant des rendements allant jusqu'à 12-15 tonnes par hectare.

3.5. Intérêt de l'espèce étudiée

- Culture fourragère : Elle est utilisée comme culture fourragère pour le bétail en particulier pour les animaux de pâturage tels que les bovins et les moutons en raison de sa valeur nutritive (Burris et Roberts, 1993).

- Amélioration des sols : Cette plante est un fixateur d'azote, ce qui signifie qu'elle a la capacité de prendre l'azote de l'atmosphère et de le convertir en une forme qui peut être utilisée par les plantes. L'azote est un nutriment essentiel pour la croissance des plantes, et avoir une plante fixatrice d'azote comme le trèfle jaune dans le sol peut aider à reconstituer les niveaux d'azote. Ceci est particulièrement utile dans les sols pauvres où l'azote peut être limité (Ellison et al., 2006).

- l'enrichissement des régions : *T. campestre* peut se révéler très intéressant dans l'amélioration des terres de parcours et l'enrichissement des régions marginales notamment celles des zones humides et subhumides (Issolah et Abdelguerfil, 1998).

- Suppression des mauvaises herbes : Le *Trèfle* jaune a également la capacité de surpasser d'autres mauvaises herbes et plantes, ce qui le rend utile pour la suppression des mauvaises herbes. Sa croissance rapide et sa capacité à se propager rapidement lui permettent d'établir une couverture végétale dense, ce qui peut aider à prévenir la croissance d'autres plantes indésirables. Cela le rend bénéfique pour contrôler les mauvaises herbes dans les champs agricoles ou les zones perturbées (Issolah, 1991).

- Ce trèfle est utilisée pour ses propriétés expectorantes, analgésiques, antiseptiques et également pour traiter les douleurs rhumatismales (Beck et al., 2005).

- *T. campestre* est une plante mellifère à nectar très sucré (Foury, 1954). Cette espèce de trèfles est le plus fréquemment visitée par les insectes (Issolah, 1991).

- Adaptabilité : Il s'adapte bien aux mauvaises conditions du sol, ce qui en fait un ajout précieux aux pratiques agricoles (Zatout et al., 1989).

- Lutte contre l'érosion du sol : En tant que couverture du sol, elle peut aider à prévenir l'érosion du sol dans les zones perturbées (Bates, s.d).

- Esthétique : Ajoute une touche de couleur avec ses inflorescences jaunes, ce qui peut être esthétiquement agréable.

4. Diversité génétique

La biodiversité a été remarquée dès l'Antiquité. Lorsqu'on observe le monde vivant, on constate que les êtres sont différents les uns des autres (Gouyon, 1994). La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes. C'est la variation de la quantité d'information génétique des individus, des populations, des espèces, des assemblages ou des communautés. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité (Parizeau, 1997). C'est la diversité intra-spécifique (polymorphisme génétique) qui représente le potentiel et la capacité à répondre aux changements environnementaux, à la fois sur le court terme (faculté d'adaptation) et sur le long terme (potentiel d'évolution). La richesse des espèces est la mesure d'évaluation de la biodiversité la plus largement utilisée (Lewin, 1992).

Dans l'agriculture, la diversité génétique est exploitée pour créer des variétés adaptées à différents environnements et conditions de croissance. L'aptitude de telle ou telle variété à résister à la sécheresse ou à l'inondation, à se développer sur un terrain pauvre ou riche, à résister à de nombreuses espèces d'insectes ravageurs ou maladies, à fournir des produits riches en protéines ou ayant de meilleures qualités gustatives, est un caractère transmis par les gènes. Ces ressources génétiques sont la matière première qu'emploient les sélectionneurs de plantes et les spécialistes de la biotechnologie pour produire de nouvelles variétés. Sans cette diversité, nous ne pourrions plus adapter les cultures à l'évolution constante des besoins et des conditions (Cronk, 2001).

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

5. Marqueurs génétiques

Selon de Vienne (1998) un marqueur génétique c'est un marqueur polymorphe qui est renseigne sur : le génotype de l'individu qui le porte (en génétique les populations), le génotype d'un (de) locus voisin(s) (les applications vont ici du clonage positionnel à la sélection assistée Par marqueur). Les plus courants de ces marqueurs génétiques sont : les marqueurs morphologiques, moléculaires (au niveau de l'ADN), et biochimique.

On utilise le terme polymorphisme pour désigner l'existence d'une variation discontinue (chaque type étant un morphe) au sein d'une population (Harry, 2001). À l'intérieur d'une population les individus ont un génotype légèrement différent. Ce polymorphisme génétique peut être quantifié sous forme de fréquences alléliques qui sont variables d'une population à l'autre et peuvent évoluer dans le temps (L'évêque et Mounoulou, 2001).

5.1. Marqueurs biochimiques

Les marqueurs biochimiques (protéines, isoenzymes...) sont des éléments génétiques issus de l'expression biochimique des gènes, apparus vers 1970, et sont déterminés non seulement par les gènes mais souvent par l'état de développement physiologique ainsi que par l'organe et le milieu où il se trouve (Manson, 2004).

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

5.1.1. Marqueurs enzymatiques

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

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

5.1.2. Marqueurs protéiques

Les protéines consistent en un mélange complexe des protéines extractibles (variable selon le protocole suivi) présente au moment du prélèvement dans les tissus analysés (Prat et *al.*, 2006). La séparation électrophorétique des protéines solubles est largement exploitée pour mettre en évidence les polypeptides caractéristiques d'un individu (Riousset, 2001) l'analyse de leur polymorphisme a constitué une nouvelle approche dans la classification des individus et par là dans l'identification et la différenciation des organismes (Prat et *al.*, 2006).

Les protéines de réserve représentent un outil macromoléculaire d'une haute importance, en effet sont utilisées comme marqueurs biochimiques, en biotechnologie végétale permettant ainsi : l'identification des variétés et des espèces végétales, l'étude de la variabilité et du polymorphisme génétique inter et intra spécifique, l'étude des protéines donne un accès direct vers la génomique, ce qui permet de cibler les molécules et les gènes d'intérêt.

*Matériel et
Méthodes*

1.Matière végétale

Notre étude est menée sur des graines matures de 23 accessions d'une espèce du genre *Trifolium* (*T. campestre*). Ces accessions ont été collectées dans 23 sites éco-géographiques représentant une large gamme des étages bioclimatiques dans le Nord Algérien (Fig.8). Cette collection a pour avantage le fait que les sites prospectés présentent différents climats et subissent des contraintes abiotiques diverses (Tableau 1).

Les principales caractéristiques de chaque site ALT, LAT, LON sont détaillées dans le tableau 1.

Tableau 1.Sites des collectes et leurs paramètres bioclimatiques des 23 accessions de *T. campestre* utilisées dans cette étude.

N°	GENRE	SP	REGION	PROVENANCE	ALT	LAT	LON	CLIMAT
Tcp1	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Skikda	Oued righa	32	36°53'46,84"N	7°03'56,20"E	SA
Tcp2	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	HH
Tcp3	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	SH
Tcp4	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Sidi bel Abbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"O	SA
Tcp5	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E	H
Tcp6	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Tizi Ouzou	-	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E	HH
Tcp7	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Ain Defla	-	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	H
Tcp8	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E	SH
Tcp9	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Annaba	-	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E	H
Tcp10	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Constantine	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E	SH
Tcp11	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E	SH
Tcp12	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Constantine	Chaab ernessas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	SH
Tcp13	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Mila	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	HH
Tcp14	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Mila	Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E	HH
Tcp15	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E	H
Tcp16	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Bejaia	-	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E	HH
Tcp17	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Alger	Mohammadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E	H
Tcp18	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Alger	Ben Aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E	HH
Tcp19	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E	H
Tcp20	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Boumerdes	-	20	36°44'52,57"N	3°41'42,29"E	H
Tcp21	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Jijel	Parc animalier	21	36°47'26,38"N	5°39'46,16"E	H
Tcp22	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Jijel	Boughdir	132	36°47'56,92"N	5°42'56,70"E	H
Tcp23	<i>Trifolium</i>	<i>campestre</i>	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O	SA

ALT : Altitude, LAT : Latitude, LON : Longitude, HH : Hyper-humide, H : Humide, SH : Subhumide, SA : Semi-aride.



Figure 9. Localités géographiques des 23 accessions de l'espèce *T. campestris* dans le Nord Algérien.

2.Méthodes d'étude

2.1. Analyse enzymatique

Vingt-trois accessions de *T. campestris* ont été évaluées pour deux systèmes enzymatiques : la glutamate oxaloacétate transaminase (GOT) et les estérases (EST) (Weeden et Wendel, 1990).

Les graines de chaque accession ont été mises à germer (protocole de germination disponible en annexe 1) et les enzymes ont été extraites à partir des feuilles de plantules âgées de 15 jours en utilisant le processus de Bendiab et al.,1993.

Pour cela, 0,25 g de feuilles ont été broyées avec 1 ml de tampon TAMET, pH 7, contenant du Tris 0,5 M, de l'acide ascorbique 0,3 M, du mercaptoéthanol à 2 %, de l'EDTA Na₂ à 0,01 M, du triton x100 à 0,8 % et du PVP à 10 %. Ensuite, la centrifugation a été réalisée pendant 7 minutes à 9000 Rpm pour obtenir la fraction contenant les enzymes (le surnageant).

La séparation des enzymes a été effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) selon la méthode décrite par Singh et al.,1991. Des gels à 10 % de polyacrylamide ont été utilisés pour l'analyse de l'EST, tandis que le système GOT nécessitait un gel de polyacrylamide à 7 %. L'électrophorèse a été réalisée à 40 mA

pendant 3 heures à 4 °C. Enfin, les gels ont été colorés selon les méthodes décrites par Bendiab et al.,1993.

2.2. Analyse protéique

2.2.1. Préparation des échantillons

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

2.2.2. Extraction des protéines totales

10 mg de farine contenue dans des tube d'Eppendorf est mélangé à environ 300 µl d'une solution de 12.5 % de tampon Tris HCL ph 6.8 (v/v), 24.1 % eau distillée (v/v), 4 % de SDS (p/v), 0.02 % de bleue de bromophenol (p/v) et 20 % de glycérol (v/v). Après 60 min d'agitation, les échantillons sont incubés à une température de 65°C pendant 30 min, puis centrifugés à vitesse maximale pendant 2 min à 4°C. Le surnageant est récupéré comme solution contenant la fraction des protéines totales.

2.2.3. Extraction séquentielle des albumines et des globulines

Le protocole d'extraction des albumines et des globulines à partir de chaque échantillon a été développé en se basant sur la méthode de Franco et al., 1997, avec des ajustements spécifiques effectués en laboratoire. Ce processus implique plusieurs étapes décrites ci-dessous :

A. Délipidation de la farine

10 mg de farine sont placés dans des tubes Eppendorf, où ils sont mélangés avec environ 300 µl de n-hexane. Suite à une agitation durant 30 minutes à température ambiante, le mélange est soumis à une centrifugation. Par la suite, le n-hexane contenant dans le surnageant est évacué, décanté et le culot est séché.

B. Extraction des albumines

Le résidu de délipidation est mélangé avec 250 µl d'une solution d'eau distillée à pH 8, contenant 10 mM de CaCl₂, 10 mM de MgCl₂ et 1 mM de PMSF, puis agité pendant 30 minutes à 4°C. Ensuite, il est centrifugé à vitesse maximale pendant 20 minutes à 4°C. Le culot de centrifugation est soumis deux fois à l'extraction comme précédemment. Le liquide surnageant est récupéré en tant que solution contenant la fraction des albumines.

C. Extraction des globulines

Le résidu de l'extraction des albumines est mélangé avec 250 µl d'une solution contenant 0,1 M de Tris-HCl à pH 8, avec 10 % (p/v) de NaCl, 10 mM d'EDTA, 10 mM d'EGTA et 1 mM de PMSF. Après agitation à 4°C pendant 30 minutes, le mélange est centrifugé à vitesse maximale pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré comme solution contenant la fraction globulines.

D. Préparation des extraits pour l'électrophorèse

Les deux fractions extraites ont été précipitées en y ajoutant de l'acétone froide. Après une heure de contact à -20°C, les protéines précipitées ont été séparées du surnageant par centrifugation à 10 000 Rpm pendant 15 min puis à portées 37°C pendant 15 min. Les culots protéiques ont été mis en suspension dans 100 µl de tampon de charge Tris-HCl à pH 6,8, contenant 2 % de SDS, 40 % de glycérol et 0,02 % de bleu de bromophénol. Les échantillons ont été brièvement agités avant d'être incubés à 65°C pendant 30 minutes pour permettre la complexation du SDS, puis soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) avec 15 µl par puits.

2.2.4. Technique d'électrophorèse

La technique d'électrophorèse employée est basée sur la méthode de Laemmli, 1970 avec des ajustements introduits par Singh et al., 1991. Elle implique une séparation sur gel vertical selon un système discontinu, en présence de SDS comme agent anionique dénaturant, et sans agents réducteurs.

A. Principe

L'électrophorèse, une technique datant des années 1930, permet de séparer les composants d'un mélange protéique sous l'influence d'un champ électrique. Cette méthode tire parti de la nature amphotère des protéines, dues à la présence de groupes amine et carboxyle dans leur structure moléculaire. À un pH supérieur à leur pHi moyen (généralement entre 8,2 et 8,6), les protéines portent toutes une charge négative, agissant comme des anions en raison de l'ionisation des groupes carboxyle des acides aminés dicarboxyliques (comme la glutamine et l'acide aspartique). Sous l'effet du champ électrique, elles se déplacent vers l'anode (+). La vitesse de migration des protéines dépend de plusieurs facteurs, notamment :

- La charge électrophorétique nette des protéines à un pH donné.
- Les dimensions et la structure des protéines.

- L'intensité du champ électrique (la tension appliquée aux électrodes, la conductivité du support).
- La taille des pores du support solide.
- La force ionique du tampon utilisé.
- La température de l'électrolyte.

B. Préparation des gels

Le nettoyage des plaques de verre utilisées comme moule pour la polymérisation des gels se fait à l'éthanol. Ensuite, ces plaques sont assemblées avec deux entretoises d'une épaisseur de 1,5 mm chacune. Le support d'électrophorèse se compose d'un gel de séparation à $T1 = 12,58 \%$ et $C2 = 0,97 \%$, et d'un gel de concentration à $T = 2,88 \%$ et $C = 1,42 \%$. Ces gels sont préparés à partir d'acrylamide à 40% (p/v), de N, N'-méthylène bisacrylamide à 2% (p/v) et de Tris-HCl 1M, tamponnés à pH 8,8 pour le gel de séparation et à pH 6,8 pour le gel de concentration. Ils sont polymérisés en présence de TEMED et d'APS.

Le gel de séparation est préparé en premier, mélangé soigneusement puis coulé entre deux plaques de verre, en laissant un espace de 4 cm pour le gel de concentration. Une fine couche de butanol est ajoutée pour niveler le gel et le protéger de l'air. La polymérisation se fait à température ambiante pendant environ 45 minutes. Ensuite, le gel de concentration est préparé, bien mélangé puis coulé, et des peignes à 15 puits sont rapidement insérés.

Après la polymérisation du stacking gel qui s'effectue en plus de 60 minutes, les peignes sont enlevés en obtenant ainsi des puits servant pour les dépôts des extrais protéiques, les puits sont remplis avec du tampon avant le dépôt des échantillons.

C. Tampon d'électrophorèse

Une fois les échantillons déposés, la cuve d'électrophorèse est remplie avec un volume adéquat de tampon de migration composé de Tris 25 mM à un pH de 8,3, contenant $1,4 \%$ (p/v) de glycine et $0,1 \%$ (p/v) de SDS.

D. Conditions de migration

La cuve est maintenue à une température d'environ 4°C grâce à un système de refroidissement connecté à celle-ci. Pour une cuve comportant deux gels de dimensions $180 \times 160 \times 1,5$ mm chacun, la migration est réalisée à une intensité de courant de 80 mA avec une tension maximale de 1200 V.

E. Fixation, coloration et décoloration

Après que le front de migration est sorti, le gel de concentration est retiré et les gels sont démoulés. Ensuite, ils sont placés dans des bacs contenant une solution comprenant de l'acide trichloracétique (TCA) à 60 %, un agent de fixation des protéines, ainsi que du bleu de Coomassie R-250, un colorant. Les bacs sont agités pendant 24 heures. Enfin, les gels sont décolorés à l'eau du robinet.

2.3. Analyse des données

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

*Résultats et
Discussion*

Notre travail consiste à l'étude de la diversité génétique de 23 accessions de l'espèce *T. campestre* par les marqueurs protéiques (protéines totales, globulines, albumines) et enzymatiques (GOT et EST). Pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse décrite par Singh et al., 1991, en conditions non dénaturantes (PAGE) pour les enzymes et en conditions dénaturantes non réductrices (SDS-PAGE) pour les protéines.

1. Analyse de la diversité génétique des accessions de *T. campestre*

L'analyse des diagrammes électrophorétiques met en évidence des différences entre les 23 accessions de *T. campestre*. L'ensemble des mobilités relatives des bandes ont été exploité pour l'établissement des matrices fondées sur un caractère qualitatif (présence (1) et absence (0) de toutes les bandes examinées. Ces matrices représentent les configurations des protéines totales, des albumines et des globulines ainsi que des enzymes (GOT et EST), et permettent de conserver une image réelle des gels. Elles peuvent aussi servir comme base de données pour l'établissement d'un catalogue et ont de ce fait une application directe dans l'identification.

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

2. Analyses de la diversité enzymatique

L'analyse enzymatique nous a permis d'estimer la diversité génétique au sein de l'espèce *T. campestre*. Les figures (9 et 10) représentent les zymogrammes des systèmes enzymatiques GOT et EST analysés sur les 23 accessions de l'espèce *T. campestre* collectés dans le Nord Algérien.

L'interprétation des isoenzymes a été faite suivant le caractère "présence-absence" et non par une approche allélique. Les profils isoenzymatiques sont lus comme suit : chaque bande est codée par un numéro en commençant par la bande la plus lente (notée 1).

L'étude des profils enzymatiques des deux systèmes enzymatiques a permis de dénombrer, six allozymes pour la GOT, localisés dans deux zones d'activité bien distinctes (Got1 et Got2) (Fig.15), Tandis que, 10 allozymes ont été enregistrés pour les estérases (Fgi.16), répartis en trois loci (Est1, Est2 et Est3).

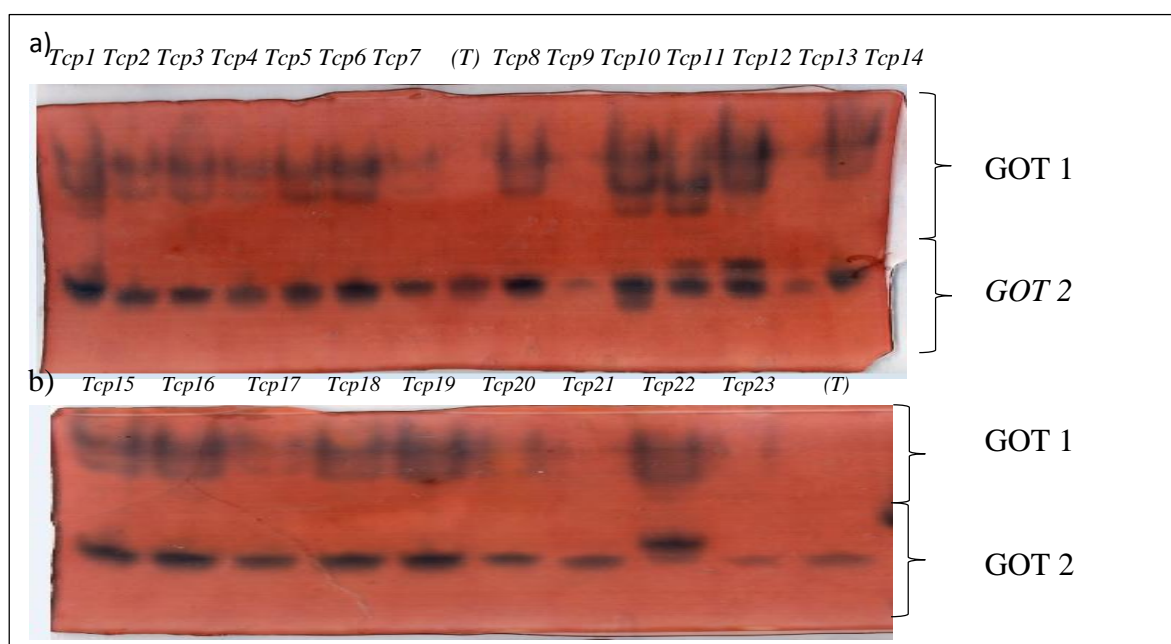


Figure 10. Zymogramme de système enzymatique GOT pour 23 accessions de l'espèce *T. campestre* : a) de *Tcp1* à *Tcp14*, b) de *Tcp15* à *Tcp23*, (T)= Témoin.

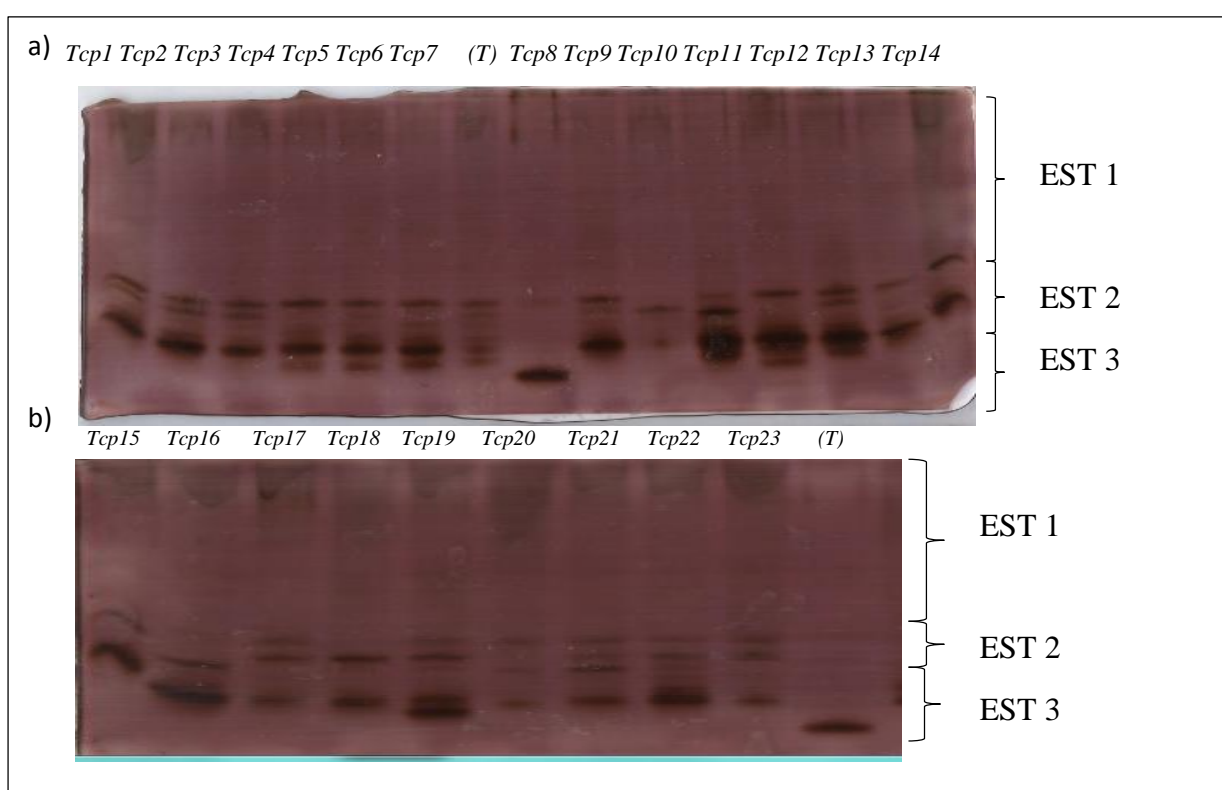


Figure 11. Zymogrammes du système enzymatique EST pour les 23 accessions de l'espèce *T. campestre* : a) de *Tcp1* à *Tcp14*, b) de *Tcp15* à *Tcp23*, (T)= Témoin.

2.1. Fréquences alléliques des enzymes

Au total, nous avons compté 16 bandes alléliques pour les deux systèmes enzymatiques (GOT et EST) analysés, réparties à travers deux loci pour le Got et trois loci pour l'Est. Nous avons enregistré donc 3 allèles pour chaque locus de Got et 4 allèles pour (Est1, Est3) et 2 allèles pour l'Est2. Les fréquences des allèles détectées dans les 23 accessions de l'espèce *T. campestris* sont représentées dans le tableau 2.

Pour le système enzymatique GOT, Les allèles G1, G2 et G5 ont été omniprésents dans les 23 accessions avec une fréquence égale à 1, ce qui montre que ces trois allozymes sont monomorphes. Alors que, les deux allèles G3 et G4 représentent seulement quatre accessions avec une faible fréquence égale à 0.17 (*Tcp1*, *Tcp11* et *Tcp12*) en commun ; et *Tcp13* et *Tcp22* pour chaque allozyme, respectivement). L'allozyme restant G6 est spécifique à l'accession *Tcp10* de Constantine /Beni Hemiden.

Quant à l'estérase, un seul allèle a été considéré monomorphe (E1) qui a été présent dans quasiment toutes les accessions avec une fréquence de 1. Suivi par E5 qui a été absent dans une seule accession (*Tcp9*) prélevée de la région de Annaba avec une valeur de fréquence égale à 0,96. En revanche, l'allozyme E10 a été partagé par trois accessions : *Tcp3*(Medea), *Tcp12* (Constantine/Chaab erressas) et *Tcp14* (Mila/Oued Athmenia), avec une valeur de fréquence égale à 0,13. Finalement, l'allèle E9 est spécifique à l'accession *Tcp11* de la région Constantine/Chettaba.

D'autres valeurs de fréquences intermédiaires ont été également observées pour les autres allozymes (Tableau 2).

Tableau 2.Matrice présence/absence, fréquences des allozymes des 23 accessions de *T. campestre*.

Loci	Allèles	Tcp1	Tcp2	Tcp3	Tcp4	Tcp5	Tcp6	Tcp7	Tcp8	Tcp9	Tcp10	Tcp11	Tcp12	Tcp13	Tcp14	Tcp15	Tcp16	Tcp17	Tcp18	Tcp19	Tcp20	Tcp21	Tcp22	Tcp23	somme	fréquences		
GOT1	G1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	23	1	
	G2	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	23	1
	G3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0.17
GOT2	G4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0.17	
	G5	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	23	1
	G6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.04
EST1	E1	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	23	1
	E2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	16	0.70
	E3	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	16	0.70
	E4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	7	0.30
EST2	E5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	0.96
	E6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.61
EST3	E7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	0.57
	E8	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	7	0.30
	E9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.04
	E10	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0.13

2.2. Distances génétiques

L'analyse des distances génétiques entre les accessions de *T. campestre*, basée sur les systèmes enzymatiques GOT et EST, révèle des valeurs allant de 0.00 à 2.65, avec une moyenne de 1.41 (voir Tableau 3).

La distance la plus élevée (2.65) a été observée entre 13 paires d'accessions, dont les climats sont différents. Sauf pour le couple d'accessions (*Tcp11/Tcp3*) qui partagent le même climat (subhumide), citant que *Tcp11* a été récoltée à Constantine/ Chettaba, à une altitude de 850 mètres, tandis que *Tcp3* a été collectée à Medea, avec une altitude de 385 mètres.

Une similarité totale des profils des enzymes a été observée entre six paires d'accessions avec une valeur de distance de 0.00, prélevées dans des sites géographiquement éloignées ou proches. Tel que le couple *Tcp18* (Alger/Ben Aknoun) et *Tcp16* (Bejaia) sont géographiquement proches mais présentent des altitudes différentes (272 et 107 mètres) et un climat similaire (hyper-humide).

Tableau 3. Distances génétiques basées sur la diversité enzymatique obtenues entre les 23 accessions de *T. campestre*.

	<i>Tcp1</i>	<i>Tcp2</i>	<i>Tcp3</i>	<i>Tcp4</i>	<i>Tcp5</i>	<i>Tcp6</i>	<i>Tcp7</i>	<i>Tcp8</i>	<i>Tcp9</i>	<i>Tcp10</i>	<i>Tcp11</i>	<i>Tcp12</i>	<i>Tcp13</i>	<i>Tcp14</i>	<i>Tcp15</i>	<i>Tcp16</i>	<i>Tcp17</i>	<i>Tcp18</i>	<i>Tcp19</i>	<i>Tcp20</i>	<i>Tcp21</i>	<i>Tcp22</i>	<i>Tcp23</i>
<i>Tcp1</i>	0.00	1.41	1.73	2.45	2.00	1.73	1.73	1.41	1.73	2.45	2.00	2.00	1.73	2.00	2.45	2.24	2.45	2.24	2.24	2.24	2.24	2.00	2.45
<i>Tcp2</i>		0.00	1.00	2.00	1.41	1.00	1.00	0.00	1.00	2.00	2.45	2.45	1.73	1.41	2.00	1.73	2.00	1.73	1.73	1.73	1.73	2.00	2.00
<i>Tcp3</i>			0.00	2.24	1.73	1.41	1.41	1.00	1.41	2.24	2.65	2.24	2.00	1.00	2.24	2.00	2.24	2.00	2.00	2.00	2.00	2.24	2.24
<i>Tcp4</i>				0.00	1.41	1.73	1.73	2.00	2.24	2.00	2.45	2.45	2.24	2.00	2.00	2.24	2.00	2.24	2.24	2.24	2.24	2.45	2.00
<i>Tcp5</i>					0.00	1.00	1.00	1.41	1.73	2.00	2.45	2.00	2.24	2.00	2.00	2.24	2.00	2.24	1.73	2.24	2.24	2.45	2.00
<i>Tcp6</i>						0.00	0.00	1.00	1.41	1.73	2.65	2.24	2.00	1.73	2.24	2.00	2.24	2.00	1.41	2.00	2.00	2.24	2.24
<i>Tcp7</i>							0.00	1.00	1.41	1.73	2.65	2.24	2.00	1.73	2.24	2.00	2.24	2.00	1.41	2.00	2.00	2.24	2.24
<i>Tcp8</i>								0.00	1.00	2.00	2.45	2.45	1.73	1.41	2.00	1.73	2.00	1.73	1.73	1.73	1.73	2.00	2.00
<i>Tcp9</i>									0.00	2.24	2.65	2.65	2.00	1.73	2.24	2.00	2.24	2.00	2.00	2.00	2.00	2.24	2.24
<i>Tcp10</i>										0.00	2.45	2.45	1.73	2.00	2.00	2.24	2.45	2.24	1.73	1.73	2.24	2.45	2.45
<i>Tcp11</i>											0.00	2.00	1.73	2.45	2.00	2.65	2.45	2.65	2.65	2.24	2.65	2.45	2.45
<i>Tcp12</i>												0.00	2.24	2.45	2.45	2.65	2.45	2.65	2.24	2.65	2.65	2.45	2.45
<i>Tcp13</i>													0.00	1.73	1.73	2.00	2.24	2.00	2.00	1.41	2.00	2.24	2.24
<i>Tcp14</i>														0.00	2.00	2.24	2.45	2.24	2.24	1.73	2.24	2.45	2.45
<i>Tcp15</i>															0.00	1.73	1.41	1.73	1.73	1.00	1.73	2.00	1.41
<i>Tcp16</i>																0.00	1.00	0.00	1.41	1.41	0.00	1.00	1.00
<i>Tcp17</i>																	0.00	1.00	1.73	1.73	1.00	1.41	0.00
<i>Tcp18</i>																		0.00	1.41	1.41	0.00	1.00	1.00
<i>Tcp19</i>																			0.00	1.41	1.41	1.73	1.73
<i>Tcp20</i>																				0.00	1.41	1.73	1.73
<i>Tcp21</i>																					0.00	1.00	1.00
<i>Tcp22</i>																						0.00	1.41
<i>Tcp23</i>																							0.00

2.3. Classification hiérarchique

Une classification UPGMA (Fig.11) a été réalisée en se fondant sur les profils enzymatiques de 23 accessions de l'espèce *T. campestre*. Le dendrogramme résultant propose une classification probable des accessions analysées. À une distance d'agrégation de 2.44, les accessions étudiées sont regroupées en quatre principaux clusters.

Le premier cluster (à une distance de $d=2.23$) est le plus étendu et comprend neuf accessions, subdivisées en deux principaux sous-groupes. Le premier sous-groupe, à une distance de $d=2.16$, comprend deux paires d'accessions : *Tcp13/Tcp10*, originaires de l'Est (Bab Trouche/Mila ; Beni Hemiden/Constantine), représentant une gamme de bioclimats allant de l'hyper-humide au subhumide et des altitudes variées. Le deuxième couple, *Tcp20/Tcp15*, est collecté dans des régions distinctes (Boumerdes et Chlef respectivement), présentant le même climat humide mais avec des altitudes différentes. Le deuxième sous-groupe comprend cinq accessions (*Tcp7*, *Tcp6*, *Tcp5*, *Tcp4* et *Tcp14*) prélevées dans des régions éloignées et présentant des climats différents.

Le deuxième cluster ($d= 1.73$) regroupe 6 accessions, ces 6 accessions ont la particularité d'être collectées dans les régions de centre jusqu'à Est du pays avec une gamme des étages bioclimatiques relative (de l'hyper-humide jusqu'au subhumide), sauf *Tcp8* (Tissemsilt) est à l'origine de l'ouest de l'Algérie avec un climat semi-aride.

Le troisième cluster contient 6 accessions (*Tcp16*, *Tcp21*, *Tcp22*, *Tcp23*, *Tcp17* et *Tcp19*) provenant de différentes régions et différents climats.

Le quatrième cluster contient un seul couple d'accessions *Tcp12/Tcp11* au niveau de distance ($d=2.00$) provenant de la même régions Constantine (Chaab eressas/Chettaba respectivement) avec le même climat sube-humide.

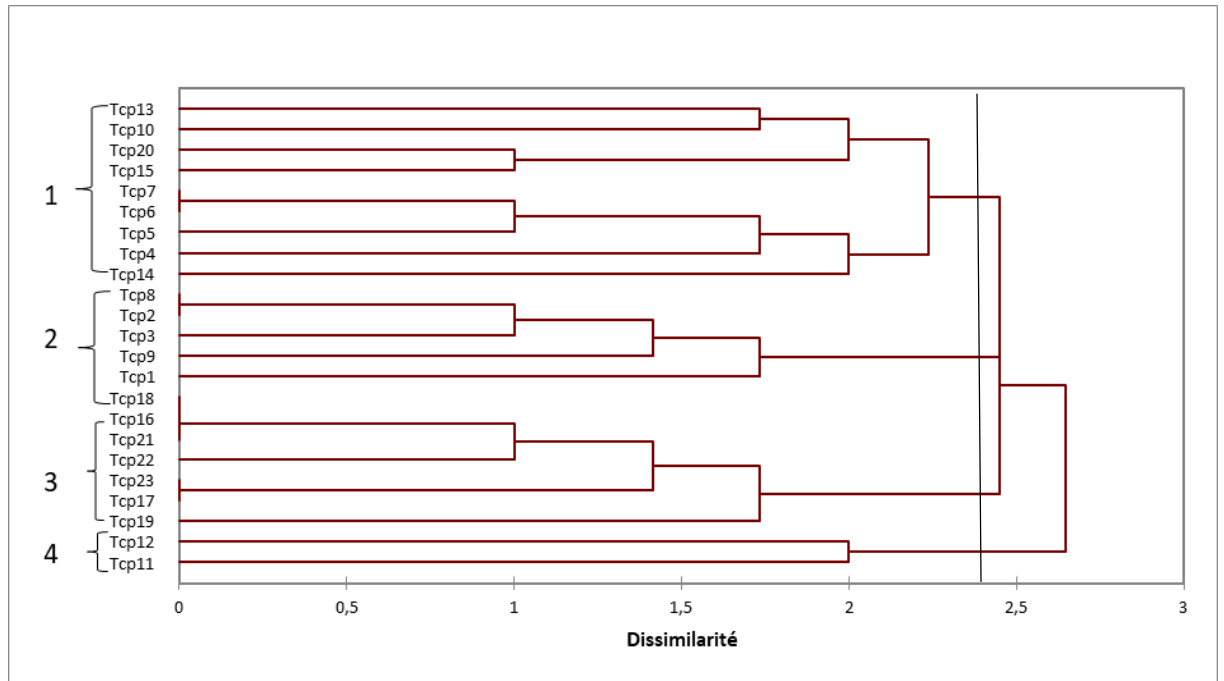


Figure 12. Classification hiérarchique en UPGMA des 23 accessions de *T. campestre* basée sur le polymorphisme des enzymes (Got-Est) : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe.

3. Analyses de la diversité protéique

3.1. Diversité des Protéines totales

3.1.1. Fractionnement des protéines totales et lecture des profils

électrophorétiques

L'électrophorèse nous a permis de détecter des distinctions dans les profils des protéines totales entre les 23 accessions examinées [Notre étude se base sur l'utilisation de 19 accessions seulement, étant donné l'absence des échantillons (*Tcp6*, *Tcp7*, *Tcp20* et *Tcp22*)].

Les bandes se distinguent nettement avec une résolution satisfaisante, révélant ainsi un polymorphisme entre les accessions. Comme illustré dans la figure 12, le profil électrophorétique typique est obtenu lorsque la migration est interrompue au moment où le front de bleu de bromophénol atteint la limite du gel. Ce schéma se divise en trois zones principales de mobilité décroissante : 1, 2 et 3.

Zone (1) : Cette région, qui est la plus lente, englobe une seule bande présente dans toutes les accessions ayant un poids moléculaire égal ou supérieur à 100 kDa.

Zone (2) : Cette zone intermédiaire comprend des bandes dont le poids moléculaire varie de 25 à 100 kDa. Elle se caractérise par une grande variabilité dans les profils, tant en termes de nombre que d'intensité des électromorphes. La majorité des protéines totales sont localisées dans cette plage de mobilité.

Zone (3) : Cette zone rapide se distingue par une grande variabilité, avec un poids moléculaire inférieur à 25 kDa.

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

$$5\text{mm} < \text{Zone 1} < 53\text{mm}$$

$$56\text{mm} < \text{Zone 2} < 118\text{mm}$$

$$121\text{mm} < \text{Zone 3} < 168\text{mm}$$

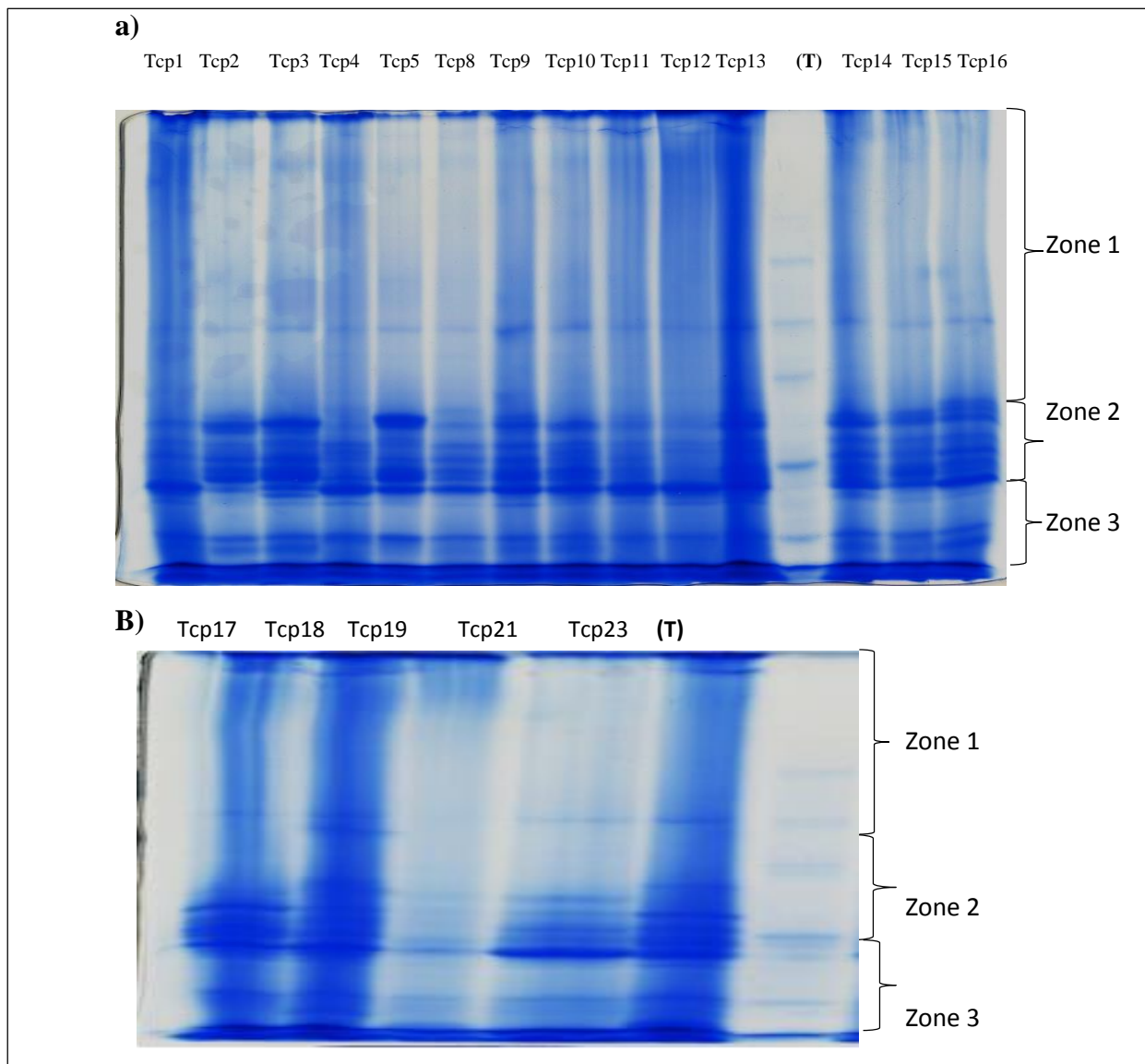


Figure 13. Profils électrophorétiques des protéines totales obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes chez 19 accessions de *T. campestre*.

3.1.2. Fréquences des protéines totales

En somme, les zones de mobilités ont engendré 15 bandes que nous avons numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide. Les fréquences des 15 protéines détectées dans les 19 accessions de l'espèce *T. campestre* sont données dans le tableau 4.

Trois bandes (B1, B11, B14) sont omniprésentes dans toutes les accessions avec une valeur de fréquence de 1. Ce qui montre leur dominance dans le gel. Suivies par les bandes (B5, B6, B8 et B15) avec des fréquences moins élevées (varient entre 0.79 et 0.95).

Des fréquences faibles qui varient de 0.16 à 0.47 ont caractérisé cinq bandes sur les 15 détectées (B4, B7, B10, B12 et B13).

La fréquence la plus faible 0,05 a été observé pour les bandes (B2, B3 et B9), qui ont été présentes dans une seule accession chacune, elles sont considérées donc spécifiques à leurs accessions : la bande B2 a été spécifique à l'accession *Tcp* 18 provenant d'Alger / Ben Aknoun, les bandes B3et B9 particularisent l'accession *Tcp*16 appartenant à la région de Bejaia.

Tableau 4. Matrice Présence/Absence, fréquences des protéines totales dans les 19 accessions de l'espèce *T. campestre*.

Bandes	Tcp1	Tcp2	Tcp3	Tcp4	Tcp5	Tcp8	Tcp9	Tcp10	Tcp11	Tcp12	Tcp13	Tcp14	Tcp15	Tcp16	Tcp17	Tcp18	Tcp19	Tcp21	Tcp23	Somme	fréquences
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0.05
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.05
4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	3	0.16
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	18	0.95
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	17	0.89
7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	5	0.26
8	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	16	0.84
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0.05
10	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	9	0.47
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	1
12	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	4	0.21
13	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	9	0.47
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	1
15	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	0.79

3.1.3. Distances génétiques

Les distances génétiques entre les 19 accessions étudiées ont été calculées en se basant sur les données des protéines totales, utilisant la distance euclidienne. Les résultats, présentés dans le tableau 5, révèlent une variabilité relative entre ces accessions, avec des valeurs s'étalant de 0.00 à 2.65 et une distance moyenne de 1.41.

Une similitude totale des profils des protéines totale a été observées entre quatre paires d'accessions avec une distance (0.00), notamment entre *Tcp5* et *Tcp2*, qui ont été collectées dans des zones géographiquement et écologiquement proches (Bouira / Blida, Humide / Hyper-humide respectivement).

La distance la plus élevée 2.65 a été observée entre deux paires d'accessions : *Tcp18* (Alger / Ben Aknoun) et *Tcp16* (Bejaia), ainsi qu'entre *Tcp21* (Jijel / Parc animalier) et *Tcp16* (Bejaia). Ces accessions ont été prélevées dans des zones géographiquement éloignées mais relativement similaires sur le plan écologique (Humide / Hyper-humide). Des distances intermédiaires ont été enregistrées pour d'autres paires d'accessions, comme indiqué dans le tableau 5.

Tableau 5. Distances génétiques calculées entre les 19 accessions de l'espèce *T. campestre* en se basant sur les données des protéines totales.

	Tcp1	Tcp2	Tcp3	Tcp4	Tcp5	Tcp8	Tcp9	Tcp10	Tcp11	Tcp12	Tcp13	Tcp14	Tcp15	Tcp16	Tcp17	Tcp18	Tcp19	Tcp21	Tcp23
Tcp1	0.00	1.41	1.73	0.00	1.41	1.73	1.00	2.00	1.41	1.41	1.00	1.73	1.41	2.24	1.00	1.41	1.73	1.41	1.41
Tcp2		0.00	1.00	1.41	0.00	1.00	1.00	1.41	0.00	2.00	1.73	1.73	1.41	2.24	1.73	2.00	1.00	1.41	2.00
Tcp3			0.00	1.73	1.00	1.41	1.41	1.73	1.00	2.24	2.00	1.41	1.73	2.45	1.41	2.24	1.41	1.00	2.24
Tcp4				0.00	1.41	1.73	1.00	2.00	1.41	1.41	1.00	1.73	1.41	2.24	1.00	1.41	1.73	1.41	1.41
Tcp5					0.00	1.00	1.00	1.41	0.00	2.00	1.73	1.73	1.41	2.24	1.73	2.00	1.00	1.41	2.00
Tcp8						0.00	1.41	1.73	1.00	2.24	2.00	2.00	1.73	2.00	2.00	2.24	1.41	1.73	1.73
Tcp9							0.00	1.73	1.00	1.73	1.41	2.00	1.73	2.45	1.41	1.73	1.41	1.00	1.73
Tcp10								0.00	1.41	1.41	1.73	1.73	1.41	2.24	2.24	2.45	1.73	2.00	2.45
Tcp11									0.00	2.00	1.73	1.73	1.41	2.24	1.73	2.00	1.00	1.41	2.00
Tcp12										0.00	1.00	1.73	1.41	2.24	1.73	2.00	2.24	2.00	2.00
Tcp13											0.00	2.00	1.73	2.45	1.41	1.73	2.00	1.73	1.73
Tcp14												0.00	1.00	2.00	1.41	2.24	2.00	1.73	2.24
Tcp15													0.00	1.73	1.73	2.00	1.73	2.00	2.00
Tcp16														0.00	2.45	2.65	2.45	2.65	2.24
Tcp17															0.00	1.73	2.00	1.00	1.73
Tcp18																0.00	1.73	2.00	2.00
Tcp19																	0.00	1.73	2.24
Tcp21																		0.00	2.00
Tcp23																			0.00

3.1.4. Classification hiérarchique

Les distances génétiques entre les différentes accessions de *T. campestre* ont été utilisées pour réaliser une classification hiérarchique en UPGMA (Fig.13). Le dendrogramme obtenu subdivise les 19 accessions en trois clusters majeurs à une valeur de distance $d=2.44$.

Le premier cluster majeur renferme 10 accessions au niveau de distance $d=2$. Ces 10 accessions ont la particularité d'être collectées dans des régions allant du Centre jusqu'à l'Est du Nord Algérien, avec une gamme des étages bioclimatiques variant de l'hyper-humide jusqu'au semi-aride. Sauf *Tcp4* (Sidi bel Abbès) et *Tcp23* (Oran) sont à l'origine de l'Ouest de l'Algérie. Ce premier cluster est subdivisé lui-même en quatre sous-groupes à des niveaux de distance proches, sans corrélation logique avec les origines géographiques des accessions.

Le cluster 2 comprend huit accessions (*Tcp2*, *Tcp11*, *Tcp3...Tcp14*) collectées dans diverses régions allant du centre à l'Est du Nord Algérien, englobant une gamme de climats allant de l'humide au subhumide et hyper-humide. Les seules exceptions sont Tissemsilt (*Tcp8*) et Chlef (*Tcp15*), situées du côté Ouest. Ce groupe est ensuite subdivisé en deux sous-groupes avec une distance $d=1,73$.

L'accession *Tcp16* qui est collectée dans une région hyper-humide de Bejaia, forme un groupe indépendant des autres avec le degré le plus élevé de distance génétique ($d=2.64$).

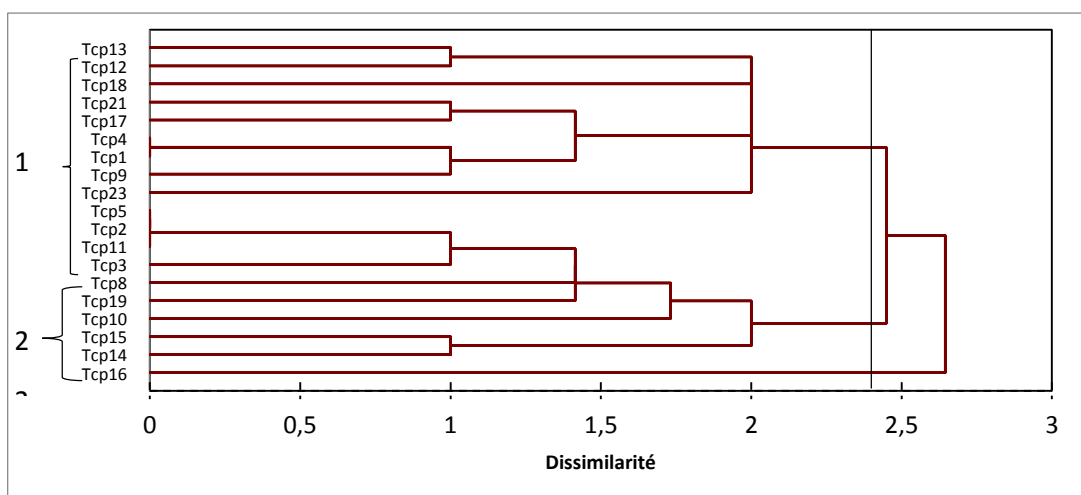


Figure 14. Classification hiérarchique en UPGMA des 19 accessions de *T. campestre* basée sur le polymorphisme des protéines totale.

3.2. Diversité des albumines

3.2.1. Fractionnement des albumines et lecture des profil électrophorétiques

L'étude des albumines s'est fondée sur l'exploitation de 22 accessions uniquement, en raison de l'absence de l'échantillon *Tcp23*. Cette technique nous a permis de détecter des différences dans les profils des albumines entre les accessions étudiées. Les bandes sont très bien séparées avec une bonne résolution et elles révèlent un polymorphisme entre les accessions. La figure 14 montre le profil électrophorétique obtenu habituellement quand la migration est arrêtée au moment où le front de bleu de bromophénol atteint la limite du gel. Le diagramme se décompose en trois principales zones de mobilité décroissante 1,2 et 3.

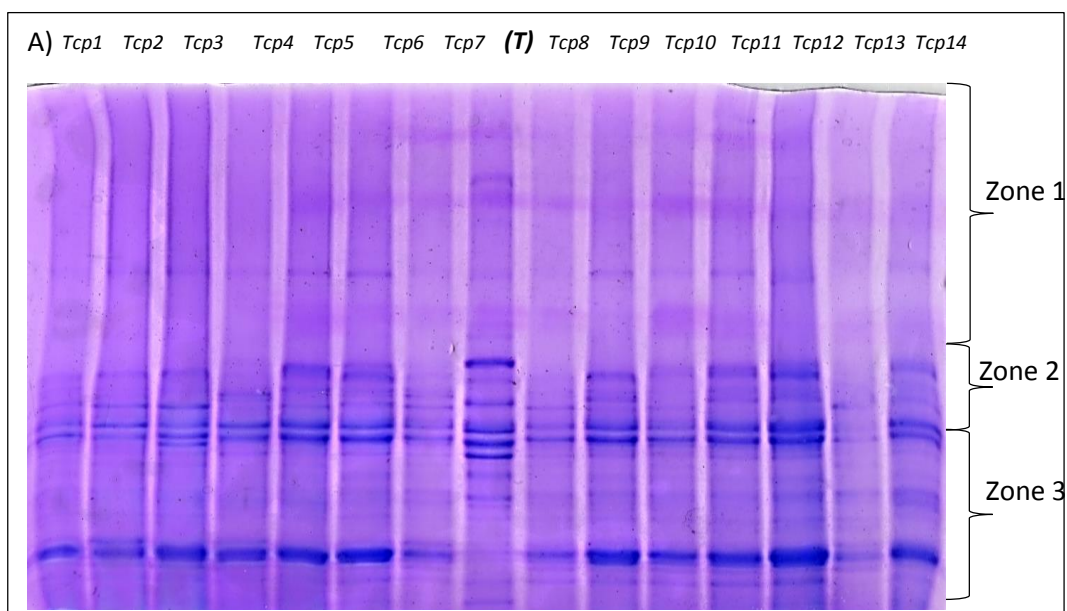
- **Zone (1)** : Sachant que c'est la zone la plus lente et qui représente des poids moléculaires supérieurs ou égales à 100 KDa, Cette zone est caractérisée par la présence de nombre de bande plus faibles par rapport à la zone 2 et 3. En effet, les albumines sont caractérisées par leurs poids moléculaires faibles.
- **Zone (2)** : C'est la partie où les albumines sont localisées majoritairement avec une considérable variabilité qualitative et quantitative des électromorphes et un poids moléculaire qui s'étend de 25 à 100 KDa.
- **Zone (3)** : C'est la zone rapide. Aussi caractérisée par une considérable variabilité avec un nombre moindre d'albumines dont leurs poids moléculaires sont moins de 25 KDa.

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

$$5\text{mm} < \text{Zone 1} < 53\text{mm}$$

$$56\text{mm} < \text{Zone 2} < 118\text{mm}$$

$$121\text{mm} < \text{Zone 3} < 168\text{mm}$$



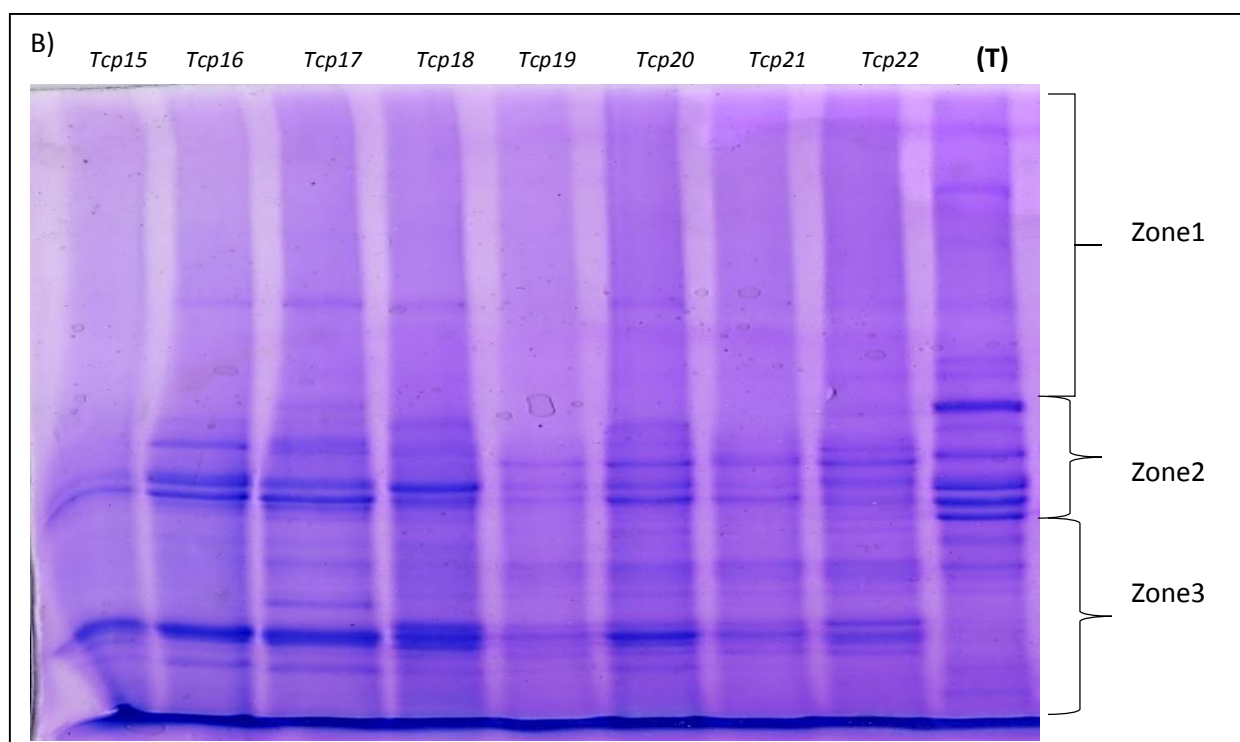


Figure 15. Profils électrophorétiques des albumines obtenus par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes nom réductrices chez 22 accessions de *Trifolium campestre* : a) de *Tcp1* à *Tcp14*, b) de *Tcp15* à *Tcp22*, (T)= Témoin.

3.2.2. Fréquences des albumines

Les bandes des albumines observées ont été variables d'une accession à une autre et à travers les trois zones qui ont été obtenus. 22 bandes ont été numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide. La matrice présence/absence, les fréquences des albumines détectées dans les 22 accessions de l'espèce *T. campestre* sont représentées dans le tableau 6.

Les bandes (A1, A9, A10, A14, A15, A16 et A19) sont qualifiées de monomorphes car elles apparaissent dans toutes les accessions avec une valeur de fréquence égale à 1, ce qui montre leur dominance dans la zone 2 et 3. Suivies par les bandes (A3, A5, A7, A12, A20 et A22) avec des fréquences moins élevées (varient entre 0.77 et 0.91).

Des bandes (A2, A4, A18, A21) affichent des fréquences moyennes variant entre 0,36 et 0,59 ont été relevées. Des fréquences faibles ont été observées pour les bandes A11 et A13, avec des valeurs respectives de 0,18 et 0,23. Alors que, la plus faible fréquence (0.05) a été enregistrée pour deux bandes (A6, A17) qui ont été partagée chacune par deux accessions.

Tableau 6.Matrice Présence/Absence, et fréquences des albumines dans les 22 accessions de l'espèce *T. campestre*.

Band es	Tc p1	Tc p2	Tc p3	Tc p4	Tc p5	Tc p6	Tc p7	Tc p8	Tc p9	Tcp 10	Tcp 11	Tcp 12	Tcp 13	Tcp 14	Tcp 15	Tcp 16	Tcp 17	Tcp 18	Tcp 19	Tcp 20	Tcp 21	Tcp 22	som me	fréquen ces	
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
2	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	9	0.41
3	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	17	0.77	
4	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	13	0.59	
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	17	0.77	
6	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.05
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	16	0.73	
8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	4	0.18
9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
11	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	3	0.14
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	20	0.91
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	5	0.23
14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.05
18	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	10	0.45
19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
20	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	0.82
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	0.36
22	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	20	0.91

3.2.3. Distances génétiques

La comparaison par pair entre les 22 accessions étudiées a été réalisée sur la base des profils des albumines en utilisant l'indice de Jaccard. Les valeurs de distances génétiques sont présentées dans le tableau 7. Les chiffres enregistrés variaient entre 0.00 et 3.32 avec une distance moyenne de 1.73, ce qui signifie la présence d'une diversité importante entre les accessions de *T. campestre* de point de vue des albumines.

Une similitude totale des profils des albumines a été observée entre *Tcp12* et *Tcp11* avec une distance (0.00). Il convient de noter que ces accessions ont été récoltées dans la même région géographique de Constantine, bien que leur provenance diffère (Chaab eressas / Chettaba, respectivement), avec des altitudes variantes entre 584 et 850 mètres respectivement, tout en partageant le même climat (subhumide) (voir tableau 1).

La valeur de distance la plus élevée ($d = 3.32$) a été enregistrée entre deux autres paires d'accessions : *Tcp16 / Tcp13* (Bejaia / Mila ; Bab Trouche) et *Tcp17 / Tcp13* (Alger ; Mohammadia / Mila ; Bab Trouche). Ces paires se distinguent par des différences dans les distances entre les sites de collecte et dans leurs altitudes, bien qu'elles présentent deux climats proches (humide / hyperhumide) (voir tableau 1).

Pour d'autres paires d'accessions, des distances intermédiaires ont été obtenues, illustrant des diagrammes plus ou moins similaires, avec des similitudes et des différences équilibrées (moyenne = 1.73).

Tableau 7. Distances génétiques obtenues entre les 22 accessions de *T. campestre* en se basant sur les données des albumines.

	<i>Tcp1</i>	<i>Tcp2</i>	<i>Tcp3</i>	<i>Tcp4</i>	<i>Tcp5</i>	<i>Tcp6</i>	<i>Tcp7</i>	<i>Tcp8</i>	<i>Tcp9</i>	<i>Tcp10</i>	<i>Tcp11</i>	<i>Tcp12</i>	<i>Tcp13</i>	<i>Tcp14</i>	<i>Tcp15</i>	<i>Tcp16</i>	<i>Tcp17</i>	<i>Tcp18</i>	<i>Tcp19</i>	<i>Tcp20</i>	<i>Tcp21</i>	<i>Tcp22</i>
<i>Tcp1</i>	0.00	1.73	1.73	2.00	1.00	1.41	1.73	1.41	1.00	2.24	1.73	1.73	2.24	2.00	2.24	2.45	2.45	1.41	2.45	1.73	2.00	2.24
<i>Tcp2</i>		0.00	2.00	2.24	2.00	2.24	2.00	1.73	2.00	2.45	2.45	2.45	1.41	1.73	2.45	3.00	3.00	2.24	2.65	2.45	2.65	2.83
<i>Tcp3</i>			0.00	2.24	1.41	1.73	2.45	1.00	1.41	2.00	2.00	2.00	2.45	1.73	2.00	2.24	2.24	2.24	2.65	2.45	2.65	2.83
<i>Tcp4</i>				0.00	2.24	2.00	2.24	2.00	2.24	2.24	2.24	2.24	2.24	2.00	2.65	3.16	2.83	2.45	2.45	2.65	2.45	2.24
<i>Tcp5</i>					0.00	1.00	2.00	1.00	0.00	2.00	1.41	1.41	2.45	1.73	2.00	2.24	2.24	1.73	2.65	2.00	2.24	2.45
<i>Tcp6</i>						0.00	1.73	1.41	1.00	1.73	1.00	1.00	2.65	1.41	2.24	2.45	2.00	2.00	2.83	2.24	2.45	2.24
<i>Tcp7</i>							0.00	2.24	2.00	2.00	2.00	2.00	2.45	1.73	2.83	2.65	2.65	2.24	3.00	2.45	2.65	2.00
<i>Tcp8</i>								0.00	1.00	1.73	1.73	1.73	2.24	1.41	1.73	2.45	2.45	2.00	2.45	2.24	2.45	2.65
<i>Tcp9</i>									0.00	2.00	1.41	1.41	2.45	1.73	2.00	2.24	2.24	1.73	2.65	2.00	2.24	2.45
<i>Tcp10</i>										0.00	2.00	2.00	2.45	1.73	2.45	2.65	2.65	2.65	2.65	2.45	2.65	2.45
<i>Tcp11</i>											0.00	0.00	2.83	1.73	2.00	2.24	1.73	1.73	3.00	2.45	2.65	2.45
<i>Tcp12</i>												0.00	2.83	1.73	2.00	2.24	1.73	1.73	3.00	2.45	2.65	2.45
<i>Tcp13</i>													0.00	2.24	2.83	3.32	3.32	2.65	2.24	2.45	2.24	2.83
<i>Tcp14</i>														0.00	2.24	2.83	2.45	2.45	2.83	2.65	2.83	2.65
<i>Tcp15</i>															0.00	2.24	2.24	1.73	2.24	2.45	2.65	2.83
<i>Tcp16</i>																0.00	2.00	2.00	2.83	2.24	2.45	2.24
<i>Tcp17</i>																	0.00	2.00	3.16	2.65	2.83	2.65
<i>Tcp18</i>																		0.00	2.45	1.73	2.00	2.24
<i>Tcp19</i>																			0.00	1.73	1.41	2.24
<i>Tcp20</i>																				0.00	1.00	2.00
<i>Tcp21</i>																					0.00	1.73
<i>Tcp22</i>																						0.00

3.2.4. Classification hiérarchique

Une classification UPGMA (Fig.15) a été élaborée en se basant sur les profils des albumines de 22 accessions de l'espèce *T. campestre*. Le dendrogramme résultant propose une probable classification des accessions analysées. À une distance d'agrégation de 2,82, les accessions étudiées sont regroupées en quatre principaux groupes.

Le premier groupe majeur renferme 12 accessions au niveau de distance $d=2.44$. Ces 12 accessions ont la particularité d'être collectées dans le Nord Algérien avec une gamme des étages bioclimatiques relative (de l'hyper-humide jusqu'au subhumide). Ce premier groupe est subdivisé lui-même en deux sous-groupes à une valeur de distance $d=2.33$, sans corrélation logique avec les origines géographiques des accessions.

Le deuxième groupe forme un clade entre les deux accessions *Tcp13* et *Tcp2* à une valeur de distance $d= 1.41$. Ces accessions appartiennent à deux régions géographiquement éloignées avec des climats similaires (hyper-humide) ; Bab Trouche /Mila et Blida, respectivement.

Le troisième groupe comprend 4 accessions (*Tcp21*, *Tcp20*, *Tcp19*, *Tcp22*). Provenant des régions côtières (Jijel/Parc animalier, Boumerdes, Jijel/Boughdir, Alger/El Madania), avec des conditions climatiques identique (humide) et des altitudes diverses.

Finalement, le dernier groupe est présenté par 4 accessions formant deux clades : à un degré de distance $d = 2$, entre *Tcp17* et *Tcp16* (Alger/Mohammadia et Bejaia, respectivement) ; et à un degré de distance $d = 1.73$, entre *Tcp18* et *Tcp15* (Alger/Ben Aknoun et Chlef) avec des climats varient entre humide et hyper humide, respectivement pour les deux clades.

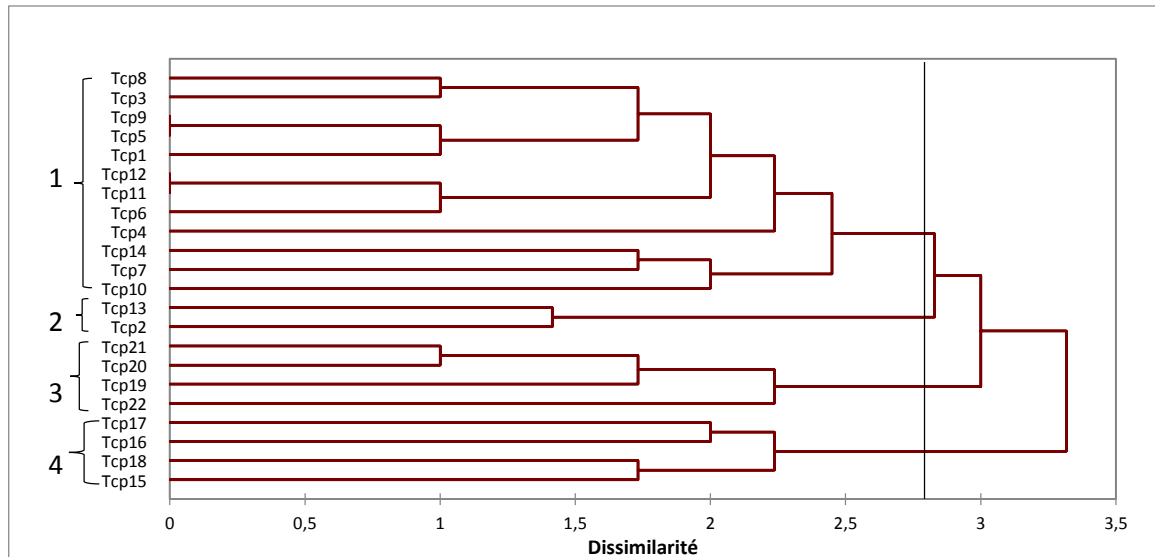


Figure 16. Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de *T. campestre* basée sur le polymorphisme des albumines : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe.

3.3. Diversité des globulines

3.3.1. Fractionnement des globulines et lecture des profils

électrophorétiques

L'analyse intra-spécifique de l'espèce *T. campestre* sur la base des globulines a permis de générer des profils électrophorétiques clairs avec des bandes bien décelées (Fig.16). Le diagramme se décompose en trois principales zones de mobilité décroissante 1, 2 et 3.

- **Zone (1) :** C'est la zone la plus lente, et qui représente des poids moléculaires supérieure ou égale à 100 kDa. Cette zone est caractérisée par la présence d'un nombre moindre de bandes des globulines qui sont moins visible.
- **Zone (2) :** les globulines sont localisées majoritairement dans cette zone de mobilité avec une considérable variabilité qualitative et quantitative des profils et un poids moléculaire s'étend approximativement de 25 à 100 KDa.
- **Zone (3) :** C'est la zone la plus rapide, se particularise par un nombre des bandes moins intenses que les bandes de la deuxième zone. Ces bandes sont bien séparées dont leurs poids moléculaires sont moins de 25 KDa.

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

$$5\text{mm} < \text{Zone 1} < 53\text{mm}$$

56mm < Zone 2 <118mm

121mm < Zone 3 <168m

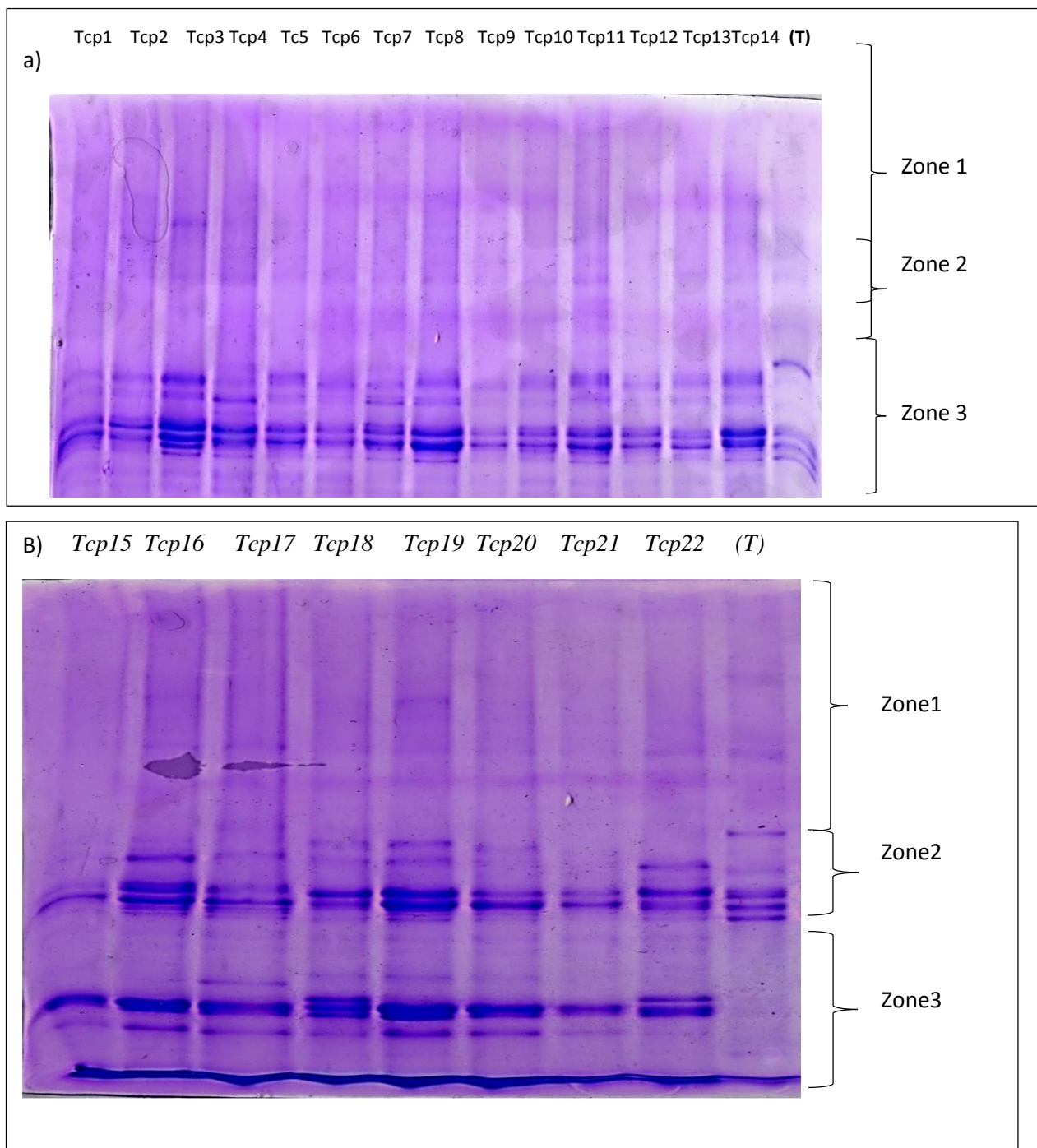


Figure 17. Profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez 22 accessions de *Trifolium campestre* : a) de *Tcp1* à *Tcp14*, b) de *Tcp15* à *Tcp22*, (T)= Témoin.

3.3.2. Fréquences des globulines

Les diagrammes électrophorétiques des accessions analysées renferment 26 bandes protéiques décelables qui se répartissent dans tout le gel leur fréquences sont représentées dans le tableau 8.

D'après le tableau 8, nous avons constaté une grande variabilité de fréquences des globulines dans les accessions de *T. campestre*. Parmi les 26 bandes détectées, seulement cinq sont monomorphes (G1, G16, G17, G8 et G23) elles sont omniprésentes dans toutes les accessions avec un taux maximum (1), ce qui implique leurs dominances. Suivies par les bandes (G3, G5, G10, G13, G24) qui ont été marquées avec une valeur moins élevée varient entre 0.73 et 0.95.

Des fréquences intermédiaires varient entre 0.41 et 0.64 ont été enregistrées (G2, G4, G11, G12, G19 et G21). Plusieurs bandes (G14, G15, G20, G22, G25 et G26) avec des fréquences faibles de 0.09 à 0.32 ont été également notées, parmi elles y a des bandes qui sont partagée par deux ou trois accessions (tableau 8).

La fréquence la plus faible 0,05 a été observé pour les bandes (G6, G7, G8 et G9), qui ont été présentes dans une seule accession chacune, elles sont considérées donc spécifiques à leurs accessions : les bande G6 et G8 particularisent l'accession *Tcp22* provenant de Jijel /Boughdir, la bande G7 a été spécifique à l'accession *Tcp4* appartenant à la région de Sidi bel Abbas e et la bande G9 se trouve dans l'accession *Tcp16* provenant de Bejaia.

Tableau 8. Matrice Présence/Absence, et fréquences des globulines dans les 22 accessions de l'espèce *T. campestris*.

<i>Band es</i>	<i>Tc p1</i>	<i>Tc p2</i>	<i>Tc p3</i>	<i>Tc p4</i>	<i>Tc p5</i>	<i>Tc p6</i>	<i>Tc p7</i>	<i>Tc p8</i>	<i>Tc p9</i>	<i>Tcp 10</i>	<i>Tcp 11</i>	<i>Tcp 12</i>	<i>Tcp 13</i>	<i>Tcp 14</i>	<i>Tcp 15</i>	<i>Tcp 16</i>	<i>Tcp 17</i>	<i>Tcp 18</i>	<i>Tcp 19</i>	<i>Tcp 20</i>	<i>Tcp 21</i>	<i>Tcp 22</i>	<i>som me</i>	<i>fréquen ces</i>
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	10	0.45
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	16	0.73
4	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	13	0.59
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	19	0.86
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.05
7	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.05
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.05
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0.05
10	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	0.86
11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.64
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.64
13	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16	0.73
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	5	0.23
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	4	0.18
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
19	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	9	0.41
20	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	7	0.32
21	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	14	0.64
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	7	0.32
23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	1
24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21	0.95
25	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.09
26	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.32

3.3.3. Distances génétiques

Les différences entre les 22 accessions de *T. campestre* ont été évaluées en se basant sur les données des globulines, en utilisant la distance de Jaccard comme coefficient (voir Tableau 9). Les distances entre ces accessions varient considérablement, avec des valeurs allant de 1.00 à 3.74 et une moyenne de 2.45.

La plus faible distance (1.00) a été observée entre quatre paires d'accessions [(*Tcp6/Tcp1*), (*Tcp7/Tcp1*), (*Tcp9/Tcp6*), (*Tcp10/Tcp1*)] provenant de régions allant de l'Est vers l'Ouest, présentant des variations d'altitude et de climat.

Les distances génétiques les plus élevées (3.74) ont été relevées pour quatre paires d'accessions [(*Tcp16/Tcp12*), (*Tcp16/Tcp13*), (*Tcp17/Tcp13*), (*Tcp22/Tcp13*)], prélevées dans des sites géographiquement plus ou moins éloignés mais partageant des climats proches, allant de l'humide à l'hyper-humide. Il est à noter que l'accession *Tcp13* a été collectée dans la région de Mila/Bab Trouche, avec une altitude de 831 mètres (voir Tableau 1), tandis que les accessions (*Tcp12*, *Tcp16*, *Tcp22*) ont été collectées dans des régions de l'Est (Constantine/Chaab erssas, Bejaia et Jijel/Boughdir) avec des altitudes respectives de 584, 207 et 132 mètres, et des climats variant de subhumide à hyperhumide. L'accession *Tcp17* a été récoltée dans la région d'Alger/Mohammadia, à une altitude de 3 mètres, représentant un climat humide.

Des valeurs intermédiaires ont également été observées pour les autres accessions (voir Tableau 9).

Tableau 9. Distances génétiques calculées entre les 22 accessions de l'espèce *T. campestre*. En se basant sur le polymorphisme des globulines.

	<i>Tcp1</i>	<i>Tcp2</i>	<i>Tcp3</i>	<i>Tcp4</i>	<i>Tcp5</i>	<i>Tcp6</i>	<i>Tcp7</i>	<i>Tcp8</i>	<i>Tcp9</i>	<i>Tcp10</i>	<i>Tcp11</i>	<i>Tcp12</i>	<i>Tcp13</i>	<i>Tcp14</i>	<i>Tcp15</i>	<i>Tcp16</i>	<i>Tcp17</i>	<i>Tcp18</i>	<i>Tcp19</i>	<i>Tcp20</i>	<i>Tcp21</i>	<i>Tcp22</i>	
<i>Tcp1</i>	0.00	1.73	2.00	2.24	1.73	1.00	1.00	2.00	1.41	1.00	1.41	1.73	2.65	2.00	2.83	3.32	3.00	2.83	3.16	2.83	2.45	2.65	
<i>Tcp2</i>		0.00	2.24	2.45	2.00	1.41	1.41	2.65	1.73	2.00	2.24	2.00	2.45	2.24	3.00	3.16	2.83	3.32	3.32	3.00	2.65	3.16	
<i>Tcp3</i>			0.00	2.24	2.24	2.24	1.73	2.00	2.45	2.24	2.45	1.73	2.24	1.41	3.16	3.61	3.32	3.16	3.46	3.16	3.16	3.32	
<i>Tcp4</i>				0.00	2.45	2.45	2.00	2.24	2.24	2.45	2.65	2.45	3.16	2.24	3.32	3.46	3.16	3.32	3.61	3.32	3.00	3.16	
<i>Tcp5</i>					0.00	1.41	2.00	1.73	1.73	1.41	1.73	1.41	2.00	1.73	3.00	3.46	3.46	3.00	3.32	3.32	3.00	3.16	
<i>Tcp6</i>						0.00	1.41	2.24	1.00	1.41	1.73	1.41	2.45	2.24	3.00	3.46	3.16	3.00	3.32	3.00	2.65	2.83	
<i>Tcp7</i>							0.00	2.24	1.73	1.41	1.73	2.00	2.83	1.73	3.00	3.16	2.83	3.00	3.32	3.00	2.65	2.83	
<i>Tcp8</i>								0.00	2.00	1.73	2.00	1.73	2.24	1.41	2.83	3.61	3.61	2.83	3.16	3.16	3.16	3.32	
<i>Tcp9</i>									0.00	1.73	2.00	1.73	2.65	2.45	3.16	3.61	3.32	3.16	3.46	3.16	2.83	3.00	
<i>Tcp10</i>										0.00	1.00	2.00	2.45	1.73	2.65	3.16	3.16	2.65	3.00	3.00	2.65	2.83	
<i>Tcp11</i>											0.00	2.24	2.65	2.00	2.83	3.32	3.32	2.83	3.16	3.16	2.45	2.65	
<i>Tcp12</i>												0.00	2.00	1.73	3.00	3.74	3.46	3.00	3.32	3.00	3.00	3.16	
<i>Tcp13</i>													0.00	2.24	3.00	3.74	3.74	3.32	3.32	3.32	3.32	3.74	
<i>Tcp14</i>														0.00	2.83	3.32	3.32	2.83	3.16	3.16	3.16	3.32	
<i>Tcp15</i>															0.00	2.24	2.24	1.41	1.41	2.00	2.00	2.65	
<i>Tcp16</i>																0.00	1.41	2.24	1.73	2.24	2.65	3.16	
<i>Tcp17</i>																	0.00	2.24	1.73	1.73	2.24	2.83	
<i>Tcp18</i>																		0.00	1.41	2.00	2.45	2.65	
<i>Tcp19</i>																			0.00	1.41	2.45	3.00	
<i>Tcp20</i>																					0.00	2.00	3.00
<i>Tcp21</i>																						0.00	2.24
<i>Tcp22</i>																							0.00

3.3.4. Classification hiérarchique

Les distances de Jaccard, basées sur le polymorphisme des globulines, ont été utilisées pour élaborer un dendrogramme en UPGMA (Fig.17). Ce dendrogramme a identifié deux classes majeures à une distance de $d=3.74$.

La première classe est incarné par 8 accessions qui ont été subdivisés en deux sous-classe principales à une même valeur de distance ($d= 3.16$). Ces 8 accessions ont la particularité d’être collectées dans les régions de l’Est vers le Centre du pays avec une gamme des étages bioclimatiques différentes, sauf Tcp15 (Chlef) est à l’origine de l’Ouest de l’Algérie.

La deuxième classe est la plus grande avec 14 accessions, qui ont été divisé en trois sous-classes, avec une valeur de distance ($d=2 .64$) et qui ont été prélevées du Nord Algérien, présentant des climats et des valeurs d’altitudes variables.

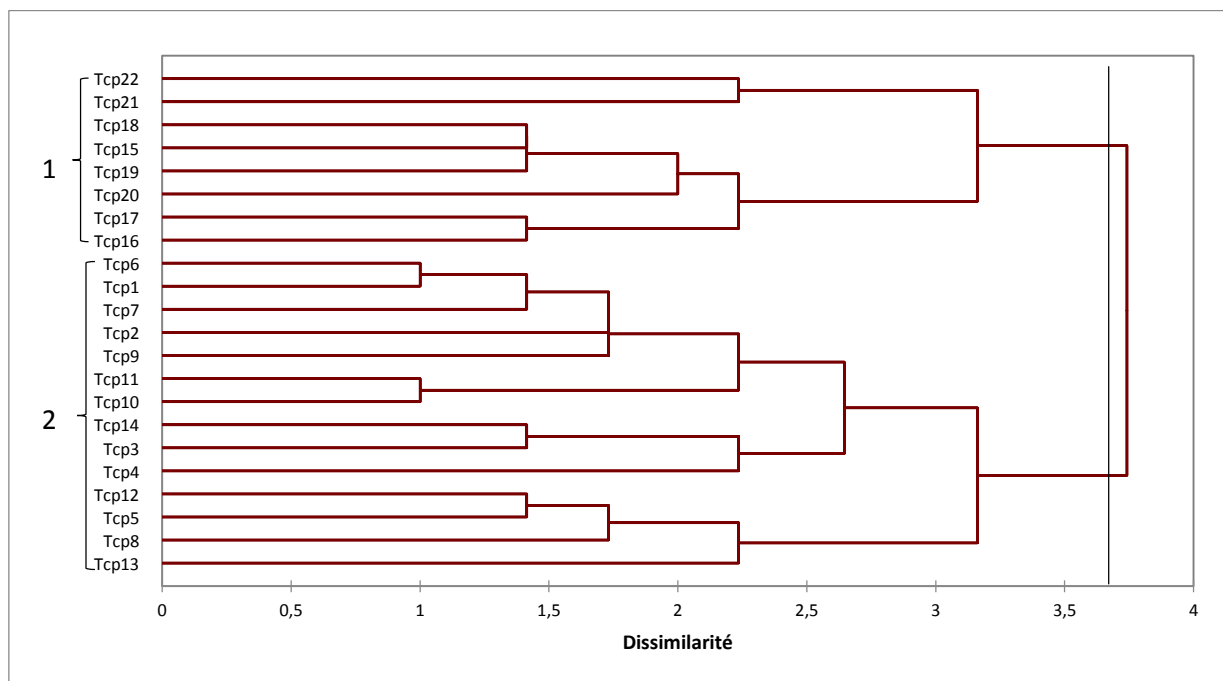


Figure 18.Classification hiérarchique en UPGMA des 22 accessions de *T. campestre* basée sur le polymorphisme des globulines : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe.

4. Discussion

La préservation des ressources génétiques est aujourd'hui un enjeu crucial à la fois sur le plan politique et économique, étant donné que la production agricole actuelle et future repose largement sur la diversité génétique disponible pour l'amélioration des cultures et la création des variétés adaptés à différents environnements et qui résistent à de nombreuses espèces d'insectes ravageurs ou maladies assurant ainsi la sécurité alimentaire. Cette matière première fournit des produits riches en protéines ou ayant de meilleures qualités gustatives, est un caractère transmis par les gènes résistants. L'exploitation de cette diversité dans le domaine de l'amélioration des plantes requiert une analyse génétique, biochimique et moléculaire approfondie préalable.

Le développement des techniques électrophorétiques a fourni une méthode plus directe pour estimer la diversité génétique au sein et parmi les populations des plantes (Hamrick et al., 1992). Un grand nombre de variantes électrophorétiques des enzymes ont maintenant été découvertes (Oliveira et al., 1997). Ces découvertes ont permis de savoir que des enzymes peuvent exister dans le même organisme sous plus d'une forme moléculaire. De telles formes moléculaires multiples d'une enzyme dans un seul organisme ont été désignées isozymes. Les isoenzymes sont des enzymes qui partagent un substrat commun mais diffèrent par leur mobilité électrophorétique (Markert et Moller., 1959).

L'analyse des isoenzymes, est devenue particulièrement importante en biologie systématique et évolutive ainsi qu'en agronomie (Tanksley et Orton, 1983). Les marqueurs biochimiques tels que les isoenzymes ont été souvent utilisés pour caractériser la diversité génétique de plusieurs plantes (Ayadi, 2011). La variabilité génétique intra-population est facilement accessible par les méthodes isoenzymatiques, ces analyses permettent l'évaluation des caractères réputés neutres vis-à-vis de la sélection naturelle (Margalé et al., 1994).

Nos résultats ont démontré une faible variabilité qui a caractérisé le glutamate oxaloacétate transaminase avec 6 bandes localisées dans deux zones d'activité bien distinctes. Une grande variabilité pour les estérases, qui ont révélé 10 bandes réparties en 3 loci. Ce résultat concorde avec celui de Weeden et Wendel, 1990, qui ont trouvé dans leurs études que les estérases sont l'un des systèmes enzymatiques à fort polymorphisme chez les plantes.

La topologie du dendrogramme basé sur l'indice de Jaccard généré à partir de la matrice de données binaires des isoenzymes, a ressorti l'importance de la variation des isoenzymes entre les accessions testées, avec des valeurs de Jaccard qui allait de 0.00 et 2.65 avec une moyenne de 1.41. Le dendrogramme construit a confirmé le degré élevé de diversité entre les accessions de *T. campestre* et a montré que ces accessions peuvent être classées en quatre groupes distincts. Cependant, ces accessions ne se sont pas regroupées sur la base de leurs emplacements éco-géographiques. Haddioui et collaborateurs, 2012, ont trouvé un résultat semblable dans leur étude.

L'analyse comparative des profils de protéines de la graine a été un outil puissant d'identification des espèces, de clarification des problèmes taxonomiques et évolutifs et d'étude de la diversité génétique (Ladizinsky et Hymowitz, 1979). Plusieurs chercheurs ont examiné l'utilité du profil de la protéine de graine à des fins taxonomiques et évolutives (Boulter et al., 1966).

Osborne (1924) a été le premier à élaborer un système de classification des protéines végétales qui a été largement adopté. Sur la base de leur potentiel de solubilité, il a reconnu quatre classes principales parmi elles : les globulines (peu solubles dans l'eau, mais solubles dans les solutions de sels neutres), qui constitue la partie majeure des protéines de stockage (Yemm., 1958) ; et les albumines (solubles dans l'eau et les solutions salines diluées), les glutéines (soluble dans des solutions légèrement acides ou basique) et les prolamines (solubles dans l'alcool).

Toutefois, il est bien connu qu'une distinction claire entre ces groupes de protéines n'est pas toujours possible, à cause de nombreuses protéines montrant des comportements de solubilité intermédiaires. À cet égard, certaines albumines de semences ont été identifiées à partir de plusieurs espèces de plantes qui se comportent comme des globulines lors de leur solubilisation (Youle et Huang, 1978). Blagrove et Gillespie, 1975 ont également noté que les globulines sont en partie solubles dans de l'eau désionisée.

Dans le présent travail, nous avons utilisé une procédure efficace pour isoler des fractions totales des albumines et des globulines (Franco et al., 1997). Plus tard, une technique d'analyse d'électrophorèse (SDS-PAGE) a été utilisée pour une détermination plus précise des diverses fractions des protéines des semences. Boulter et al., 1966 ont souligné les avantages de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation de protéines végétales. La méthode SDS-PAGE est une technique adéquate pour

différencier les variétés et est utilisée avec succès dans l'évaluation de la diversité génétique (Amouri et al., 2014).

Nos résultats, basés sur 22 accessions de l'espèce *campestre* du genre *Trifolium*, échantillonnées dans diverses conditions éco-géographiques en Algérie du Nord, mettent en évidence une différenciation significative au niveau intraspécifique. L'électrophorèse des marqueurs protéiques (protéine totale, albumine et globuline) par SDS-PAGE ont révélé trois zones de migration (1, 2 et 3). Ces trois fractions protéiques ont montré une hétérogénéité aux niveaux intraspécifique avec 15, 22 et 26 bandes de protéine totale, d'albumines et de globulines, respectivement, qui sont séparées dans les trois zones avec une résolution nette. L'intervalle de variation des fréquences de ces bandes (de 0 à 100 %) reflète une grande diversité existante à l'échelle intraspécifique. Ce polymorphisme protéique peut être expliqué par le fait que ces populations ne vivent pas dans le même climat, et subissent donc des conditions différentes. Ainsi que, la composition protéique peut être sous la dépendance des facteurs génétiques et agro-climatique (Doekes et Wennekes, 1982).

D'autres études ont montré que les profils des protéines chez les différents géotypes de *T. campestre* révèlent des variations quantitatives et qualitatives (Ladizinsky et Hymowitz., 1979), et sont hautement stables et parfois spécifiques à l'espèce (Boulter et al., 1967 ; Johnson et al., 1965). Ces mêmes auteurs (Ladizinsky et Hymowitz, 1979) rapportent la présence d'une variation dans le nombre, la position et l'intensité des bandes chez des accessions de *T. campestre*, suggérant que ces bandes sont sous contrôle d'un système de gènes quantitatives.

A la lumière des résultats obtenus, une classification hiérarchique a été élaborée, et les distances génétiques entre les accessions étudiées ont été représentées. On note que les accessions s'organisent en groupes et sous- groupes. En effet, nous avons défini trois groupes majeurs pour les protéines totales et quatre groupes pour les albumines, et deux groupes majeurs pour la fraction des globulines. La structuration des différentes accessions et la classification hiérarchique des groupes obtenus mettent en relief le degré de similarité et de diversité entre les accessions. Par contre, ce regroupement n'a pas été clairement corrélé aux origines géographiques.

*Conclusion et
Perspectives*

Ce travail de recherche s'inscrit dans le cadre de la valorisation des ressources phylogénétiques. Il a pour objectif l'appréciation de la variabilité génétique au sein de l'espèce *T. campestre* représentée par 23 accessions collectées dans différentes régions dans le Nord Algérien.

Deux protocoles d'extraction ont été employés : l'un sur des feuilles de plantules pour extraire les enzymes (glutamate oxaloacétate transaminase et estérase) et l'autre sur des graines matures pour isoler les protéines (protéines totales, globuline, albumine). Pour optimiser l'expression des marqueurs, nous avons réalisé une électrophorèse en conditions non dénaturantes (PAGE) pour mettre en évidence les enzymes et une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pour séparer les protéines.

L'analyse électrophorétique des deux systèmes enzymatiques (EST et GOT) et des trois fractions protéiques (protéine totale, albumines et globulines), nous a permis de :

- Identifier les disparités dans les profils protéiques et enzymatiques parmi les différentes accessions étudiées.
- Examiner la diversité génétique au niveau intra-spécifique, permettant d'estimer les distances génétiques entre les pools géniques en tenant compte de leurs origines géographiques.
- Établir la présence de 16 allozymes pour les deux systèmes enzymatiques, avec 6 allèles pour le GOT et 10 pour l'EST, présentant des fréquences variables.
- Recenser un total de 63 bandes à travers les trois fractions examinées, présentant des fréquences considérablement variables, dont 15 bandes pour les protéines totales, 22 pour les albumines et 26 pour les globulines.
- Observer un polymorphisme dans les profils protéiques des graines entre la plupart des accessions.
- Enregistrées des bandes protéiques rares et communes parmi les différentes accessions.
- Effectuer une caractérisation phylogénétique des différentes accessions étudiées à travers une classification hiérarchique en UPGMA.

Le degré de polymorphisme observé peut être lié à des facteurs génétiques ou bien à des facteurs externes, cela peut expliquer les différences protéiques et enzymatiques qui existent au niveau des populations qui appartiennent à la même espèce.

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

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

- Mieux apprécier cette diversité et confirmer les résultats obtenus au moyen d'autres marqueurs biochimiques et moléculaires.
- Approfondir les connaissances sur cette espèce pour une meilleure valorisation dans les domaines de l'écologie, agriculture, industrie et médicale.
- Essayer de comprendre les mécanismes d'adaptation de ce groupe de plante.
- Elargir le champ d'application des techniques de l'électrophorèse PAGE et SDS-PAGE, et étudier d'autres genres et d'autres espèces pour la préservation de la diversité biologique et des ressources génétiques.
- Essayer de corrélérer ces résultats avec d'autres études.

Référence
Bibliographies

- Amouri AA, Fyad Lamèche FZ, Yahia N (2014) Genetic diversity of seed storage protein in *Medicago truncatula* genotypes in relation with salt stress tolerance. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7 (2): 55-59.
- Amouri AA, Fyad Lamèche FZ, Yahia N (2014). Genetic diversity of seed storage protein in *Medicago truncatula* genotypes in relation with salt stress tolerance. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7 (2): 55-59.
- Andersson MS, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano CE (2006) Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field crops Research* 96: 387-406.
- Ayadi M (2011) *Variabilité de la tolérance à la salinité chez des espèces annuelles du genre Medicago*. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister. Université D'Oran EsSenia.
- Azani N, Babineau M., Bailey CD, Banks H, Barbosa A, Pinto RB., et al (2017) A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny – The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). *Taxon* 66, 44–77. doi:10.12705/661.3.
- Bates C (s.d.) What is *Trifolium Campestre* used for. Consulté le 03 07, 2024, sur greenpacks: <https://greenpacks.org/what-is-trifolium-campestre-used-for/>.
- bean. *Plant Physio.* 61: 1316.
- Bendiab K, Baaziz M, Brakez Z, Sedra H (1993) Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny.
- Blagrove, Gillespie (1978) comparative studies on the proteins from seeds of *Lupinus angustifolius* L. *journal of plant physiology.* 5: 651-663.
- Boulter D, Thurman DA, Derbyshire E (1967). A Disc Electrophoresis Study of Globulin Proteins of Legume Seeds with Reference To Their Systematics. *New Phytologists*, 66: 27– 36.
- Boulter D, Thurman DA, Turner BL (1966) The Use of Disc Electrophoresis of Plant Proteins in Systematics. *Taxon*, 15: 135.
- Boulter D, Thurman DA, Turner BL (1966) The Use Of Disc Electrophoresis Of Plant Proteins in Systematics. *Taxon*, 15: 135.
- Broughton WJ, Hernandez G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J (2003) Beans (*Phaseolus* spp) model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.

- Burris R.H. & Roberts G.P (1993) Biological nitrogen fixation. Annual review of nutrition.13 (1), 317-335.
- Cannon SB, McCombie WR, Sato S, Tabata, S, Denny R, Palmer L, Katari M., ... A. B (2008) physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv. In J. I. Sprent (Ed.), evolution and Diversity of Legume Symbiosis (pp. 347-361). Springer.
- Clapham A.R., Tutin T.G., Warburg E.F. (1962) Flora of the British Isles. Secon edition. Cambridge- At the university press. P: 338 - 346.
- Cronk QC (2001) Plant evolution and development in a post-genomic context. *Nature Reviews genetics* 2: 607-619.
- Cui Z, Carter TE, Jr, Burton JW, Wells R (2001) Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *Crop Sciences* 41: 1954-1967.
- Dekkers JCM, Hospital F (2002) The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev, Genet.* 3, 22-32.
- Doyle JJ (1998) Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and
- Eagles HA, Bariana HS, Ogonnaya FC, Rebetzke GJ, HOLLAMBY GJ, Henry RJ, Henschke PH, Carter M (2001) Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 52 (11–12), p. 1349–1356.
- Edsall, Marian S (1985) Roadside Plants and Flowers. The University of Wisconsin Press, Madison WI.
- El Aoufir A (2001) Etude du flétrissement vasculaire du Pois chiche causé par le *Fusarium oxysporum* f.sp. Ciceri. Evaluation de la fiabilité de l'analyse iso enzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec.
- Ellison NW, Liston A, Steiner JJ, Williams WM, Taylor NL (2006) Molecular phylogenetic of the clover genus (*Trifolium*-Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 688-705.
- Fabre P (2013) *Trifolium campestre* .
- Foote E, Duncan W (1975) Wildflowers of the Southeastern United States. University of Georgia press. Athens, GA.
- Foury A (1954) Les légumineuses fourragères au Maroc. In : Les cahiers de la recherche Agronomique. Service de la Recherche Agronomique et de l'Expérimentation Agricole, Rabat. pp. 289-656.
- Franco E, Ferreira RB, Teixeira AR (1997) Utilization of an Improved Methodology To Isolate *Lupinus albus* Conglutins in the Study of Their Sedimentation Coefficients.

- Frank V (2007) self-made Date: created 30. Nov. 2007 Author: Frank Vincentz.
- Gillet JMX, Taylor NL (2001) *The World of Clovers*. Iowa State University Press, Ames, USA.
- Goldblatt P (1981) Cytology and phylogeny of Leguminosae. In: *Advances in Legume systematics, Part 2*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. pp. 427-463.
- Goldblatt P, Johnson DE (2003) *Tropicos database: index to plant chromosome numbers*, Missouri botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA.
- Gomez OJ, Blair MW, Frankow-Lindberg BE, Gullberg U (2004) Molecular and Phenotypic diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sciences* 44 : 1412- 1418.
- Gouyon PH (1994) La biodiversité dans sa perspective historique, in le courrier de l'environnement de L'INRA n°23, novembre 1994.
- Guignard JL, Dupont F (2005) *Botanique*. 13ème Edition Masson, Paris. pp. 336.
- Haddioui A, Zinelabidine LH, Nouri M, Ajal EA, El Hansali M, Hanine H (2012)
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For*, 6: 95–124.
- Harry M (2001) *Génétique moléculaire et évolutive*. Editions Maloine, Paris.
- Hendrych R (1976) Vorläufige Mitteilung zur Gattung *Chrysaspis* Desvaux (1818). *Preslia* 48 : 216-224.
- Issolah R (1991) Etude du comportement de populations spontanées de treize (13) espèces du genre *Trifolium* L. Thèse ing. INA. El - Harrach. 235P.
- Issolah R, Abdelguerfi A (1998) Etude de la variabilité de 31 populations spontanées de *Trifolium campestre* Schreb. Relations avec les facteurs du milieu d'origine. *Recherche Agronomique. INRAA*. N° 2 : 43-54.
- Johnson BL, Hall O (1965) Analysis of phylogenetic affinities in *Triticinae* by protein electrophoresis. *American Journal of Botany*, 52: 506–513.
- Judd WS, Campbell CS, Jules Bouharmont, Kellogg EA, Stevens P (2001) *Botanique systématique : une perspective phylogénétique*. Edition de boeck, Amazon France.
- Khokhrjakov AP (1998) *Bobrova*. *Khokhr: genus novum familia Fabaceae*. *Novosti Sistematiki vysshikh Rastenii* 137-139.
- Konard L (2012) présentation morphologique du genre *trifolium*, *trifolium pratense*. *Lpratens*, l.s.sh.
- Ladizinsky G, Hymowitz T (1979) Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 54: 145–151.

- Ladizinsky G, Hymowitz T (1979) Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 54: 145–151.
- Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lapeyronie A (1982) Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. Maisonneuve et Larose, Paris.
- Lee G J, Wu X, Shannon JG, Sleper D A, Nguyen HT (2007) Chapter 1: Soybean. *Genome mapping and Molecular Breeding in Plants Oilseeds, Volume 2: 1-53*. C.
- Lévêque C (2001) *Ecologie : De l'écosystème à la biosphère*. Masson Sciences. Dunod, Paris. 502p.
- Lewin B (1992) *Genes*. Flammarionmédecine-science, Paris.
- Lewis GP, Schrire BD, Mackinder BA, Lock M, editors (2005) *Legumes of the World*. Royal botanic Garden, Kew, UK (in press).
- Lokil (2008) Description= |Source=self-made |Date= |Author= Loki l |Permission=|other versions=} } bloemdiagram.
- Marchand L (1999) Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. *J Natl Cancer Inst Monogr*: 101-105.
- Margalé E, Chèvre AM, Delourme R, Hervé Y (1994) Description de la diversité génétique chez *Brassica oleracea* à l'aide de marqueurs isoenzymatiques et moléculaires. *Genet Sel Evol* 26. Suppl 1, 137s-153s.
- Markert CL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 45 : 753-763.
- Markert CL, Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 45: 753-763.
- Medoukali (2016) Carte de répartition du genre *trifolium*.
- Osborne TB (1924) *The Vegetable Proteins*; Longmans, Green: London.
- Parizeau ME (1997) *La biodiversité*. Edition de boeck, Bruxelles.
- Polhill RM, Raven PH, Stirton CH (1981) Evolution and systematics of the leguminosae. In: *advances in legume systematics Part 1*. Royal Botanic Gardens Kew, UK. pp.1-26.
- Prat D, Faivre Rampant A, Prado (2006) « Analyse du Génome et Gestion des ressources génétique forestières ». INRA Edition. P456.
- Presl CB (1831) *Trifolium*. In: *Symbolae Botanicae*. Calve JG, Prague. pp. 44-50.
- Pritchard AJ (1962) Number and morphology of chromosomes in African species in the genus *trifolium* L. *Australian Journal of Agricultural Research* 13: 1023-1029.

- Quézel P, Santa S (1962) Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Cnrs. paris.
- Raven PH, Evert RF, Eichlorn SE (2000) Biologie végétale. 6ème Edition de boeck, Paris.
- Rdonald M (2020) *Trèfle couché*. Consulté le 03 09,2024, sur Wikipédia : https://fr.wikipedia.org/wiki/Tr%C3%A8fle_couch%C3%A9.
- Roskov YR (1990) The new species and the new nomenclature combinations in the genera *lupinaster*, *Chrysaspis*, *Trifolium* and *Amoria* (Fabaceae). *Botanicheskii Zhurnal* 75 : 715- 720.
- Simon J-P (2005) Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les légumineuses. Préparés pour le département de Sciences biologiques. Université de Montréal.
- Singh NK, Shepherd KW, Cornish GB (1991) A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal science*, 14 :203-208
- Small E (1987) Reduction of Ursiato *Trifolium*. *Taxon* 36: 578-583.
- Sobti S, Belhadj HA, Djaghoubi A (2015) Isolation and Characterization of the Native Rhizobia under Hyper-Salt Edaphic Conditions in Ouargla (southeast Algeria). *Energy Procedia*, 74, 1434-1439.
- Soják J (1986) Nové jméno pro Galearia Presl. *Cas. Nár. Muz. (Prague)* 154, 35.
- Sprent JI (1995) Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry* 27(4/5): 401-407.
- Steiner JJ, Robinson WA, Liston A, Taylor NL (1997) ITS and RAPD phylogenetic hypotheses and the ecological distributions of North American *Trifolium* L. (Fabaceae). *American Journal of botany* 84: 235-236.
- symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* 3(12): 473-478.
- Tanksley SD, Orton TJ (1983) Isozymes in plant genetics and breeding. *Elsevier*, Amsterdam.
- Taylor NL, Quesenberry KH, Anderson MK (1979) Genetic system relationships in *Trifolium*. *economic Botany* 33: 431-441.
- Tourene, C (2018) Diversité et évolution des Fabacées. *Revue de botanique*, 41(2), 123-145.
- Vescovi P (1978) Nouvelles précisions apportées sur le fonctionnement du point végétatif par l'étude de deux trèfles à phyllotaxie spirodistique, le *Trifolium pratense* L et le *Trifolium campestre* schreb. Départ/Région : Bulletin de la Société Botanique de France, 4, Tome 125 - Fascicule 1-2. p.45- 64. Consulté le 03 05, 2024, sur tela-botanica : <https://www.tela-botanica.org/bdtfx-nn-75495-synthese>.

- Vienne (1998) Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologique végétale. INRA, paris.
- Weeden NF, Wendel JF (1990) Genetics of plant isozymes, In: Soltis DE, Soltis PE (Eds). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland, pp 46-72.
- Williams J, Kubelik JL, Livak JA, Rafalski, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by random primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531- 6535.
- Yemm EW (1958). The plant proteins and peptides and their localization in cells and tissues. *Der Stickstoffumsatz / Nitrogen Metabolism*, Pp 315-332.
- Youle RJ, Huang AHC (1978) Albumin storage proteins in the protein bodies of castor
- Young ND, Mudge J, Ellis TH (2003) Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology* 6 : 199-204.
- Zatout M, Berrekia R, Abdelguerfi A (1989) Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *trifolium* L. en Algérie : Répartition en fonction de quelques facteurs dumilieu. XVI Congrès international des herbages. Nice - France: 281 - 282.
- Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC (2005) Bridging Model and Crop Legumes through comparative Genomics. *Plant Physiology* 137: 1189-1196.
- Zohary M (1972) Origins and evolution in the genus *Trifolium*. *Botaniska Notiser* 125: 501-511.
- Zohary M, Heller D (1984) The genus *Trifolium*. Israel Academy of Sciences and Humanities, jerusalem.

ANNEXES

ANNEXE 1.

Protocole de germination

- Mettre les grains dans 5 volumes de l'acide sulfurique (H_2SO_4), concentré pendant 8 min avec une agitation intermittente.
- Mettre les grains dans 5 volumes de 5% de sodium hypochlorite pendant 3 min.
- Décant l'eau de javel sous des conditions stériles (haute à flux laminaire).
- Rincer les grains par de l'eau distillée stérile 6 à 8 fois.
- incuber les graines pendant 1 heure dans le dernier rinçage.
- une fois gonflée, elles sont 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 2. Révélation des enzymes

D'après Bendiab et al, 1993.

Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT) = Aspartate aminotransferase (AAT). E.C. 2.6.1.1.

- Acide -L- Aspartique 0.25 g
- Acide alpha-cétoglutarique 0.1 g
- Tampon 50 ml, 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 :

- Fast Blue BB 0.2 g
- Tampon 25 ml -Tris-Hcl 0.5M, pH 7.2 - H₂O (q.s.p) 100 ml

Incuber à 37 °C jusqu'à l'apparition des bandes.

Estérases (EST). E.C. 3.1.1.

- α -Naphtylacétate (se dissout dans l'acétone à 50%) 0.03 g
- Tampon (q.s.p) 100 ml, 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 :
- Fast Blue RR salt 0.14 g
- Tampon Tris-HCl 25 ml, pH 7.2
- H₂O (q.s.p) 100 ml

ANNEXE 3. Solutions pour la préparation des gèles**Tampon Tris-HCl pH : 8,8** (Conserver à 4°C)

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

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

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

Solution stock de SDS à 10% Stocker à température ambiante

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

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

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

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

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

Gel de concentration (stacking gel) à 5%

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

ANNEXE 4.**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 bien mettre en agitation avant utilisation		Qsp 250 ml

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).

RESUMES

Les marqueurs biochimiques contribuent de manière directe à la compréhension du monde végétal, ils sont désormais un caractère clé aussi bien à l'étude de la biodiversité qu'en recherche fondamentale, tout en conditionnant un certain nombre de caractères écologiques de la plante elle-même.

Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des accessions collectées dans 23 sites éco-géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le Nord Algérien. Pour chaque protéines les distances Euclidiennes ont été calculées et un dendrogramme a été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les accessions ont été élaborées également.

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

Globalement, l'espèce étudiée a généré 16 bandes pour le GOT et EST, 15 bandes de protéines totales, 22 bandes d'albumines et 26 bandes de globulines, dont les fréquences sont variables d'une accession à une autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, il y a quelques bandes spécifiques à certaines accessions.

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

Mots clés : *T. campestre*, *Trifolium*, Albumines, Globulines, GOT, EST, polymorphisme.

Abstract

Biochemical markers contribute directly to the understanding of the plant world, now being a key characteristic in both biodiversity studies and fundamental research, while also conditioning a number of ecological traits of the plant itself. Our study aims to highlight a possible genetic variability of accessions collected from 23 eco-geographical sites covering a wide range of bioclimatic stages in Northern Algeria.

The variability of proteins was analyzed based on the presence and absence matrix of bands. Their frequency was calculated across all accessions. For each protein fraction, Euclidean distances were calculated, and a dendrogram was constructed using the UPGMA agglomerative method. Genetic distance matrices between accessions were also elaborated.

Overall, the studied species generated 16 bands for GOT and EST, 15 bands for total proteins, 22 bands for albumins and 26 for globulins, with frequencies varying from one accession to another. Several bands were shared by two or three accessions, and there were some bands specific to certain accessions. The correlation with the geographical origins of the accessions, as well as the correlation between the polymorphism generated by the three protein fractions, was weak, with a less significant correlation with enzymatic polymorphism.

The results obtained lead to the conclusion that there is enzymatic and protein polymorphism among the different accessions studied, as evidenced by the number of bands recorded and their variability.

Key words: *T. campestre*, *Trifolium*, Albumines, Globulines, GOT, EST, polymorphisme.

العلامات البيوكيميائية يساهم مباشرة في فهم العالم النباتي، وأصبح سمة رئيسية في دراسة التنوع البيولوجي والبحث الأساسي، مما يؤثر أيضًا على عدد من السمات البيئية للنبات نفسه.

تهدف دراستنا إلى تحديد التباين الوراثي المحتمل و هذا بدراسة نوع من جنس *Trifolium (T. campestre)*، ممثلًا بعينات جمعت من 23 موقعًا إيكوجيوغرافيًا في شمال الجزائر، والتي تغطي مجموعة واسعة من الطبقات البيومناخية.

تم تحليل تباين البروتينات بناءً على مصفوفة الوجود والغياب للشرائط. تم حساب تردداتها عبر جميع العينات. لكل بروتين، تم حساب المسافات الإقليدية وتم بناء مخطط شجري باستخدام طريقة UPGMA التجميعية. تم إعداد مصفوفات المسافات الجينية بين العينات أيضًا.

بشكل عام، أنتجت السلالة المدروسة 16 شريطًا لـ GOT و EST ، 15 شريطًا للبروتينات الكلية، و 22 شريطًا للألبومينات و 26 شريطًا للجلو ولينات، وتختلف تردداتها من عينة إلى أخرى. من بين هذه، تمت مشاركة العديد من الشرائط بين اثنين أو ثلاث عينات، وهناك بعض الشرائط الخاصة ببعض العينات. كانت الارتباط بين المصادر الجغرافية للعينات، وكذلك الارتباط بين التعدد الوراثي الذي يتم إنشاؤه بواسطة الفرق الثلاثة للبروتينات، ضعيفًا، وكان هناك ارتباط أقل مع التعدد الوراثي للإنزيمات.

تتيح النتائج المحصل عليها الاستنتاج بأن هناك عددًا وراثيًا وبروتينيًا بين العينات المدروسة، مما ينعكس في عدد الشرائط المسجلة وتباينها.

الكلمات المفتاحية: Trifolium ، T. campestre ، EST ، GOT ، Albumin ، Globulins.

Année universitaire : 2023-2024

Présenté par : BECHKIT FATIMA ZOHRA
ELGOUACEM YASMINE ZOHRA

La diversité génétique au sein de l'espèce *Trifolium campestre* (leguminosae), évaluée par les marqueurs Enzymatiques et protéiques

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Résumé :

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

Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des accessions collectées dans 23 sites éco-géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le Nord Algérien.

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

Globalement, l'espèce étudiée a généré 16 bandes pour le GOT et EST, 15 bandes de protéines totales, 22 bandes d'albumines et 26 bandes de globulines, dont les fréquences sont variables d'une accession à une autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, il y a quelques bandes spécifiques à certaines accessions.

La corrélation avec les origines géographique des accessions ainsi que, la corrélation entre le polymorphisme généré par les trois fractions protéiques a été faible avec une corrélation moins importante avec le polymorphisme enzymatique.

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

Mots-clefs : *T. campestre*, *Trifolium*, Albumines, Globulines, GOT, EST, polymorphisme.

Laboratoires de recherche : laboratoire de génétique Biochimie et Biotechnologie végétales. UConstantine 1 Frères Mentouri).

Président du jury : KHEDARA ABD EL KARIM (MCA -UConstantine 1 Frères Mentouri).

Encadrant : MEDOUKALI IMANE (MCB - UConstantine 1 Frères Mentouri).

Examineur(s) : MOUSSAOUI SAMIRA (MCB - UConstantine 1 Frères Mentouri).