

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Constantine1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale
Filière Sciences Biologiques

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master en
Biologie et Génomique Végétales

Thème

Etablissement du caryotype d' *Hedysarum carnosum* Desf.
Et *Hedysarum spinosissimum* L. ssp *capitatum*

Présenté par : M^{elle} MARMI Imene

Soutenu le : 22 juin 2014,

Devant le jury d'évaluation :

Président (e) : Pr. KHALFALLAH Nadra

Professeur à l'université Constantine 1

Encadreur : Dr. BENHIZIA Hayet

M.C à l'université Constantine 1

Examineur : Mr. BAZIZ Karim

M.A.A à l'université de Batna

Année universitaire 2013-2014

Remerciements

Avant tout, le remerciement à 'ALLAH' le bon dieu qui nous a aidé et nous a donné la capacité, la volonté et le courage pour terminer nos études du primaire jusqu'à ce jour 'Alhamdolillah'

Ce manuscrit résume un travail de 4 mois que nous avons effectué au sein de l'université « Constantine 1, et laboratoire de cytogénétique, cet aboutissement n'aurait pas été possible sans l'aide et la présence directe et indirecte des nombreuses personnes, et c'est dans ces quelques lignes que le mot 'MERCI' prendra tout son sens.

Merci à ma directrice de mémoire Mme Benhizia. H. pour la confiance que vous m'avez donnée, votre gentillesse, votre disponibilité et votre soutien pendant la période de travail.

Mes remerciements s'adressent également à madame la présidente Khalfallah .N professeur à l'Université Constantine 1 pour avoir accepté d'évaluer et de juger notre travail.

Merci à Mr Baziz .k Pour avoir accepté d'évaluer et de juger notre travail. et ses précieux conseils.

Un grand merci à Melle Djeghar .R, ingénieur du laboratoire de cytogénétique pour son aide, et sa patience et sa gentillesse.

Je remercie, pour leur aide, toutes les personnes de près ou de loin qui ont bien voulu m'apporter leur appui dans la réalisation de ce mémoire

Un profond merci à ma famille et mes amies.

J'adresse un grand merci à tous les membres de M2 pour les merveilleux souvenirs passés parmi eux.

Dédicace

Je dédie ce travail à mes parents, mes Frères et ma grande famille.

A tous les miens.

Résumé

La cytogénétique de part sa nature investigatrice participe d'une manière importante aux études de taxonomie et de phylogénie, les techniques classiques qui permettent une vision morphologique de la cellule en métaphase ont rendu possible le dénombrement des chromosomes et l'établissement des caryotypes.

Notre étude a porté sur deux espèces annuelles du genre *Hedysarum* L. *H. carnosum* Desf. et *H. spinosissimum* L ssp *capitatum*. Nous avons appliqué la technique de Feulgen afin de déterminer le nombre chromosomique et établir leurs caryotypes respectifs. Une deuxième technique (C-banding) a été appliquée pour étudier la structure des chromosomes et donc déterminer l'emplacement et la quantité d'hétérochromatine constitutive. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par plusieurs auteurs et confirment que les espèces étudiées présentent un nombre chromosomique diploïde ($2n = 2x = 16$ chromosomes). Les chromosomes sont de type métacentrique. Les bandes hétérochromatiques sont localisées généralement dans la région intercalaire et télomérique.

Mots clés : *Hedysarum* L; *H. carnosum* ; *H. spinosissimum* L ssp *capitatum* ; caryotype ; chromosomes ; Hétérochromatine; C-banding.

Abstract

Cytogenetic by its investigative nature participates in an important way to study taxonomy and phylogeny. Conventional techniques that allow a morphological view of cells in metaphase made possible the chromosome enumeration and the establishment of the karyotypes.

Our study focused on two annual species of the genus *Hedysarum* L. *H.carnosum* Desf. and *H. spinosissimum* L. ssp *capitatum*, both species were treated by the Feulgen protocol to determine the chromosome number and establish their respective. A second technique (C-banding) was applied to study the structure of chromosomes and thus determine the location and amount of constitutive heterochromatin.karyotype.

Our results are consistent with those obtained by several researchers and confirm that the studied species have a diploid chromosome number ($2n = 2 \times 16$ chromosomes). Chromosomes are metacentric. The bands heterochromatis are located in the region intercalative et télomérik.

Key words: *Hedysarum* L; *H.carnosum* Desf; *H. spinosissimum* L karyotype; chromosomes; Heterochromatin; C-banding;

ملخص

علم الوراثة الخلوية بطبيعته الحقيقة يساهم بشكل مهم في الدراسات الخاصة بعلوم التصنيف و تطور السلالات. التقنيات التقليدية التي تسمح بعرض morphological الخلية أثناء المرحلة الإستوائية (الطورية) تجعل من الممكن حساب الكروموزومات و إنشاء الطابع النووي.

عملنا كان على نوعين سنويين من جنس: *Hedysarum L.*; *Desf H.carnosum ssp ;spinosissimum L.* *capitatum*, من النوعين تم علاجه. ببروتوكول Feulgen لتحديد عدد الكروموزومات و إنشاء الطابع النووي الخاص بهما. ثم كشفنا عن الكروموزومات الخاصة لكل نوع منهما. تقنية أخرى C-banding استعملت لدراسة تركيبية الكروموزومات و بالتالي توضيح الموقع و كمية الكروماتين البنيوي المغاير.

نتائجنا تتفق مع تلك التي تم الحصول عليها من قبل العديد من الباحثين و تؤكد أن هاذين النوعين لديهما عدد مضاعف من الكروموزومات $2n = 2x = 16$. الكروموزومات من نوع صبغي متوسط القسم المركزي. تمكنا بشكل عام من تحديد نوع و مواقع الكروماتين البنيوي المغاير.

الكلمات المفتاحية: *Hedysarum*; *H. spinosissimum L.*; *H. carnosum Desf.*; الطابع النووي
Heterochromatin; C-banding; الكروماتين البنيوي المغاير.

Sommaires

Introduction	1
Chapitre 1 : synthèse bibliographique	
1- Présentation du genre <i>Hedysarum</i> L.....	3
2- Répartition géographique.....	4
3- présentation des espèces étudiées	4
3-1- <i>Hedysarum carnosum</i> Desf	4
3-1-1- Généralités sur l'espèce <i>Hedysarum carnosum</i> Desf	4
3-1-2- Description botanique d' <i>Hedysarum carnosum</i> Desf	5
3-2- <i>Hedysarum spinosissimum</i> L.....	5
3-2-1- Généralités sur l'espèce <i>Hedysarum spinosissimum</i> L.....	5
3-2-2- Description botanique d' <i>Hedysarum spinosissimum</i> L.....	6
4- Classification botanique des espèces	6
5- Rappel de quelques notions de cytogénétique.....	7
5-1- La chromatine	7
5-1-1- L'euchromatine	7
5-1-2- L'hétérochromatine	7
5-1-3- Rôle de l'hétérochromatine.....	8
6- Les chromosomes.....	9
Chapitre 2 : matériel et méthodes	
1-Matériel	10
2- Méthodes	10
2-1- Technique de coloration au Feulgen.....	10

2-1-1- Germination des graines	10
2-1-2- Prélèvement	10
2-1-3- Prétraitement	10
2-1-4- Fixation.....	11
2-1-5- Conservation.....	11
2-1-6- Hydrolyse acides.....	11
2-1-7- Hydrolyse enzymatique.....	11
2-1-8- Coloration au Feulgen.....	11
2-1-9- Montage et conservation des lames.....	12
2-2- Technique de coloration différentielle au Giemsa « C-banding ».....	12
2-3- Observation microscopique et photographies.....	13
3- Mesures et établissement du caryotype.....	13
3-1- Le caryogramme.....	14
3-2- L'idiogramme.....	14
Chapitre 3 résultats et discussion	
1- Dénombrement chromosomique.....	17
1-2- Etablissement du Caryotype.....	17
1-2-1- <i>Hedysarum carnosum</i> Desf	17
1-2-2- <i>Hedysarum spinosissimum</i> L.....	20
3- C-banding.....	23
Conclusion	25
Références bibliographiques	27

Annexe

Liste des figures

Figure 1. (a) <i>H. carnosum</i> Desf ; (b) Gousses.....	5
Figure 2. (a) <i>Hedysarum spinosissimum</i> L; (b) Graines.....	6
Figure 3. Différents états de la chromatine (Michel, 2008).....	8
Figure 4. Présentation schématique des différents types de chromosome.....	14
Figure 5. Caryotype de l'espèce <i>Hedysarum carnosum</i> Desf.....	19
Figure 6. Caryotype de l'espèce <i>Hedysarum spinosissimum</i> L. ssp <i>capitatum</i>.....	21
Figure 7. (a) L'hétérochromatine chez l'espèce <i>Hedysarum carnosum</i> Desf.	
(b) L'hétérochromatine chez l'espèce <i>Hedysarum spinosissimum</i> L.....	24

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature chromosomique proposée par Levan et al (1964).....	16
Tableau 2. Données numériques de la garniture chromosomique de l'espèce <i>Hedysarum carnosum</i> Desf.....	17
Tableau 3. Données numériques de la garniture chromosomique de l'espèce <i>Hedysarum spinosissimum</i> L.....	20

Introduction

Les légumineuses ou Fabaceae sont classées parmi les Angiospermes, En dicotylédones à gousses. Il s'agit de la troisième plus grande famille des Angiospermes en nombre d'espèces après les *Orchidaceae* et les *Asteraceae*, avec 727 genres et près de 20 000 espèces (Cronk *et al.*, 2006). Les espèces sont des herbes naines de l'Arctique et des montagnes aux immenses arbres des forêts tropicales. Les formes arborescentes prédominent les pays chauds tandis que les formes herbacées caractérisent les régions tempérées. En se basant sur la forme florale, cette famille est divisée en trois sous-familles, deux sont monophylétiques (*Papilionoideae*, *Mimosoideae*) et la troisième paraphylétique (*Caesalpinioideae*) (Guignard et Dupont, 2005). Elles constituent de loin le groupe le plus important de plantes participant à la fixation de l'azote avec des bactéries symbiotiques.

Le genre *Hedysarum* L qui fait partie de la famille des légumineuses, renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames (Baattout, 1991 ; Boussaid *et al.*, 1995). Il est représenté en Afrique du Nord par des espèces faisant partie du groupe méditerranéen en présentant un nombre chromosomique de base $n = 8$ (Issolah *et al.*, 2006).

En Algérie, le genre *Hedysarum* comprend 10 espèces annuelles ou pérennes diploïdes ou tétraploïdes. Les espèces du genre *Hedysarum* présentent un intérêt agronomique, grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par fixation de l'azote atmosphérique, peuvent être exploitées dans la valorisation des régions dégradées, surtout dans les zones arides et semi-arides (Hannachi *et al.*, 2004).

Notre travail s'inscrit dans le cadre de la caractérisation cytogénétique de ce genre; il s'agit d'établir les caryotypes de deux espèces : *H. carnosum* Desf. et *H. spinosissimum* L ssp *capitatum*. Les techniques que nous avons appliquées sont celles de la cytogénétique classique: dénombrement chromosomique, hétérochromatine constitutive

Ce travail est structuré en trois chapitres :

- Le premier chapitre comprend une présentation générale du genre *Hedysarum*, l'aspect botanique des deux espèces étudiées avec un bref rappel de quelques notions de cytogénétique.

- Le deuxième chapitre décrit le matériel végétal et les méthodes employées.
- Le troisième chapitre résume les résultats expérimentaux obtenus lors de l'application des différentes techniques citées plus haut avec leur interprétation.

Enfin, une conclusion dans laquelle on récapitule les connaissances acquises lors de ce travail ainsi que les perspectives et les possibilités de poursuivre des recherches sur ce genre dans le domaine étudié.

Chapitre 1

Synthèse Bibliographique

1- Présentation du genre *Hedysarum* L

Le genre *Hedysarum* qui fait partie de la famille des légumineuses, renferme des espèces annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames (Baattout, 1991 ; Boussaid et *al.*, 1995). Il est représenté en Afrique du Nord par des espèces faisant partie du groupe méditerranéen en présentant un nombre chromosomique de base $n = 8$ (Issolah et *al.*, 2006).

Les espèces du genre *Hedysarum* sont caractérisées par une diversité considérable qui concerne aussi bien la morphologie que les aires de répartition de leurs peuplements. Selon Quezel et Santa (1962), le genre *Hedysarum*. (sainfoin), se caractérise par :

- Calice en cloche, à 5 dents égales ou inégales.
- Pétales à onglet très court.
- Carène obliquement tronquée ou arquée vers l'extrémité.
- Etamines diadelphes (9-1), à tube fendu en dessus.
- Gousse aplatie, divisée en articles monospermes ovales, orbiculaires ou quadrangulaires, se séparant à maturité.
- Feuilles imparipennées à deux stipules latérales.

En Algérie, le genre *Hedysarum* comprend 10 espèces annuelles ou pérennes ou tétraploïdes diploïdes exemple : certaines sont endémiques (*H. naudinianum* Coss et *H. perraLderianum* coss).

En méditerranée on compte :

- **Des espèces diploïdes** : *H. coronarium* L. ; *H. carnosum* Desf. ; *H. spinosissimum* L. avec les deux sous-espèces subsp. *H. capitatum* Desf. Et subsp. *H. euspinosissimum* Briq. ; *H. flexuosum* L. et *H. aculeolatum* Munby. [subsp. *micranthum* (Batt) Maire. et subsp.

mauritanicum (Pomet) Maire].

- **Des espèces tétraploïdes** : *H. pallidum* Desf.; *H. naudinianum* Coss. et *H. perralderianum* Coss.

Les espèces *H. humile* L. ainsi que *H. membranaceum* Coss. Et Bal. ne sont pas définies du point de vue caryologique (Hannachi et al., 2004).

2- Répartition géographique

Les espèces du genre *Hedysarum* sont répandues partout dans le monde, ou elles poussent spontanément sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, présentant ainsi une grande diversité.

En Algérie, le genre *Hedysarum* est représenté par 10 espèces annuelles et vivaces dont plusieurs sont endémiques très localisées, comme *H. naudinianum* et *H. perralderianaum* qui ne se développent qu'en Algérie. *H. carnosum* et *H. pallidum* sont endémiques de l'Afrique du Nord.

Hedysarum aculeolatum Munby présente une répartition Algero-marocaine et *Hedysarum flexuosum* L se caractérise par une répartition libéro-nord- africaine et *Hedysarum humile* L se limite à la région méditerranéenne occidentale et seules *Hedysarum coronarium* L et *Hedysarum spinosissimum* L se développent dans une grande partie méditerranéenne.

3- Présentation des espèces étudiées

3-1- *Hedysarum carnosum* Desf

3-1-1- Généralités sur l'espèce *Hedysarum carnosum*

Hedysarum carnosum est une espèce annuelle, diploïde ($2n = 2x = 16$ chromosomes) et préférentiellement allogame. Elle est endémique de la Tunisie et de l'Algérie (Quezel et Santa, 1962).

D'après Abdelguerfi-Berrekia et *al.*, (1988) . elle se caractérise par un bon développement végétatif et par son aptitude à peupler des terrains arides et salés.

Cette légumineuse pousse dans les oueds sous des pluviométries très réduites (150mm), préfère les sols moyennement calcaires à très calcaires et est plus fréquente sur terrains plats et de faible pente.

3-1-2- Description botanique d'*Hedysarum carnosum*

Plante glabre à feuilles charnues épaisses. Fleurs de 12 à 14 mm, pourprées, en grappes denses s'allongeant à la fructification. On la trouve à El Kantara et Biskra.

Cette légumineuse pastorale est bien représentée dans les parcours naturels. Elle présente un mode de germination et de développement bien adaptés aux variations des conditions du milieu aride (Tela Botanica, 2001). (Figure 1).



(a)



(b)

Figure 1. (a) *Hedysarum carnosum* Desf ; (b) Gousses (Torche, 2006).

3-2- *Hedysarum spinosissimum* L.

3-2-1- Généralités sur l'espèce *Hedysarum spinosissimum*

C'est une espèce méditerranéenne annuelle polymorphe, présente des inflorescences en tête dense (même à la fructification) et atteignant au plus 2cm de long.

Elle se caractérise par des folioles glabrescentes, souvent plus ou moins alternes dans la portion inférieure de la feuille. Elle pousse sur des sols salés à très salés et caillouteux.

La sous espèce *H. spinosissimum* subsp *capitatum*. À allogamie prépondérante, présente des fleurs de 15-20mm et de couleur purpurine ou blanchâtre (Quezel et Santa, 1962)

3-2-2- Description botanique d' *Hedysarum spinosissimum*

Plante annuelle de 5-40 cm, velue blanchâtre, couchée ou ascendante et à racine grêle. Les feuilles sont petites 5 à 8 paires de folioles ovales ou linéaires, tronquées ou échancrées, mucronées, pubescentes en dessous. Les stipules libres et lancéolées-acuminées. Elle présente des fleurs roses, assez grandes (8-12 mm) et rapprochées en grappes très courtes, ombelliformes, sur des pédoncules plus longs que la feuille. Les pédicelles plus courts que le tube du calice. Le calice à gorge coupée transversalement, à dents plus longues que le tube. L'étendard plus long que les ailes et dépassant un peu la carène ;

Les gousses sont formées de 2 à 4 articles arrondis, hérissées d'aiguillons crochus, velus et à bords non ailés. Les graines sont luisantes (Tela Botanica, 2001). (Figure2).



(a)



(b)

Figure 2. (a) *Hedysarum spinosissimum* L; (b) Graines (Toreche,2006).

4- Classification botanique des espèces

Règne : *Plantae*

Classe : Dicotylédones

Ordre : Fabales

Famille : Fabaceae

Genre: *Hedysarum* (L.)

5- Rappel de quelques notions de cytogénétique

5-1- La chromatine

En dehors des divisions cellulaires, l'acide désoxyribonucléique ADN est sous la forme de chromatine interphasique. A l'aide de colorants, on peut révéler sur les chromosomes, des zones de coloration plus ou moins intenses reflétant le degré de condensation de la chromatine. On distingue : l'euchromatine et l'hétérochromatine (Harry, 2001).

5-1-1- L'euchromatine

Elle est constituée de chromatines ou régions chromosomiques qui sont légèrement colorées et relativement déroulées pendant l'interphase. Les régions euchromatiques contiennent la plupart des gènes structuraux (Klug et *al.*, 2007). Cette partie de chromatine a peu de compaction ce qu'il rend son ADN accessible aux enzymes et disponible pour la transcription.

5-1-2- L'hétérochromatine

Elle correspond à une zone fortement colorée qui reste condensée dans le noyau cellulaire durant l'interphase. On distingue deux types d'hétérochromatine : hétérochromatine constitutive et hétérochromatine facultative.

- L'hétérochromatine facultative

Elle correspond à un état de condensation non permanent entraînant l'inactivation des séquences colorantes impliquées (Différences dans le comportement entre deux chromosomes homologues).

-L'hétéchromatine constitutive

Elle représente, un état de condensation permanent de certaines zones, affectant les deux chromosomes homologues. Elle est composée de séquences d'ADN moyennement ou hautement répétées riches en paires de bases GC et se trouve dans des régions spécifiques notamment au niveau des centromères et des télomères.

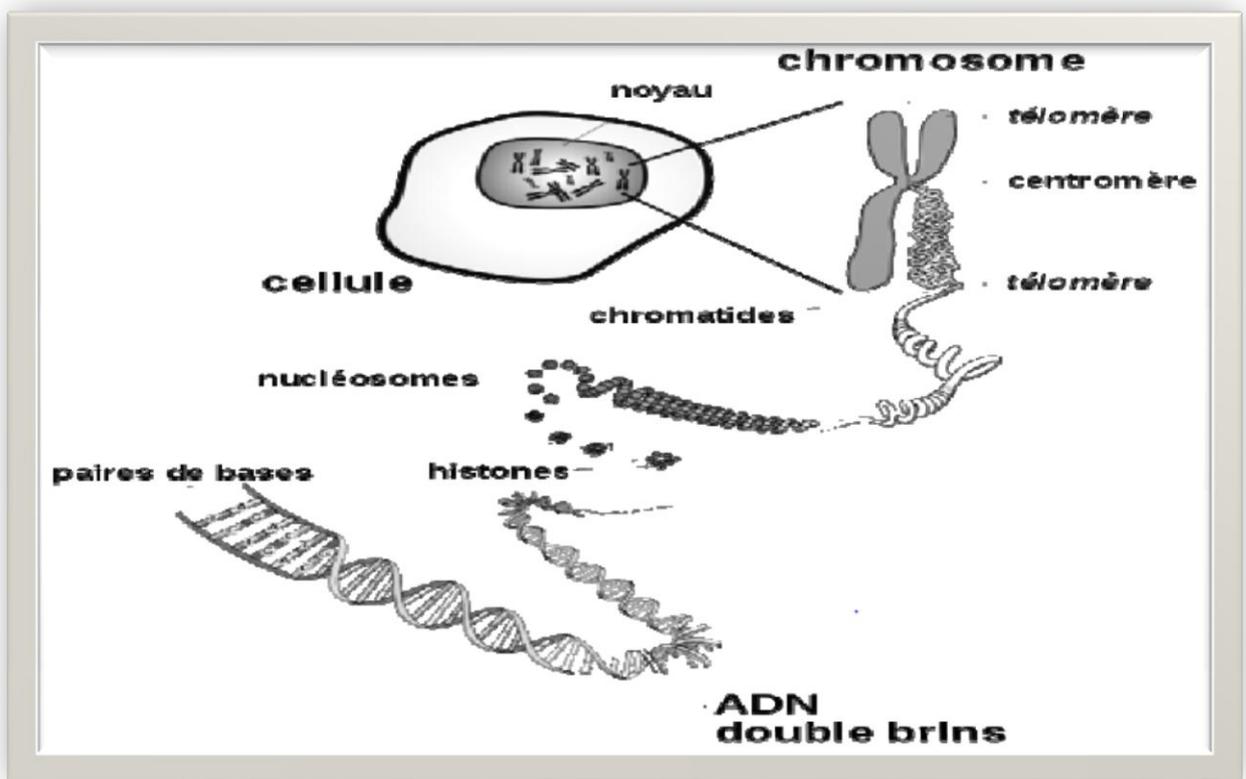


Figure 3. Différents états de la chromatine (Michel, 2008).

5-1-3- Rôle de l'hétérochromatine

L'hétérochromatine joue un rôle important dans la régulation de la méiose (attraction des homologues, régulation des crossing over, formation des chiasmata) surtout dans les conditions écologiques difficiles.

Siljak–Yakovlev (1986) a mis le point sur le rôle très significatif que peut jouer l'hétérochromatine constitutive dans l'adaptation et l'évolution des espèces végétales, ainsi que dans la protection des zones vitales du génome (organiseurs nucléolaires et centromères). L'hétérochromatine constitutive est révélée à l'aide d'une technique de coloration différentielle, le C-banding.

6- Les chromosomes

Ceux sont des structures en forme de bâtonnets faites de chromatine (matériel génétique) nucléaire, visibles pendant la division cellulaire. Sur chaque chromosome sont alignés les gènes dans un ordre fixe. Chaque chromosome porte une zone de constriction primaire dénommée centromère ; c'est le point de liaison des deux chromatides sœurs. Les segments chromosomiques situés de part et d'autre du centromère constituent les deux bras du chromosome. La position du centromère permet de distinguer un bras court ou proximal (bras p) et un bras long ou distal (bras q) (Anthony et *al.* 2002).

Chapitre 2

Matériel et Méthodes

1- Matériel

Le matériel d'étude est constitué de graines de deux espèces, *H. carnosum* et *H. spinosissimum*. Ce matériel a été récolté dans la région de Constantine pour *H. spinosissimum* et *H. carnosum* à été récolté dans la région de Biskra, les deux récoltés ont été effectué par Pr Benhizia 2013. Les deux espèces sont situées dans l'étage bioclimatique semi aride.

2- Méthodes

2-1- Technique de coloration au Feulgen

2-1- 1- Germination des graines

Pour l'étude des chromosomes mitotiques, nous avons travaillé sur des méristèmes racinaires. Les graines sont scarifiées pour lever la dormance tégumentaire.

Après scarification, les graines sont mises à germer dans des boites de Pétri tapissées ambiante pendant trois jours ou plus.

2-1-2- Prélèvement

Pour les prélèvements de ces méristèmes racinaires, nous avons essayé de déterminer le temps pendant lequel le coefficient mitotique était le plus important. Pour nos les deux espèces celui-ci se situe entre 9 h pour les deux espèces.

2-1-3- Prétraitement

Après avoir atteint une longueur de 0.5 à 1 cm, les méristèmes racinaires sont prétraités dans une solution de 8-hydroxyquinoléine à 0.002 M pendant une période de 3 h jusqu'au 3 h 30. Cet agent à pour effet de bloquer les divisions mitotiques au stade métaphasique.

2-1-4- Fixation

Le but de cette étape est :

- De détruire toute vie cellulaire.
- De bloquer les divisions cellulaires en conservant l'intégrité structurale des chromosomes.

Les méristèmes racinaires sont fixés dans une solution d'alcool acétique (3V : 1V) pendant une période de 48 h à 4° C.

2-1-5- Conservation

Les méristèmes racinaires peuvent être conservés dans l'éthanol à 70% au réfrigérateur à 4 °C pendant plusieurs mois jusqu'à la réalisation des écrasements.

période qui ne dépasse pas deux semaines.

2-1-6- Hydrolyse Acides

Dans le but de ramollir les méristèmes et de favoriser leur coloration et leur écrasement ; une hydrolyse a été réalisée dans une solution d'HCl (1N) à 60° C pendant 10 minutes, ce qui libère les groupements aldéhydiques des molécules d'ADN (séparant ainsi les bases puriques).

2-1-7- Hydrolyse enzymatique

Pour assurer un bon étalement des cellules et obtenir les chromosomes dans le même plant, une macération enzymatique est réalisée dans une goutte de l'enzyme R (péctinocellulase) à 37° C pendant 15 à 20 min.

2-1-8- Coloration

Après la digestion, les méristèmes racinaires sont colorés au Feulgen pendant 20 min ou 1 heure. Le colorant se fixe sur les groupements aldéhydiques libérés lors de l'hydrolyse et va donner une coloration rose aux chromosomes à l'observation microscopique. Cette méthode a été décrite pour la première fois par Feulgen en 1929.

2-1-9- Montage et conservation des lames

Les pointes racinaires sont déposées et écrasées dans une goutte d'acéto-orcéine entre lame et lamelle pour assurer la dissociation des cellules et pour obtenir un bon étalement des chromosomes. Les lames sont conservées au congélateur à température de -80 °C.

Les lames conservées à -80°C sont délamellées, séchées et montées dans un liquide de montage (dpx) pour les conserver définitivement.

2-2- Technique de coloration différentielle au Giemsa « C-banding »

Grâce à cette technique, certains auteurs comme Masoud et *al.* (1991); Jahier (1992) et Piumbini et Sylvia (1998), ont effectué des travaux sur les chromosomes des espèces végétales dans le but de détecter les régions riches en hétérochromatine.

Nous avons utilisé la technique décrite par Falistocco et Morelli (1990) sur l'espèce *H. coronarium*.

Après prétraitement, fixation, hydrolyse et digestion enzymatique (étapes décrites dans la coloration au Feulgen), les pointes racinaires sont écrasées dans une goutte d'acide acétique à 45%. Les lames conservées à -80° C sont délamellées, rincées à l'éthanol à 95 % et séchées pendant 24h à température ambiante. Nous avons procédé aux étapes suivantes :

- Dénaturation

Les lames sont trempées dans une solution d'hydroxyde de baryum Ba (OH)₂ à 6 % pendant 8 min à 45 °C.

- Rinçage

Les préparations sont ensuite rincées à l'eau de robinet pendant 15 à 20 min puis dans l'eau distillée à 45 °C pendant 10 min 2 fois.

- Renaturation

Les lames sont transférées dans une solution 2XSSC (0.3 M de Chlorure de Sodium et 0.03 M de Citrate Trisodique) à 60 °C pendant 30 mn.

- Rinçage

A l'eau distillée pendant 10 mn.

- Coloration

Incubation dans le Tampon Sorensen Phosphate pH = 6.8 avec 20 % de Giemsa pendant 20 mn.

- Montage

Les lames sont séchées pendant 24h et montées avec le Dpx.

L'observation des lames et la prise des photographies sont réalisées de la même que la coloration au Feulgen.

2-3- Observation microscopique et photographies

Les cellules de la pointe racinaire sont observées et repérées au microscope photonique à l'objectif (X 10). Le stade de métaphase pour l'ensemble des cellules est repéré au grossissement (X 40). Les cellules qui ont des chromosomes bien étalés, bien colorés sont photographiées avec un microscope ZEISS muni d'une caméra. Les photos sont prises à l'objectif X 100.

3- Mesures et établissement du caryotype

Un caryotype est une représentation systématisée des chromosomes d'une cellule, tenant compte de la taille et de toutes autres formes morphologiques. Il faut noter que la morphologie des chromosomes est marquée par la position des centromères et par conséquent on peut distinguer 4 types chromosomiques (Figure 3).

-**Chromosomes métacentriques** : le centromère est en position centrale (position médiane) ce qui lui donne des bras de longueurs à peu près égales.

-**Chromosomes sub-métacentriques** : le centromère est presque en position centrale ; les chromatides de ce chromosome présentent des bras de longueur inégale (un bras court « C » et un bras long « L »).

- **Chromosomes acrocentriques** : le centromère est plus proche de l'une des deux extrémités (les télomères) le bras court est très bref.

-**Chromosome télocentrique** : présente un centromère très proche de ses télomères.

En cas de perte du centromère (anomalie), le chromosome est dit **acentrique**. D'autres anomalies peuvent provoquer l'apparition d'un chromosome possédant deux centromères nommé **chromosome dicentrique**. Celui-ci est instable et peut se casser (lors de la méiose) (Lemondet et Clément, 1983).

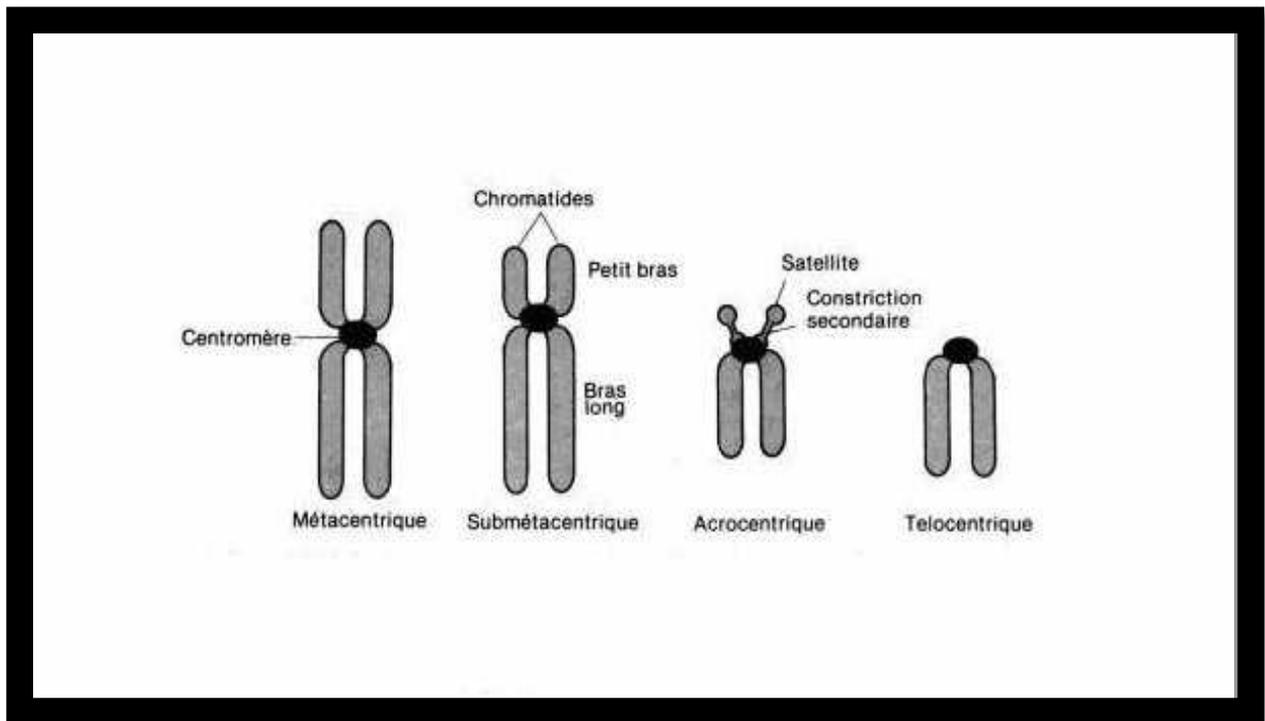


Figure 4. Présentation schématique des différents types de chromosome (André et al. 1983).

3-1- Le caryogramme

Un caryogramme est la représentation systématisée des chromosomes d'une cellule associés d'après leurs caractères morphologiques. Pour établir un caryogramme, il faut connaître pour chaque chromosome : sa morphologie, sa longueur totale (LT) et leur type chromosomique pour pouvoir appairer avec son homologue ; puis classer les chromosomes homologues par longueur totale décroissante.

3-2- L'idiogramme

Un idiogramme est une représentation schématique des chromosomes d'un caryotype à partir de plusieurs caryogrammes d'une même population.

Il est le plus souvent haploïde (sauf s'il y'a une homéologie entre les chromosomes d'une même paire chromosomique dans ce cas là on le présente sous forme diploïde).

Les caryotypes sont construits d'après des mesures effectuées sur trois plaques métaphasiques pour chaque espèce. Les différentes mesures effectuées sont les suivantes :

- longueur du bras long (**BL**)
- longueur du bras court (**BC**)
- longueur totale **LT=BL+BC**
- longueur totale relative **LTR= (LT/Σ LT) X1000**
- rapport bras long sur bras court **r=BL /BC**
- différence entre la longueur du bras long et la longueur du bras court **d=BL-BC**
- indice centromérique pour chaque paire chromosomique **Ic% = (BC / LT) X100**

Nous avons travaillé selon la nomenclature de Levan et *al* (1964).

Tableau 1. Nomenclature chromosomique proposée par Levan et *al* (1964).

Position du centromère	d	r	Ic	Type chromosomique
Position médiane	00.0	01.0	50.5	M
Région médiane	00.0-02.0	1.0-1.7	50.5-37.5	m
Région submédiane	02.5 – 05.0	1.7 – 3.0	37.5 – 25.0	Sm
Région subterminale	05.0 – 07.0	3.0 – 7.0	25.0 – 12.5	St
Région terminale	07.5 – 10.0	7.0 – l’infini	12.5 – 00.0	t
Position terminale	10.0	l’infini	00.0	T

M : métacentrique

m : métacentrique sensu lato

Sm : Submétacentrique

St : subtélocentrique

t : acrocentrique

T : télocentrique

r : bras long / bras court

d : bras long – bras court

Ic : indice centromérique

Chapitre 3

Résultats et Discussion

1- Dénombrement chromosomique

L'observation des plaques métaphasiques a montré que les nombres chromosomiques sont identiques au niveau des plaques métaphasiques des deux espèces *H carnosum* et *H spinosissimum* ssp *capitatum*, et correspondent à des formes diploïdes. Le nombre chromosomique observé est $2n = 2x = 16$ chromosomes soit un nombre de base $n = x = 8$ (Figures 5a et 6a).

1-2- Etablissement du Caryotype

Nous avons trouvés beaucoup de difficultés à établir les caryogrammes des deux espèces étudiées à cause d'une part de la petite taille des chromosomes et d'autre part la grande ressemblance entre les chromosomes.

La description du caryotype repose sur plusieurs paramètres :

La longueur totale (LT), la taille relative (TR), le rapport du bras long sur le bras courts (r), et l'indice centromérique (Ic).

1-2-1- *Hedysarum carnosum* Desf

Les mesures sont effectuées sur les chromosomes de trois plaques métaphasiques. Les données numériques concernant la garniture chromosomique sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 2. Données numériques de la garniture chromosomique de l'espèce
Hedysarum carnosum Desf.

N° paire	BC (µm) ± cd	BL (µm) ± cd	LT (µm)	r	LTR %	Ic %	Tc
1	1.15±0.13	1.49±0.22	2.64	1.29	139.7	43.56	m
2	1.01±0.06	1.47±0.22	2.48	1.45	131.2	40.72	m
3	1.04±0.03	1.39±0.18	2.43	1.33	128.6	42.79	m
4	1.03±0.16	1.35±0.10	2.38	1.31	135.9	43.27	m
5	1.00±0.15	1.32±0.05	2.32	1.32	122.8	43.10	m
6	0.92±0.36	1.34±0.29	2.26	1.45	119.6	40.70	m
7	0.87±0.07	1.32±0.30	2.19	1.51	115.9	39.72	m
8	0.89±0.13	1.30±0.31	2.19	1.46	115.9	40.63	m

$\Sigma BC = 7.91 \mu\text{m}$; $\Sigma BL = 10.98 \mu\text{m}$; $\Sigma LT = 18.89 \mu\text{m}$; $IAS\% = (\Sigma BL / \Sigma LT) \times 100 = 58.12\%$. ± cd: erreur standard.

Le caryogramme de l'espèce est constitué de 8 paires chromosomiques. Ces paires sont numérotées de 1 à 8 selon l'ordre décroissant de leurs longueurs totales.

Le rapport entre la longueur des bras longs et celle des bras courts varie entre 1.29 µm à 1.46 µm. Les valeurs de l'indice centromérique varie de 39.72 µm à 43.56 µm. Ceci indique que les chromosomes sont de type métacentrique.

La formule chromosomique est donc :

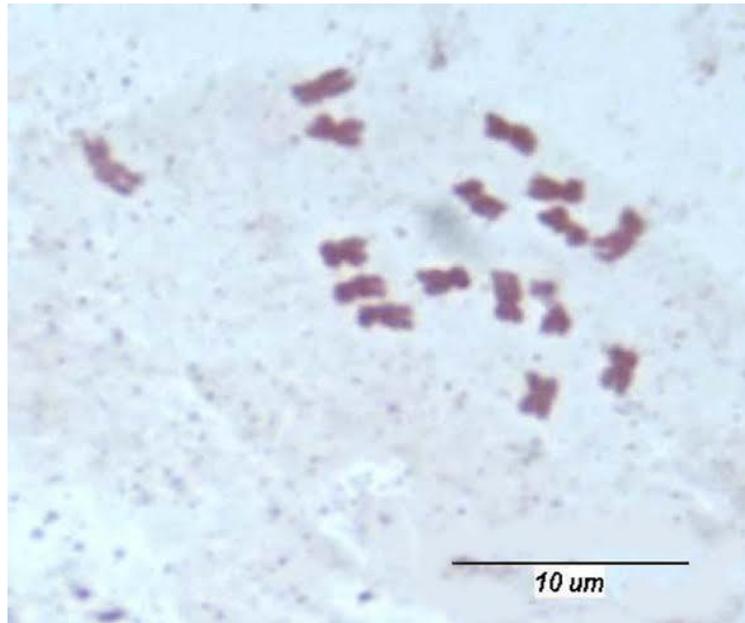
$$2n = 2x = 16 = 8m.$$

La taille des chromosomes varie de 2.19 µm à 2.64 µm. Ceci indique que les chromosomes sont de petite taille. La variation entre les tailles des chromosomes est très faible comme le montre l'idiogramme (Figure 5c).

Figure 5. Caryotype de l'espèce *H. carnosum*

- a)** plaque métaphasique de l'espèce
- b)** Caryogramme
- c)** Idiogramme

a)

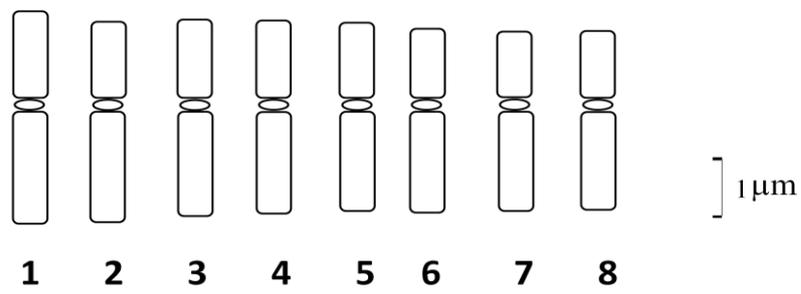


b)



1	2	3	4	5	6	7	8
m							

c)



1-2-2- *Hedysarum spinosissimum* L

Les mesures des chromosomes sont effectuées aussi sur trois plaques métaphasiques. Les données numériques concernant la garniture chromosomique sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 3. Données numériques de la garniture chromosomique de l'espèce *Hedysarum spinosissimum* L

N° paire	BC (µm) ± cd	BL (µm) ± cd	LT (µm)	r	LTR %	Ic %	Tc
1	1.08±0.06	1.52±0.03	2.60	1.40	147.8	41.53	m
2	1.02±0.02	1.34±0.05	2.36	1.31	134.2	43.22	m
3	1.07±0.25	1.35±0.07	2.42	1.26	137.6	44.21	m
4	0.98±0.16	1.24±0.02	2.22	1.26	126.2	44.14	m
5	0.94±0.36	1.29±0.16	2.23	1.37	126.8	42.15	m
6	0.90±0.10	1.04±0.02	1.94	1.15	110.3	46.39	m
7	0.89±0.04	1.12±0.06	2.01	1.25	114.3	44.27	m
8	0.81±0.10	0.99±0.10	1.80	1.22	102.3	45.00	m

Σ BC = 7.69 µm ; Σ BL = 9.89 µm ; Σ LT = 17.58 µm; IAs% = (Σ BL/ Σ LT) x100 = 56.25%.

± cd: erreur standard.

Le caryotype de l'espèce est constitué de 8 paires chromosomiques. Ces paires sont numérotées de 1 à 8 selon l'ordre décroissant de leurs longueurs totales.

Le rapport entre la longueur des bras longs et celle des bras courts varie entre 0.81µm à 1.08 µm. L'indice centromérique varie de 41.53 µm et 46.39 µm. Ceci indique que les chromosomes sont métacentriques.

Le caryogramme est constitué de 8 paires chromosomiques de type métacentrique (m). La formule chromosomique est donc :

$$2n = 2 \times 8 = 16 = 8m.$$

La longueur totale moyenne des chromosomes varie de 1.80 à 2.60 µm. Ceci indique aussi que les chromosomes sont de petite taille. La variation entre les tailles des chromosomes est très faible comme le montre l'idiogramme (Figure 6b et c).

Figure 6. Caryotype de l'espèce *H. spinosissimum* ssp *capitatum*.

a) plaque métaphasique

b) Caryogramme

c) Idiogramme

a)

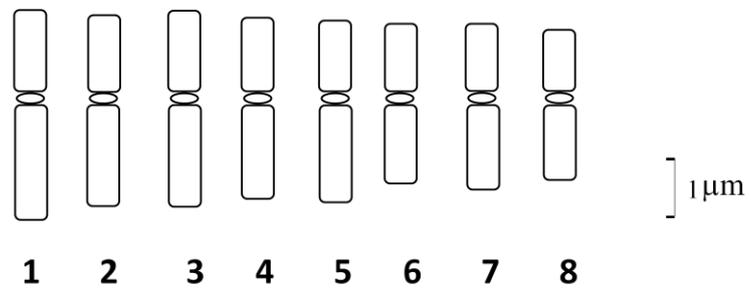


b)



1	2	3	4	5	6	7	8
m							

c)



L'étude comparative entre les deux espèces *H. carnosum* et *H. spinosissimum* montre que le nombre de ploïdie est stable $2n = 2x = 16$ chromosomes. Donc elles ont des caryotypes diploïdes. Les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par Abdelguerfi- Berrekia *et al.* (1988).

Comme il a été signalé avant, les deux espèces présentent des chromosomes de taille réduite. La taille des chromosomes varie de 1.80 μm à 2.64 μm , ces valeurs montrent que les chromosomes sont de petite taille mais plus grand que les autres espèces étudiées du même genre comme *H. pallidum* LTG = 1.71 μm , *H. coronarium* LTG = 1.97 μm à 1.28, *H. aculeolatum* LTG = 1.99 μm à 1.44 μm (Issolah *et al.*, 2006). En comparaison avec la taille moyenne des chromosomes végétaux qui est de 6 μm (Jahier *et al.* 1992).

Akpinar et Yildiz (1999) ont établi pour la première fois le caryotype des espèces turques *H. nitidum* Willd, *H. pestalozzae* Bross. et *H. varium*. Ces espèces sont toutes diploïdes à $2n = 2x = 16$ chromosomes. Leurs caryogrammes sont constitués également de chromosomes métacentriques.

Les caryogrammes et les idiogrammes des deux espèces étudiées ne montrent pas une grande variation dans la taille des chromosomes.

Stebbins (1958 et 1971) propose une classification des espèces suivant leur degré d'asymétrie. Un caryotype symétrique présente des chromosomes de taille voisine ayant des centromères médians ou submédians, ce qui lui donne un aspect homogène. Par contre, un caryotype asymétrique possède des chromosomes à centromère subterminal ou terminal, et une différence importante entre les longueurs relatives des chromosomes de la même garniture.

L'indice d'asymétrie calculé de l'espèce *H. carnosum* est de 58.12% et pour *H. spinosissimum* est de 56.25%. Ces valeurs sont faibles et indiquent que les caryotypes des deux espèces sont symétriques et primitifs tant pour la forme que pour la taille des chromosomes.

3- C-banding

L'hétérochromatine se présente sous forme de blocs, de bandes ou de points (l'hétérochromatine diffuse), et sa position peut être terminale (télomère), intercalaire ou centomérique (Siljak-Yakovlev 1986).

La coloration différentielle au Giesma (C-banding) est réalisée pour étudier la structure des chromosomes. Cette technique permet de mettre en évidence la composition et la disposition des bandes hétérochromatiques dans chaque paire chromosomique.

Le genre *Hedysarum* présente en général des chromosomes de petite taille, raison pour laquelle il est difficile d'obtenir des métaphases avec la technique du C-banding.

La première analyse de la distribution de l'hétérochromatine constitutive au sein des chromosomes, montrent que le nombre des bandes n'est pas élevé. Ceci est peut être lié au faible contenu en hétérochromatine comme le souligne Falistocco et Maurelli (1990) Pour *H. coronarium*.

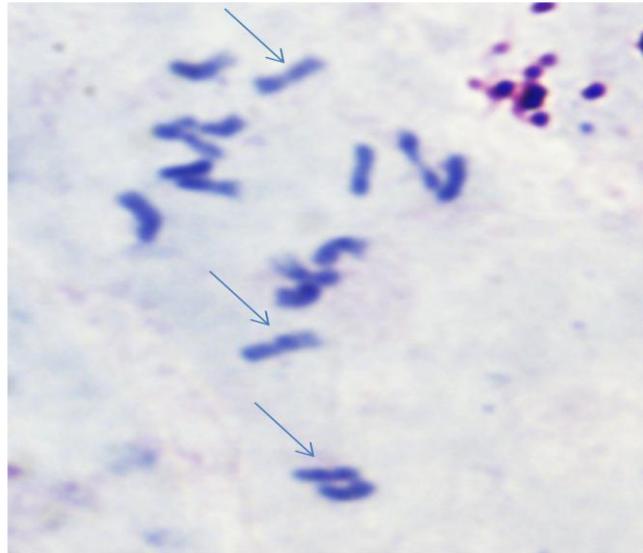
Nous avons effectué plusieurs tentatives pour obtenir des résultats mais la taille des chromosomes a constitué un obstacle pour observer et situer de manière exacte les bandes C chez les deux espèces (figure 7a et b).

Les deux espèces présentent dans l'ensemble des bandes intercalaires et télomériques (Figure 7a et b). La présence de l'hétérochromatine dans ces espèces peut être liée à leur milieu de vie.

Lespinasse et *al.*, (1992), signalent que les bandes C peuvent être liées aux conditions du milieu. L'environnement de l'origine des populations peut avoir une influence sur la distribution de l'hétérochromatine constitutive (Issolah et *al.*, 2006). Siljak- Yakovlev (2000), considère l'hétérochromatine comme étant un marqueur de différenciation entre les espèces.

Des différences minimales dans l'emplacement, le nombre et l'intensité de coloration des bandes permettent de faire une comparaison entre les espèces mais dans notre cas ceci n'a pas été possible.

a)



b)

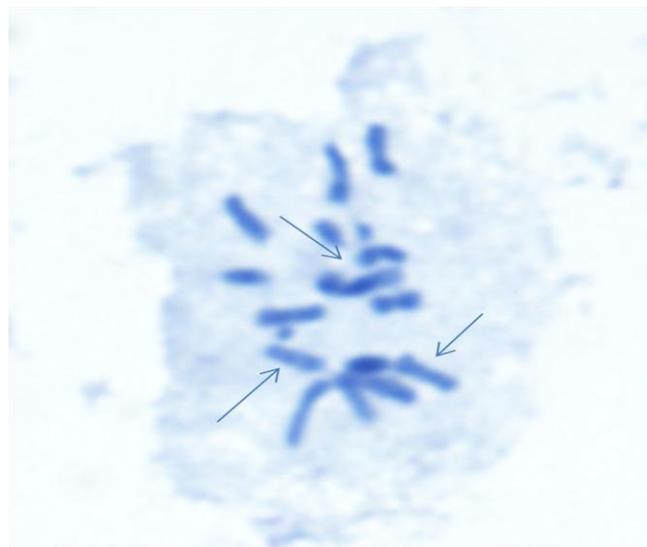


Figure 7. (a) L'hétérochromatine constitutive chez l'espèce *H. carnosum*.

(b) L'hétérochromatine constitutive chez l'espèce *H. spinosissimum* ssp *capitatum*.

Conclusion

Conclusion

Les espèces du genre *Hedysarum* L ont depuis longtemps suscité l'intérêt des scientifiques, dans le monde et en Algérie. Ce genre représente une grande importance dans l'alimentation animale en tant que source principale de protéines et contribuent à l'accroissement de fertilité des sols.

L'étude cytogénétique est une étape indispensable pour connaître et favoriser le développement d'une plante. Différents travaux ont été effectués sur le genre *Hedysarum* du point de vue morphologique et génétique. Ces travaux méritaient d'être complétés par une approche cytogénétique plus poussée.

L'objectif de ce travail était une contribution à la caractérisation cytogénétique de deux espèces du genre *Hedysarum* L. Au cours de ce travail, nous avons appliqué deux méthodes de cytogénétique classique (coloration de Feulgen et coloration différentielle au Giemsa).

Nous avons établi le caryogramme et l'idiogramme de l'espèce *H. carnosum*. et *H. spinosissimum*. ssp *capitatum* grâce à la technique de Feulgen. Les caryotypes sont diploïdes $2n = 2x = 16$ chromosomes soit $n = x = 8$.

Le caryotype des deux espèces comprend 8 paires de chromosomes métacentriques. L'indice d'asymétrie est de 58.12% pour *H. carnosum* et de 56.25% pour *H. spinosissimum* ce qui indique que les caryotypes sont symétriques et primitifs.

La technique de la coloration au Giemsa n'a pas produit de clairs et consistants résultats sur les deux espèces *H. carnosum* et *H. spinosissimum*. Nous n'avons pas pu situer et dénombrer avec précision les zones hétérochromatiques présentes au niveau des chromosomes métaphasique, ceci est dû à la petite taille des chromosomes qui varie de 1.80 μm et 2.64 μm . dans l'ensemble, les bandes observées chez les deux espèces sont situées dans la région intercalaire et télomérique.

Ce travail peut être complété par des méthodes de cytogénétique moléculaire telles que la technique d'hybridation *in situ* (FISH). Cette méthode permettra de déterminer les différences et les similitudes au niveau l'ultra structural des chromosomes.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- **Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N. Guittonneau G.G., 1988.**
Contribution à l' étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. I- Etude auto écologique. Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach. 12: 191-219.

- André G., Hubert B., 1992.** Amélioration des espèces végétales cultivées. Quae. Paris. P 271.

- Anthony Griffiths J. F., David Suzuki T., Chrystelle S., 2002.** Introduction à l'analyse génétique. De Boeck Université. Paris. P 87.

- **Akpinar N, Yildiz B., 1999.** Nuclear DNA contents of some endemic *Hedysarum* L species. Turkish Journal of Biology.

- **Baatout H., 1991.** Le complexe d' espèces *Hedysarum spinosissimum* L. dans le bassin méditerranéen occidental: analyse de la structure génétique des populations, conséquences au niveau de la systématique des deux sous-espèces *capitatum* et *euspinosissimum* dans le genre *Hedysarum*. Thèse d' Etat. Orsay, France, Université Paris-Sud.

- Cronk Q., Ojeda I. and Pennington R.T. 2006.** Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. Current Opinion in plant biology 9: 99-103.

- **Falistocco E. et Morelli. , 1990.** Chromosome study in *Hedysarum coronarium* L. Annali Di Botanica. Vol. XVIII. 81-86.

- Guignard J.L., Dupont F., 2005.** Botanique. 13ème Edition Masson.Sprent : 164-179.

- Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Boussaid M., Marrakchi M., Trififarrah N., 2004.** Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. IPGRI - FAO, 130: 65 - 72.

-Harry M., 2001 : Génétique moléculaire et évolutive. Maloine. Paris. 15.

-Issolah R., Benhizia H., Khalfallah N., 2006. Karyotype variation within some natural populations of sulla (*Hedysarum coronarium* L., Fabaceae) in Algeria. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 1653-1664.

-Jahier J., Chèvre A.M., Delourme R., Eber F., Tanguy A.M., 1992. Techniques de cytogénétique végétale. Ed INRA. Paris, 184p.

-Klug C., Bruhwiler T., Orn D., Schweigert G., Brayard A. , Tilsleyamonoid J.; .2007. Sell structures of primary organic composition. Palaeontology. Volume 50, Issue 6, pages 1463–1478.

-Lemonde A., Clément D., 1983. Biologie cellulaire et moléculaire. Presses Université Laval. Paris. Pp 396-398.

-Levan A., Freda K., Scandberg A., 1964. Secondary association between genetically equivalent bivalents. Hereditas. 52: 201-220.

-Masoud S. A., Gill B. S., Johnson L. B., 1991. C-Banding of Alfalfa Chromosomes: Standard Karyotype and Analysis of a Somaclonal Variant. The Journal of Heredity. 82(4):335-338.

-Michel V., 2008. Les êtres humains – une structure identique pour tous. Masson. Paris. p15.

-Piumbini M. R., Silvia G. P., 1998. Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Genet. Mol. Biol. Vol. 21. N° 1: 1-22.

- Projet de numérisation de la flore de L'Abbé Coste par le réseau Tela botanica. 2011.**
www.tela-botanica.org.
- Quezel P., Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l' Algérie et des régions désertiques méridionales. CNRS, ed.Paris, France.
- Stebbins G. L., 1971.** Chromosomal evolution in higher plants. Ed wards, London, and 216p.
- Siljak-Yakovlev S., 1986.** Etude cytogénétique et palynologique de compositae endémiques ou relique de la flore yougoslave. Thèse de doctorat. Université Paris-Sud. Pp 77-217.
- Siljak-Yakovlev S., 2000.** Titre et travaux scientifiques. C.N.R.S. Département des sciences de la vie. Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution.Université Paris Sud, 54p.
- Toreche A., 2006 :** Isolement et caractérisation des bactéries nodulant les légumineuses du genre *Hedysarum* . Thèse de doctorat. Université Constantine 1.

Annexe

Préparation des tampons et des solutions utilisées

1- 8hydroxy quinoléine

- Un 0.003 g de 8hydroxy quinoléine poudre dans un 100 ml de l'eau distillée.

La solution de 8hydroxy quinoléine est 0.002 m/l.

2- 3V/1V (éthanol/ acide acétique)

- On prend 3 volumes d'éthanol pour 1 volume d'acide acétique.

3- Hcl 1N

- Prendre l'Hcl fumant PM = 36.46 g/l d = 1.18 % Hcl = 37%
- Mettre 82.79 ml d'Hcl dans 1 litre de l'eau distillée.

4- Solution enzymatique (pectinase et cellulase)

- **Solution de pectinase à 15%**

Pectinase (forme *aspergillus niger*) dans 40% glycérol (sigma).

- **Cellulase à 15%**

Cellulase (Onzuka R-10) dans le tampon citrate 0.09 à PH 4.4 (sigma).

5- le réactif de schiff

- Fuschine vraie basique : **1g** Merck.
- H₂O bouillante : 200ml.
- Hcl N : 20ml.
- Metabisulfite Na ou K : 1.2 g.

6- solution C- banding

Selon Falistocco & Maurelli (1990). (Hedysarum).

-la baryte solution saturée, pour 200ml :

- Ba (Ho) H₂O : 13.92g dans 200ml d'H₂O.
- Ba (Ho) 8 H₂O : 23.2g dans 200ml d'H₂O.

-solution 2X SSC pour 200ml :

Nacl : 3.508g dans 200ml d'H₂O.

TRIS : 1.766g dans 200ml d'H₂O.

-tampon phosphate PH 6.8, pour 200ml :

Na₂ H₂O HPO₄ : 2.34g dans 200ml d'H₂O.

KH₂ PO₄ : 1.38g dans 200ml d'H₂O.

Nom & prénom: MARMY Imene

Date de soutenance :

22/06/2014

Titre: Etablissement du caryotype d' *Hedysarum carnosum* Desf. et *Hedysarum spinosissimum* L. ssp *capitatum*.

Résumé.

La cytogénétique de part sa nature investigatrice participe d'une manière importante aux études de taxonomie et de phylogénie, les techniques classiques qui permettent une vision morphologique de la cellule en métaphase ont rendu possible le dénombrement des chromosomes et l'établissement des caryotypes.

Notre étude a porté sur deux espèces annuelles du genre *Hedysarum* L. *H. carnosum* Desf. et *H. spinosissimum* L ssp *capitatum*. Nous avons appliqué la technique de Feulgen afin de déterminer le nombre chromosomique et établir leurs caryotypes respectifs. Une deuxième technique (C-banding) a été appliquée pour étudier la structure des chromosomes et donc déterminer l'emplacement et la quantité d'hétérochromatine constitutive. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par plusieurs auteurs et confirment que les espèces étudiées présentent un nombre chromosomique diploïde ($2n = 2x = 16$ chromosomes). les chromosomes sont de type métacentrique. Les bandes hétérochromatiques sont localisées généralement dans la région intercalaire et télomérique.

Mots clés. *Hedysarum* L., caryotype, *H. carnosum* ; *H. spinosissimum* ssp *capitatum*; chromosomes ; Hétérochromatine; C-banding.

Laboratoire de recherche: Laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végéta

Président (e): Pr. KHALFALLAH Nadra

Professeur à l'université Constantine 1

Encadreur : Dr. BENHIZIA Hayet

M.C. à l'université Constantine 1

Examineur : Mr. BAZIZ Karim

M.A.A. à l'université de Batna