



RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم الكيمياء الحيوية و البيولوجيا الخلوية و الجزيئية

Département de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie de la nutrition

Intitulé :

**Appréciation de la diversité génétique au sein de l'espèce
Trifolium resupinatum L. par les marqueurs protéiques
(Protéines totales, albumines et globulines)**

Présenté et soutenu par : CHAFI Mehdi

Le : 04/07/2018

TALBI Rahil

Jury d'évaluation :

Président du jury : *NOUADRI Tahar* (MCA- UFM Constantine).

Rapporteur : *MEDOUKALI Imane* (MAB - UFM Constantine).

Examineurs : *MOUSSAOUI Samira* (MAA-UFM Constantine)

Année universitaire : 2017-2018

Remerciements

Avant tout nous remercions Dieu tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nos remerciements les plus sincères s'adressent 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.

Nous remercions les membres de jury d'avoir bien voulu accepter de juger ce travail. Nous vous en sommes très reconnaissants et en espérant être à la hauteur de votre confiance.

A M NOUADRI T. (MCA à l'Université frères Mentouri Constantine), Trouvez ici l'expression de nos respectueuses gratitude et le témoignage de nos profonds remerciements pour avoir accepté de présider ce jury. Veuillez accepter cher maître toute notre reconnaissance.

Nous remercions également l'examinatrice de ce mémoire, Mme MOUSSAOUI S. (MAA à l'Université frères Mentouri Constantine), Nous vous adressons nos sincères remerciements et nos profonds respects pour l'intérêt que vous apportez à ce travail.

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

En fin nos remerciements à tous ceux qui ont aidé à l'élaboration de ce mémoire du pré ou du loin.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère Benabederrahmane Fella

A mon père, Mouhamed, écolé de mon enfance 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 préserver et vous accorder santé, longue vie et bonheur.

A très chère sœur Amira

A très chère grand-mère Bibia

A toute la famille Chafi et Benabederrahmane

Merci pour tout...pour votre amour, la confiance et l'énergie que vous m'aviez Donnée...Merci beaucoup pour votre aide précieuse, gentillesse et bonne humeur.

A tout ma promotion de master biochimie et nutrition A tous ceux qui j'aime, sans lesquels tout ceci n'aurait aucun sens.....

Dédicace

Je dédie ce travail à :

*Mes chers parents pour leur amour
inestimable, leur confiance, leur soutien,
leurs sacrifices et toutes les valeurs qu'ils ont
su m'inculquer.*

*Mes sœurs pour leur tendresse, leur
complicité et leur présence, ainsi que mes
frères j'espère que la vie vous réserve le
meilleur.*

*Au reste de ma famille, Pour leur soutien jusqu'à la
fin de ce travail, ainsi qu'à Tous mes collègues de
travail pour leur aide et encouragements.*

*Tous mes chers amis Pour leur soutien et leur amitié
Chaleureuse qui nous a réuni dans ce travail.*

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
Chapitre 1 : revue bibliographique	3
1. Présentation générale des légumineuses.....	3
2. présentation du genre trifolium	4
2.1. Caractère généraux.....	4
2.2. Taxonomie et génétique.....	4
2.3. Position systématique	4
2.4. Distribution du genre trifolium	5
2.5. Les Caractéristiques botaniques.....	5
3. L'espèce étudiée (<i>Trifolium resupinatum</i>).....	6
3.1. Description botanique	6
3.2. Origine et distribution éco-géographique.....	6
3.3. Caractéristique de l'espèce	7
3.4. Intérêt de l'espèce étudiée.....	7
4. la diversité génétique.....	8
5. les marqueurs génétiques.....	8
5.1. Les marqueurs morphologiques	8
5.2. Les marqueurs moléculaires.....	9
5.3. Les marqueurs biochimiques	9
5.4. Les marqueurs protéiques	9

6. les protéines de réserve de graine chez les légumineuses.....	9
------------------------------------------------------------------	---

Chapitre 2 : matériel et méthodes	12
-----------------------------------------	----

1. Matériel végétal	12
2. Méthode d'étude	13
2.1. Préparation des échantillons.....	13
2.2. Extraction des protéines totales.....	13
2.3. Extraction séquentielle des albumines et des globulines	13
2.3.1. Délipidation de la farine	14
2.3.2. Extraction des albumines	14
2.3.3. Extraction des globulines.....	14
2.2. Préparation des extraits pour l'électrophorèse	14
2.4 Technique d'électrophorèse	14
2.4.1. Principe	15
2.4.2. Préparation des gels	15
2.4.3. Tampons d'électrophorèse.....	16
2.4.4. Condition de migration.....	16
2.4.5. Fixation, coloration, décoloration.....	16
2.5 Analyse des données.....	16

CHAPITRE 3 : Résultat et Discussion.....	17
------------------------------------------	----

I. Analyse de la diversité génétique des dix accessions de <i>T. resupinatum</i>	17
I.1. Les protéines totales	17
I.1.1. Fractionnement des protéines totales et lecture des profils électrophorétiques...	17

I.1.2. Fréquences des protéines totales.....	19
I.1.3. Distances génétiques.....	20
I.1.4. Classification hiérarchique.....	20
I.2 les albumines	22
I.2.1. Fractionnement des albumines et lecture des profils électrophorétiques.....	22
I.2.2 Fréquences des albumines	23
I.2.3 Distances génétiques.....	24
I.2.4 Classification hiérarchique.....	25
I.3. Les globulines	26
I.3.1. Fractionnement des globulines et lecture des profils électrophorétiques.....	26
I.3.2. Fréquences des globulines.....	27
I.3.3. Distances génétiques.....	28
I.3.4. Classification hiérarchique.....	29
II. Corrélation entre les trois fractions protéiques étudiées	30
III. Discussion	30
Conclusion générale et perspectives.....32	
Références bibliographiques.....33	
Annexes	
Résumés	

ABREVIATIONS

ALT	Altitude
CaCl₂	Chlorure de calcium
DG	Distance Génétique
EDTA	Éthylène Diamine Tétra-Acétique
EGTA	Ethylène glycol tetraacetic Acid
KDa	Kilo dalton
LAT	Latitude
LON	Longitude
Mg	Milli gramme
Min	Minute
Pm	La pluviométrie moyenne
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Rpm	Rotation par minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TCA	Trichloracétique Acide
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
TM	La température maximale
Tm	Moyenne de la Température minimale du mois le plus froid
UI	Micro litre
UPGMA	Unweighted pair group method arithmetic average

TABLE DES FIGURES

CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Figure.1. Classification phylogénique des légumineuses	3
Figure.2. Présentation morphologique du genre trifolium	4
Figure.3. Carte de répartition du genre trifolium	5
Figure.4. Les trois folioles d'une feuille de trifolium	5
Figure.5. Diagramme florale du trèfle.....	5
Figure.6. Présentation morphologique du genre trifolium.....	6

CHAPITRE2 : MATERIEL ET METHODES

Figure.7. Localités géographiques des 10 accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i> dans le nord algérien.....	13
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION

Figure.8. Profils électro phorétiques des protéines totales obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez <i>T. resupinatum</i>	18
Figure.9. Classification hiérarchique en UPGMA des dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i>	21
Figure.10. Profils électro phorétiques des albumines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez <i>T. resupinatum</i>	23
Figure.11. Classification hiérarchique en UPGMA des dix accessions de l'espèces <i>T.resupinatum</i> selon le polymorphisme des albumines.....	26
Figure. 12. Profils électro phorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez <i>T.resupinatum</i>	27
Figure.13. Classification hiérarchique en UPGMA des dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i> selon le polymorphisme des globulines.....	30

TABLE DES TABLEAUX

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

Tableau 2. Sites de collectes et leurs paramètres bioclimatiques des 10 accessions utilisées dans cette étude.....	12
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION

Tableau 3. Matrice Présence/Absence, mobilités et fréquences des protéines totales dans les dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i>	19
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tableau 4. Distances génétiques calculées entre les dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i> en se basant sur les données des protéines totales.....	20
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tableau 5. Matrice Présence/Absence, mobilités et fréquences des albumines dans les dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i>	24
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tableau 6. Distances génétiques calculées entre les dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i> en se basant sur les données des albumines.....	25
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tableau 7. Matrice Présence/Absence, mobilités et fréquences des globulines dans les dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i>	28
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tableau 8. Distances génétiques calculées entre les dix accessions de l'espèce <i>T. resupinatum</i> . En se basant sur le polymorphisme des globuline.....	29
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Introduction

La large diversité des conditions naturelles de l'Algérie, de son relief, de sa géologie, de ses sols et de son climat, a fini par forger une grande diversité biologique exprimée par une richesse au niveau des espèces. Un très grand nombre de ces espèces pousses à l'état naturel et endémique, certaines se révèlent d'une grande valeur agronomique, car elles sont utilisées comme fourrage pour bétail ou sous forme de plantes alimentaires, d'autres ont une application médicinale (Armani, 2006).

Le genre *Trifolium* renferme plusieurs espèces qui sont bien adaptées à la croissance dans différentes régions agro-écologiques (Zohary et heler, 1984 ; gillet et taylor, 2001). Il présente une spéciation accompagnée par une diversification des structures. Ce genre est très répandu dans les régions tempérées du globe terrestre. Notre étude s'intéresse à l'espèce *Trifolium resupinatum* qui présente un intérêt agroéconomique 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. Cette espèce, possède une valeur alimentaire exceptionnelle et une potentielle activité antioxydante, aussi, des propriétés anti-ostéoporose dans la restauration de l'équilibre métabolique de la formation et de la résorption osseuse. *T. resupinatum* est utilisée également dans le traitement des maladies chroniques par de nombreuses cultures.

La nécessité de conserver les ressources génétiques est devenue un enjeu politique et économique, car la production agricole actuelle et future dépend en grande partie de la diversité génétique disponible pour l'amélioration des plantes. La mise en valeur de ces dernières dans l'amélioration ne peut être réalisée qu'après une étude génétique, biochimique et moléculaire approfondie.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'analyse du polymorphisme génétique des protéines totales, albumines et globulines au sein de dix accessions de l'espèce *T. resupinatum* collectées dans différentes régions éco-géographiques dans le nord Algérien. Pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE). En effet cette technique est de plus en plus utilisée pour identifier des variétés, contrôler des semences et élucider certains problèmes taxonomiques (Trifi et al.,1983).

Dans notre recherche Les études bibliographiques sont présentées dans le premier chapitre de ce mémoire, d'où il présente d'une façon générale l'origine du genre *Trifolium*, sa répartition, ses caractéristiques botaniques, sa génétique ainsi son intérêt et utilisation.

Introduction

Le deuxième chapitre de ce mémoire décrit d'une part le matériel végétal, les sites de collecte, les protocoles et les techniques biochimiques utilisées et d'autre part l'étude du polymorphisme protéique en vue de l'appréciation de la variabilité génétique.

L'interprétation et la discussion des résultats obtenus sont présentées sous forme de troisième chapitre de ce mémoire.

Matériel et Méthodes

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

1. Matériel végétal

Notre étude est menée sur des graines matures de dix accessions d'une espèce du genre *Trifolium* (*T. resupinatum*). Ces accessions ont été collectées dans 10 sites éco-géographiques représentant une large gamme des étages bioclimatiques dans le Nord Algérien (Fig.8), dans la période Mai à juillet 2013. Cette collection a pour avantage le fait que les sites prospectés présentent différents climats et subissent des contraintes abiotiques diverses (Tableau 2).

Tableau 2. Sites de collectes et leurs paramètres bioclimatiques des dix accessions utilisées dans cette étude.

Accession	Site de collecte	ALT	LAT	LON	Pm	Tm	TM
TR1	Blida	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	791	7	30,9
TR2	Médéa	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	736	2,5	30,6
TR3	Tizi Ouzou	129	36°43'54,04"N	4°17'54,66"E	896	6,2	32
TR4	Tipaza	203	36°34'48,16"N	2°34'06,74"E	626	80,4	30,1
TR5	Annaba	132	37°02'56,98"N	7°23'19,39"E	712	8,2	28,1
TR6	Mila/ Babtrouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	742	4,4	31,1
TR7	Mila/ Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E	568	2,5	31,3
TR8	Bejaia	2	36°40'21,52"N	5°08'59,99"E	659	6,2	31,3
TR9	Alger/ Ben Aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E	762	6,9	28,4
TR10	Jijel/Kissir	166	36°47'29,52"N	5°41'26,87"E	818	8,2	29,3

ALT- Altitude ; LAT- Latitude ; LON- Longitude ; Pm- La pluviométrie moyenne ; Tm- La température minimale du mois le plus froid ; TM- La température maximale.



Fig.8. Localités géographiques des dix accessions de l'espèce *T. resupinatum* dans le nord Algérien.

2. Méthodes d'étude

2.1. Préparation des échantillons

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

2.2. Extraction des protéines totales

10 mg de farine contenue dans des tubes d'ependorf est mélangée à environ 300 μ l 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 bleu de bromophénol (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.

2.3. Extraction séquentielle des albumines et des globulines

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

2.3.1. Délipidation de la farine

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

2.3.2. Extraction des albumines

Le résidu de délipidation est mélangé avec 250 μ l d'une solution d'eau distillée, pH 8, contenant 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂ et 1 mM PMSF et agité pendant 30 min à 4°C avant d'être centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. Le culot de centrifugation est soumis deux fois à l'extraction comme précédemment. Le surnageant est récupéré comme solution contenant la fraction albumines.

2.3.3. Extraction des globulines

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

2.3.4. Préparation des extraits pour l'électrophorèse

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

2.4. Technique d'électrophorèse

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

2.4.1. Principe

Matériel et Méthodes

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

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

2.4.2. Préparation des gels

Les plaques de verre qui servent de moule pour la polymérisation des gels sont nettoyées à l'éthanol. Elles sont ensuite assemblées avec deux espaceurs d'une épaisseur de 1,5mm chacun. Le support d'électrophorèse est formé d'un gel de séparation (separating gel) à T1 = 12,58 % et C2 = 0,97 %, et d'un gel de concentration (stacking gel) à T = 2,88 % et C = 1,42 %. Ces deux gels sont préparés à base d'acrylamide à 40% (p/v), de N,N' -méthylène bisacrylamide à 2% (p/v) et de Tris-HCL 1M ,tamponnés à pH 8.8 pour le gel de séparation, et à pH 6.8 pour le gel de concentration. Ces deux gels sont polymérisés en présence du TEMED et de l'APS.

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

Matériel et Méthodes

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 extraits protéiques, les puits sont remplis avec du tampon avant le dépôt des échantillons.

2.4.3. Tampon d'électrophorèse

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

2.4.4. Conditions de migration

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

2.4.5. Fixation, coloration et décoloration

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

2.5. 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 la distance Euclidienne qui peut se calculer comme suit :

$$D^2(i,j) = \sum M_{ab} (X_{ia} - X_{ja}) (X_{ib} - X_{jb})$$

Avec X_{ia} = valeur de la variable a pour l'individu i

Et M_{ab} = coefficient de pondération de l'interaction des variables a et b

A partir des distances génétiques calculées, une classification hiérarchique en UPGMA (unweighted pair group method arithmetic average) a été élaborée moyennant le logiciel Statistica version 6.0.

Résultats et Discussion

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

I. Analyse de la diversité génétique des dix accessions de *T. resupinatum*

L'analyse des diagrammes électrophorétiques met en évidence des différences entre les dix accessions de *T. resupinatum*. 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 ; 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. 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.

I.1. Les protéines totales

I.1.1. Fractionnement des protéines totales et lecture des profils électrophorétiques

Cette technique nous a permis de détecter des différences dans les profils des protéines totales entre les dix accessions étudiées. Les bandes sont très bien séparées avec une bonne résolution et elles révèlent un polymorphisme entre les accessions. La figure 8, 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)** : C'est la zone lente, comprend les bandes qui ont un poids moléculaire supérieure ou égale à 100 kDa, les bandes dans cette zone sont biens séparées et ont des intensités différentes.

- **Zone (2)** : C'est la zone intermédiaire, contient des bandes avec un poids moléculaire s'étend de 25 à 100 KDa. Elle est caractérisée par une considérable variabilité des

Résultats et Discussion

profils tant pour le nombre que pour l'intensité des électromorphes. La majeure partie des protéines totales sont localisées dans cette zone de mobilité.

- **Zone (3)** : C'est la zone rapide, caractérisée par une considérable variabilité avec un poids moléculaire moins de 25 KDa.

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

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

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

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

La lecture des diagrammes consiste à relever la mobilité (mm) de chacune des bandes présentes en mesurant la distance parcourue par chaque bande dans le gel de séparation. La mobilité d'une bande est la distance entre le point d'application de l'échantillon et la position de la bande correspondante dans le gel.

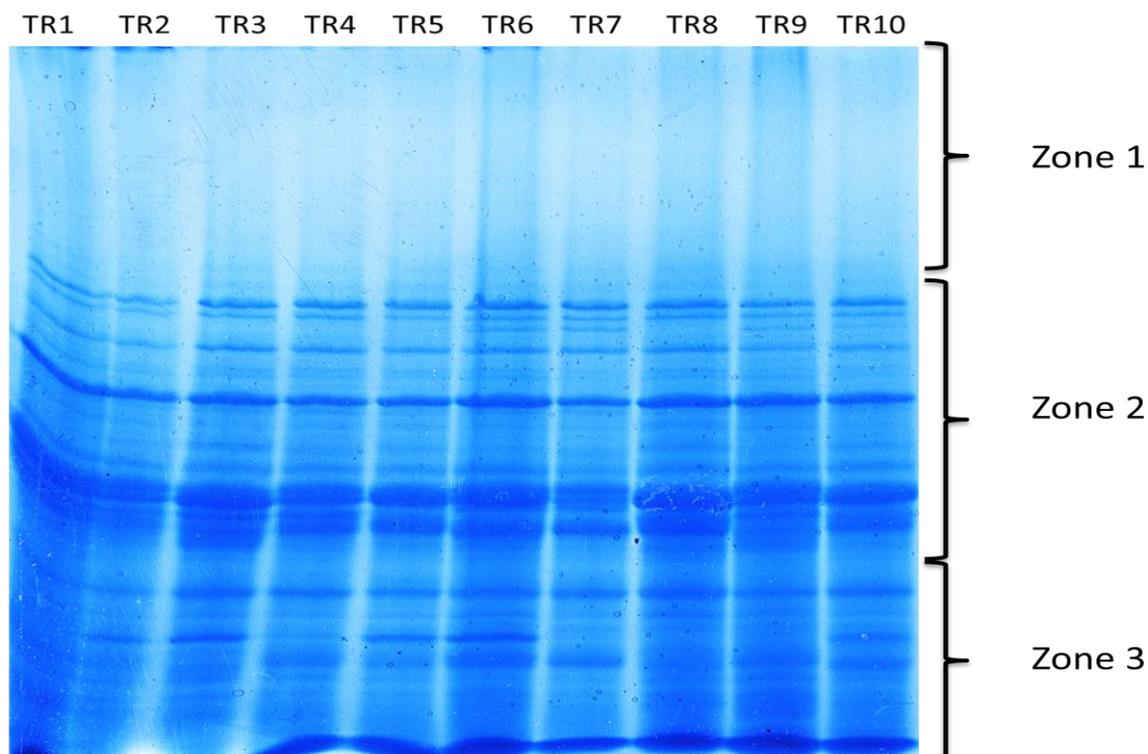


Fig. 8. Profils électrophorétiques des protéines totales obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes chez dix accessions de *T. resupinatum*.

Résultats et Discussion

I.1.2. Fréquences des protéines totales

En somme, les zones de mobilités ont engendré 24 bandes que nous avons numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide. Les fréquences des 24 protéines détectées dans les 10 accessions de l'espèce *T. resupinatum* sont données dans le tableau 3.

Onze bandes (p2, p3, p4, p6, p9, p13, p14, p18, p19, p21, p22) sont omniprésentes dans toutes les accessions avec une valeur de fréquence de 1. Ce qui montre leur dominance dans le gel. Des fréquences moyennes qui varient de 0.7 à 0.9 ont caractérisé dix bandes sur les 24 détectées (p1, p7, p8, p10, p11, p12, p16, p17, p23, p24). Les plus faibles fréquences (entre 0.4 à 0.5) ont été observées dans trois bandes (p5, p15, p20) qui sont partagées par 4 à 5 accessions.

Tableau 3. Matrice Présence/Absence, mobilités et fréquences des protéines totales dans les dix accessions de l'espèce *T. resupinatum*.

Bande	Mobilité (cm)	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	TR8	TR9	TR10	Somme	Fréquence
p1	5,04	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	9	0,9
p2	5,51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p3	5,94	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p4	6,26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p5	6,51	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	4	0,4
p6	7,14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p7	7,63	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	8	0,8
p8	7,7	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9	0,9
p9	8,34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p10	8,55	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	9	0,9
p11	8,87	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	9	0,9
p12	9,36	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	9	0,9
p13	9,93	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p14	10,49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p15	10,98	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	5	0,5
p16	11,27	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	7	0,7
p17	11,76	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	7	0,7
p18	12,85	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p19	13,38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p20	13,84	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	5	0,5
p21	14,37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p22	14,79	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
p23	15,11	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	8	0,8
p24	16,38	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	9	0,9

Résultats et Discussion

I.1.3. Distances génétiques

Les distances génétiques entre les dix accessions étudiées ont été calculées sur la base des données des protéines totales et en utilisant la distance Euclidienne. Les résultats figurent dans le tableau 4. Les valeurs obtenues traduisent une dissimilarité relative entre les accessions étudiées, elles varient entre 0.04 et 0.33 avec une distance moyenne de 0.19. La distance la plus faible (0.04) a été notée entre les accessions *TR5* et *TR6*, sachant que l'accession *TR5* a été collectée dans une région de Annaba avec une altitude de 132 (voir Tableau 2), tandis que *TR6* est une accession de la région Babtrouche (Mila) qui est caractérisé par une altitude beaucoup plus élevée (831). Cependant, la distance la plus élevée (0.33) a été obtenue entre *TR1* et *TR10*. Ces deux accessions ont été prélevées dans deux régions relativement distantes éco-géographiquement (Blida et Jijel/Kissir pour *TR1* et *TR10*, respectivement). Des distances intermédiaires ont été enregistrées pour d'autres couples d'accessions comme c'est montré dans le tableau 4.

Tableau 4. Distances génétiques calculées entre les dix accessions de l'espèce *T. resupinatum* en se basant sur les données des protéines totales

	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	TR8	TR9	TR10
TR1	0,00	0,14	0,22	0,14	0,22	0,25	0,27	0,23	0,14	0,33
TR2		0,00	0,17	0,17	0,17	0,21	0,30	0,26	0,26	0,29
TR3			0,00	0,09	0,09	0,13	0,29	0,17	0,25	0,21
TR4				0,00	0,09	0,13	0,22	0,09	0,17	0,21
TR5					0,00	0,04	0,22	0,09	0,25	0,13
TR6						0,00	0,17	0,13	0,21	0,09
TR7							0,00	0,23	0,30	0,18
TR8								0,00	0,26	0,22
TR9									0,00	0,29
TR10										0,00

I.1.4. Classification hiérarchique

En se basant sur le polymorphisme des protéines totales, les distances Euclidiennes calculées entre les dix accessions étudiées ont été utilisées pour construire un dendrogramme en UPGMA (Fig. 9).

Le dendrogramme subdivise les accessions en trois groupes majeurs à une distance $d=0.21$. Le groupe I regroupe les trois accessions *TR1*, *TR2* et *TR9* de Blida, Médéa et Alger, respectivement à une valeur de distance $d=0.20$, où les deux premières accessions (*TR1* et *TR2*) forment un clade à $d=0.14$. Une seule accession (*TR7*) collectée dans la région d'Oued Athmania de Mila, représente le deuxième groupe. Cette accession se détache du 3ème groupe

Résultats et Discussion

à une valeur $d=0.22$. Ce dernier est constitué du reste des accessions (TR3, TR4, TR5, TR6, TR8 et TR10) appartenant aux régions Tizi Ouzou, Tipaza, Annaba, Mila/ Bab Trouche, Bejaia et Jijel/Kissir, respectivement. Les plus proches (TR5 et TR6) forment un clade à une distance de 0.04 suivies par TR3 et TR4 à une distance de 0.08.

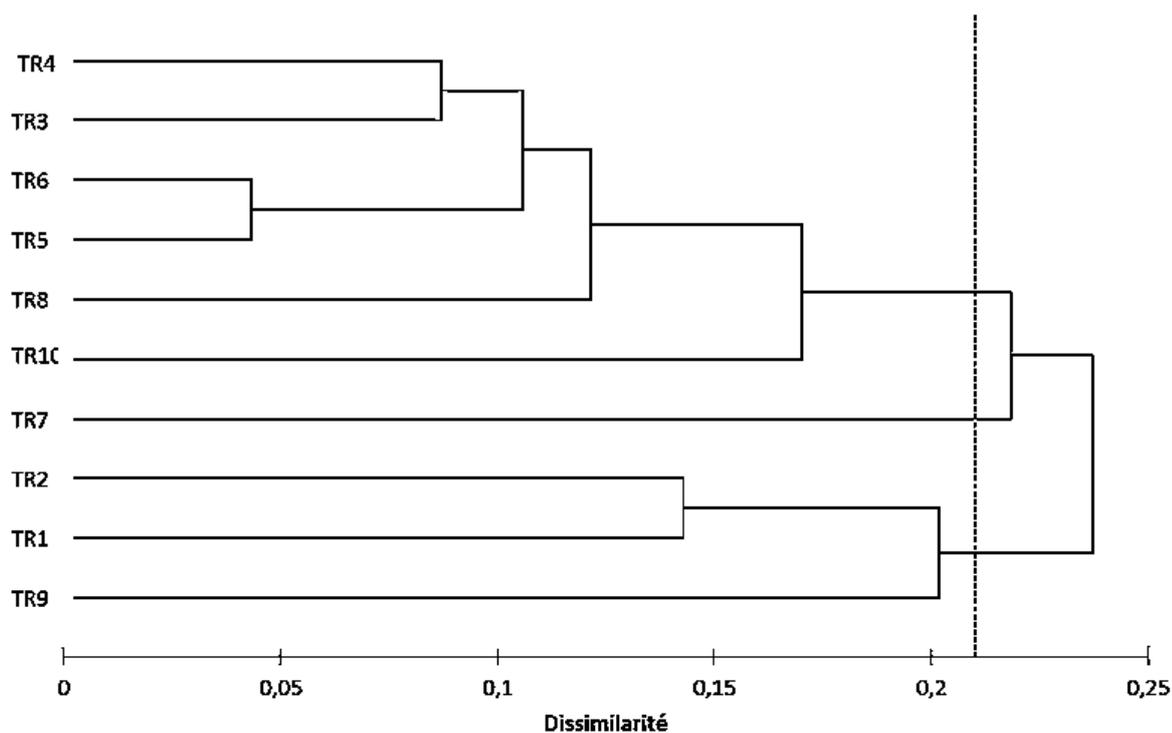


Fig. 9. Classification hiérarchique en UPGMA des dix accessions de l'espèce *T. resupinatum* selon le polymorphisme des protéines totales.

I.2. Les albumines

I.2.1. Fractionnement des albumines et lecture des profils électrophorétiques

Les profils des albumines obtenus révèlent un polymorphisme entre les accessions étudiées, avec des bandes bien décelées et une bonne résolution du gel.

La figure 10 représente le profil obtenu quand la migration est arrêtée au moment où le front de bleu de bromophénol atteint la limite du gel. Le diagramme se subdivise en trois principales zones de mobilité décroissante 1,2 et 3.

- **Zone (1)** : 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 l'absence totale des albumines, en effet ces protéines ont des poids moléculaires faibles.

Résultats et Discussion

- **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 :

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

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

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

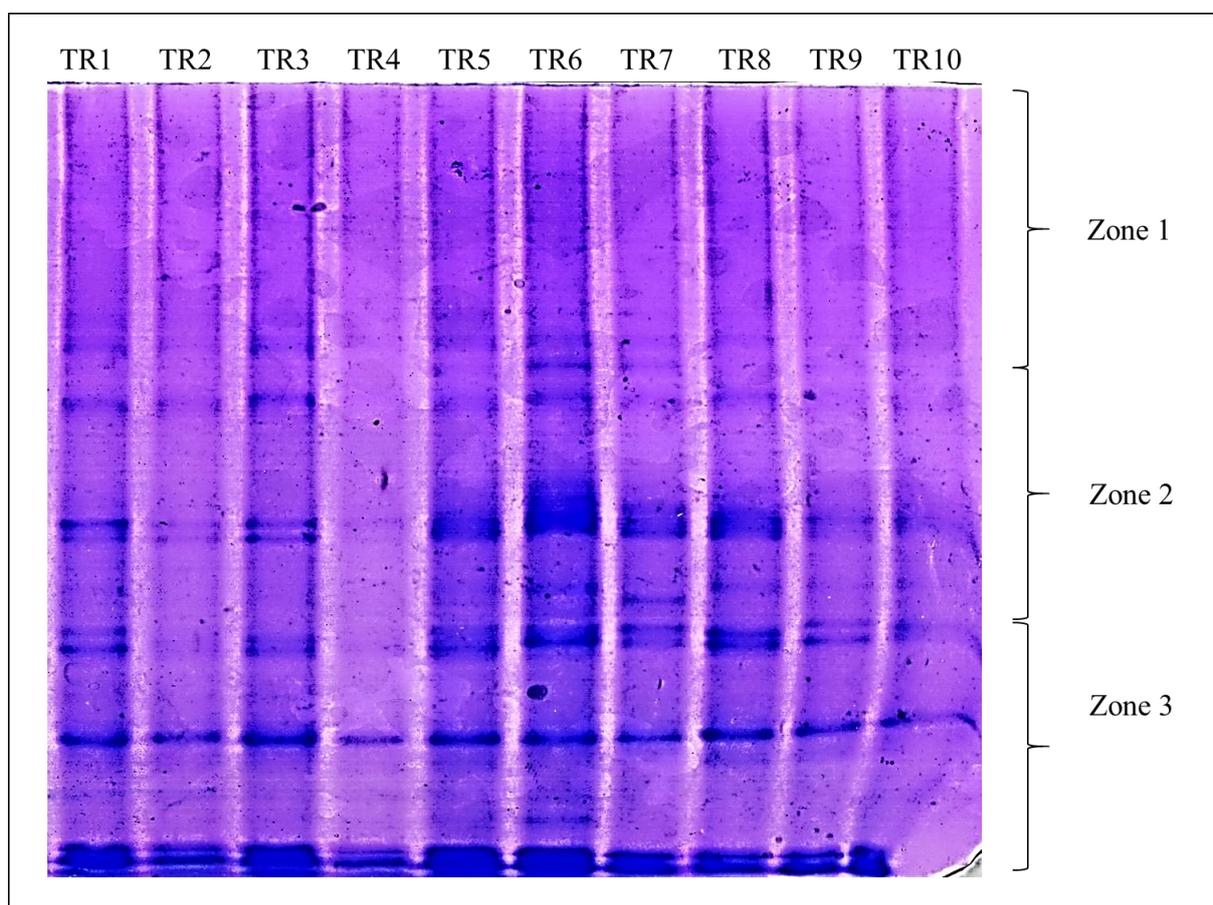


Fig. 10. Profils électrophorétiques des albumines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez dix accessions de *T. resupinatum*.

Résultats et Discussion

I.2.2. Fréquences des albumines

Les différentes bandes des albumines observées ont été variables d'une accession à une autre et à travers les trois zones qui ont été obtenus. Quinze bandes ont été numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide. La matrice présence/absence, les mobilités et les fréquences des albumines détectées dans les 10 accessions de l'espèce *T. resupinatum* sont données dans le tableau 5.

Cinq bandes (A6, A11, A13, A14, A15) sont monomorphes. Elles sont présentes dans toutes les accessions avec une valeur de fréquence égale à 1, ce qui montre leur dominance dans la zone 2 et 3. Quatre bandes (A7, A10, A8, A4) avec des fréquences moins élevées (varient entre 0.7 et 0.8) ont été également notées. Les bandes restantes sont partagées par une, deux ou trois accessions avec des fréquences faibles varient de 0.1 à 0.3, c'est les cas des bandes : A1, A8, A3, A12, A5, A9 (Tableau 5). Parmi elles, la bande A5 de mobilité 8.92 cm est spécifique à l'accession TR6 provenant de la région Babtrouche/Mila ; et la bande A9 de mobilité 11.08 cm est présente seulement dans l'accession TR7 d'Oued Athmenia/Mila.

Tableau 5. Matrice Présence/Absence, mobilités et fréquences des albumines dans les dix accessions de l'espèce *T. resupinatum*.

Bande	Mobilité (cm)	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	TR8	TR9	TR10	Somme	Fréquence
A1	5,08	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	3	0,3
A2	5,57	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	7	0,7
A3	6,03	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0,2
A4	6,74	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	7	0,7
A5	8,92	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,1
A6	9,42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
A7	9,7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	8	0,8
A8	10,83	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	3	0,3
A9	11,08	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0,1
A10	11,32	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	8	0,8
A11	13,09	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
A12	14,67	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0,2
A13	15,34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
A14	15,52	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
A15	15,73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1

I.2.3 Distances génétiques

La comparaison par pair entre les dix accessions étudiées a été réalisé sur la base des profils des albumines en utilisant la distance Euclidienne. Les valeurs de distances génétiques

Résultats et Discussion

sont présentées dans le tableau 6. Les chiffres enregistrés variaient entre 0.09 et 0.57 avec une distance moyenne de 0.32, ce qui signifie la présence d'une diversité importante entre les accessions de *T. resupinatum* de point de vue des albumines

La distance la plus faible ($d = 0.09$) a été notée entre les accessions *TR1* et *TR5* sachant que l'accension *TR1* a été collectée dans une région de blida avec une altitude de 70, tandis que *TR5* a été collectée dans une région de Annaba avec une altitude de 132 (voir Tableau 2). En revanche, la distance la plus élevée ($d = 0.57$) a été observée entre *TR4* et *TR6* qui sont prélevées dans des sites géographiques relativement distants ; Tipaza caractérisé par une altitude de 203 et Milla/Babtrouche avec 831 d'attitude, respectivement. Cette valeur de distance a été enregistrée aussi entre les accessions *TR6* et *TR10* collectées dans des régions géographiquement éloignées de Tipaza et Jijel/Kissir. Des distances intermédiaires ont été obtenues pour d'autres couples d'accessions comme c'est montré dans le tableau 6.

Tableau 6. Distances génétiques calculées entre les dix accessions de l'espèce *T. resupinatum* en se basant sur les données des albumines.

	<i>TR1</i>	<i>TR2</i>	<i>TR3</i>	<i>TR4</i>	<i>TR5</i>	<i>TR6</i>	<i>TR7</i>	<i>TR8</i>	<i>TR9</i>	<i>TR10</i>
<i>TR1</i>	0,00	0,20	0,10	0,40	0,09	0,29	0,25	0,18	0,45	0,40
<i>TR2</i>		0,00	0,11	0,25	0,27	0,43	0,27	0,20	0,50	0,44
<i>TR3</i>			0,00	0,33	0,18	0,36	0,18	0,10	0,40	0,33
<i>TR4</i>				0,00	0,45	0,57	0,45	0,40	0,38	0,29
<i>TR5</i>					0,00	0,21	0,31	0,25	0,50	0,45
<i>TR6</i>						0,00	0,33	0,29	0,50	0,57
<i>TR7</i>							0,00	0,25	0,50	0,45
<i>TR8</i>								0,00	0,30	0,40
<i>TR9</i>									0,00	0,14
<i>TR10</i>										0,00

I.2.4. Classification hiérarchique

Une classification en UPGMA (fig. 11) a été construite sur la base des profils des albumines chez dix accessions de l'espèce *T. resupinatum*. Le dendrogramme obtenu illustre une classification probable des accessions analysées. Selon la distance d'agrégation, les accessions étudiées sont subdivisées en trois groupes majeurs à une distance $d=0.32$. Le groupe I comprend sept accessions (*TR6*, *TR7*, *TR1*, *TR5*, *TR2*, *TR3* et *TR8*). L'accension *TR6* provenant de la région Babtrouche/Mila, se détache du groupe à un degré de distance $d=0.31$ en formant un sous-groupe. De même, *TR7* de la région Oued athemenia/ Mila se détache du reste des accessions pour former un deuxième sous-groupe à une valeur de

Résultats et Discussion

• **Zone (2)** : C'est la zone intermédiaire, Elle est caractérisée par une considérable variabilité qualitative et quantitative, contient des bandes avec un poids moléculaire s'étend de 25 à 100 KDa.

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

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

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

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

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

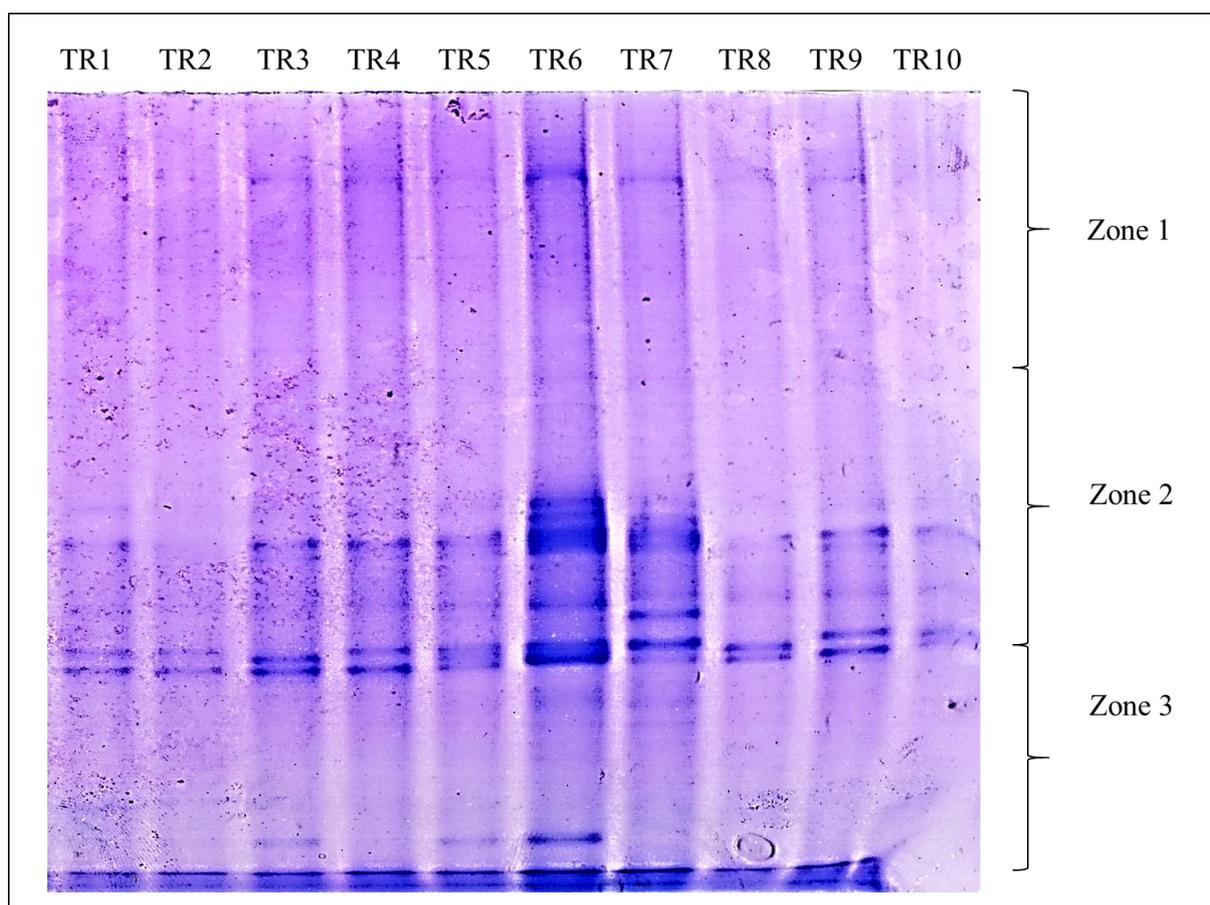


Fig. 12. Profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS-PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez *T. resupinatum*.

Résultats et Discussion

I.3.2. Fréquences des globulines

À travers les dix accessions analysées, un total de dix bandes de fréquences différentes a été détecté pour l'espèce *T. resupinatum* (Tableau 7). D'après le tableau ci-dessous, nous notons un polymorphisme important des globulines. Quatre bandes monomorphe (G6, G7, G9, G10) ont des fréquences élevées avec une valeur de 1. Des fréquences intermédiaires de 0.6 à 0.8 ont été enregistrées dans quatre bandes considérées polymorphe (G2, G1, G4, G5) dont les fréquences sont respectivement 0.6, 0.7, 0.8 et 0.8. La plus faible fréquence (0.2) a été observée pour la bande G3, Cette dernière a été partagée par deux accessions (TR6 et TR7) appartenant aux régions de Babtrouche et Oued Athmenia/ Mila, respectivement. Suivi par la fréquence 0.3 noté pour la bande G8, qui particularise les trois accessions TR3, TR5 et TR6 provenant de Tizi ouzou, Annaba et Babtrouche/Mila, respectivement. Ces régions présentent des paramètres éco-géographiques différents (voir partie Matériels et Méthode, Tableau 2).

Tableau 7. Matrice Présence/Absence, mobilités et fréquences des globulines dans les dix accessions de l'espèce *T. resupinatum*.

Bande	Mobilité (cm)	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	TR8	TR9	TR10	Somme	Fréquence
G1	1,76	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	7	0,7
G2	8,68	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	6	0,6
G3	8,99	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2	0,2
G4	9,59	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	8	0,8
G5	10,83	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	8	0,8
G6	11,92	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
G7	12,13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
G8	15,8	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	3	0,3
G9	16,51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1
G10	16,95	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10	1

I.3.3. Distances génétiques

Les dissimilarités entre les dix accessions de *T. resupinatum* de point de vue du polymorphisme des globulines nous a permis de calculer les distances génétiques existantes entre elles. Les résultats sont présentés sous forme d'une matrice de distances Euclidiennes dans le tableau 8. Les valeurs varient de 0.0 à 0.6 et avec une distance moyenne de 0.29.

Résultats et Discussion

Une similarité totale des profils des globulines a été observée entre le couple d'accessions *TR3/TR5* avec une valeur de distance de 0.0 (Tableau 8), sachant que l'accession *TR3* a été collectée dans une région de Tizi ousou avec une altitude de 129, et *TR5* a été collectée dans une région de Annaba avec une altitude de 132 (voir Tableau 2). La distance génétique la plus élevée (0.60) a été obtenue entre *TR2* et *TR6* qui sont collectées dans des régions éco-géographiquement éloignées Médéa avec une altitude de 385 et Babtrouche /Mila de 831 d'altitude, pour les deux accessions respectivement. Des distances intermédiaires ont été enregistrées pour d'autres couples d'accessions.

Tableau 8. Distances génétiques calculées entre les dix accessions de l'espèce *T. resupinatum*. En se basant sur le polymorphisme des globulines

	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	TR6	TR7	TR8	TR9	TR10
TR1	0,00	0,33	0,33	0,25	0,33	0,40	0,33	0,50	0,38	0,29
TR2		0,00	0,56	0,50	0,56	0,60	0,56	0,33	0,43	0,33
TR3			0,00	0,11	0,00	0,10	0,20	0,33	0,22	0,33
TR4				0,00	0,11	0,20	0,11	0,25	0,13	0,25
TR5					0,00	0,10	0,20	0,33	0,22	0,33
TR6						0,00	0,10	0,40	0,30	0,40
TR7							0,00	0,33	0,22	0,33
TR8								0,00	0,14	0,29
TR9									0,00	0,14
TR10										0,00

I.3.4. Classification hiérarchique

Les distances génétiques entre les différentes accessions de *T. resupinatum* ont été utilisées pour réaliser une classification hiérarchique en UPGMA (Fig. 11). Le dendrogramme obtenu subdivise les dix accessions en cinq clusters majeurs à une valeur de distance $d=0.18$. Le premier cluster et le deuxième comprennent chacun une seule accession à un degré de distance $d = 0.33$, soit *TR1* (Blida) et *TR2* (Médéa), respectivement. Le troisième cluster renferme cinq accessions (*TR6*, *TR3*, *TR5*, *TR4* et *TR7*) collectées dans différentes régions ; *TR6* et *TR3/TR5* qui correspond à Bab trouche/Mila et Tizi ousou/Annaba forment un clade à une valeur de distance $d = 0.1$, un deuxième clade est représenté par *TR4* et *TR6* (Tipaza et Oued athemenia/Mila) à une distance $d = 0.11$. Un clade entre *TR8* et *TR9* de Bejaia et Alger/Benaknoun, forme le quatrième cluster à un degré de distance $d = 0.14$. Finalement, la région « Kissir » de Jijel est illustrée par le cinquième cluster qui comprend une seule accession *TR10* à une distance $d = 0.21$.

Résultats et Discussion

III. Discussion

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

Toutefois, il est bien connu qu'une distinction claire entre ces groupes de protéines n'est pas toujours possible, à cause de nombreuses protéines montrant des comportements de solubilité intermédiaires. À cet égard, certaines albumines de semences ont été identifiées à partir de plusieurs espèces de plantes qui se comportent comme des globulines lors de leur solubilisation (Youle et Huang, 1978). Blagrove et Gillespie (1975) ont également noté que les globulines sont en partie solubles dans de l'eau désionisée. Dans le présent travail, nous avons réussi à mettre au point une procédure d'extraction efficace des fractions totales des albumines et des globulines (Franco et al., 1997).

L'hétérogénéité électrophorétique des protéines de réserve représentent un caractère biochimique génétiquement stable. Nos résultats, basés sur dix accessions de l'espèce *resupinatum* du genre *Trifolium*, échantillonnées dans diverses conditions éco-géographiques en Algérie du Nord, mettent en évidence une différenciation significative au niveau intra-spécifique. L'électrophorèse des protéines totales, des albumines et des globulines par SDS-PAGE a révélé trois zones de migration (1, 2 et 3). À travers les trois marqueurs étudiés, 49 bandes sont séparées dans les trois zones avec une résolution nette. Le grand intervalle de variation des fréquences de ces bandes (de 0 à 100%) reflète la grande diversité existante à l'échelle intra-spécifique. Ce polymorphisme protéique peut être expliqué par le fait que ces populations ne vivent pas dans le même climat, et subissent donc des conditions différentes. Ainsi que, la composition protéique peut être sous la dépendance des facteurs génétiques et agro-climatique (Doekes et Wennekes, 1982).

A la lumière des résultats obtenus, une classification hiérarchique a été élaborée, et les distances génétiques entre les accessions étudiées ont été représentées. 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 les albumines chacun, et cinq 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

Résultats et Discussion

les accessions. Par contre, ce regroupement n'a pas été clairement corrélé aux origines géographiques.

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

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. resupinatum* représentée par dix accessions collectées dans différentes régions dans le Nord Algérien, en se basant sur le polymorphisme des protéines de réserve de la graine (protéines totales, albumines et globulines).

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

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

- Répertoire un total de 49 bandes à travers les trois fractions étudiées, avec des fréquences très variables, dont 24 bandes ont été notées pour les protéines totales, 15 bandes pour les albumines et 10 bandes pour les globulines.
- Mesurer les mobilités relatives de chacune des bandes protéiques présentes sur le gel,
- Dénombrer des bandes protéiques rares et communes entre les différentes accessions,
- Distinguer les différences dans la composition protéique des accessions.
- Analyser la diversité génétique au niveau intra-spécifique ce qui nous a aidé à estimer les distances génétiques entre pools géniques en comparant leurs origines géographiques.
- Réaliser une caractérisation phylogénétique des différentes accessions étudiées, ça nous a conduit constater l'absence de la corrélation avec les facteurs climatiques et géographiques des régions d'origine de chaque accession.
- Estimer les corrélations entre les polymorphismes générés par chaque marqueur protéique, aucune corrélation n'a été détectée.

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. resupinatum*, ce qui peut donner une indication sur le modèle d'évolution appliqué aux accessions étudiées dans leurs conditions environnementales.

Références bibliographiques

- Aguenarous R., 1986.**- Contribution à L'étude biométrique de quelques espèces spontanées de trèfle (*Trifolium L.*) en Algérie. Thèse Ing., INA. ALger. 1 - 81.
- **Andersson M.S, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano C.E. 2006.** Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. *Field Crops Research* 96: 387-406.
- **Applewhite T.H. 1989.** Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs. *The American oil chemists society*.
- Avise J-c. 2003.** Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation, *Canadian journal of Botany*, pb: NRC Research Press. 81:1198-1212.
- **Blagrove, Gillespie. 1978.** comparative studies on the proteins from seeds of *Lupinus angustifolius L.* *journal of plant physiology*. 5: 651-663.
- **Cronk Q, Ojeda I, Pennington RT (2006)** Légume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology*. Pp.1.
- Cui Z, Carter TE, Jr, Burton JW, Wells R. 2001.** Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *Crop Sci*. 41: 1954-1967.
- Doyle J. J, Chapill, J.A, Bailey, D.C and Kajita T . towards a comprehensive phylogeny of legumes** : evidence from rbc L sequences and non-molecular data. In *advances in legume systematic*. (eds .P.S. Herendeen and A.Bruneau) *keew : Royal Botanic Gardens*,(2000) , pp1.
- Doyle JJ (1998)** Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science* 3(12): 473-478.
- **Fernandes A, Queiros M (1978)** Contribution à la connaissance cytotoxonomique des spermatophytes du Portugal. IV. Eeguminosae. *Boletim da Sociedade Broteriana* 52: 79-164
- Frank Vincentz (2007)** self-made Date: created 30. Nov. 2007 Author: Frank Vincentz Permission: GFDL (self made) == Licensing == {{GFDL-self}}.
- **GNIS, 2008.** Trèfle de Perse. GNIS.

Références bibliographiques

- **Göhl, B., 1982.** Les aliments du bétail sous les tropiques. FAO, Division de Production et Santé Animale, Roma, Italy.
- **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 O.J, Blair M.W, Frankow-Lindberg B.E, Gullberg U. 2004.** Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sci.* 44: 1412-1418.
- **Harry. 2001.** Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine, Paris.
- konard lauber (2012)** présentation morphologique du genre trifolium, trifolium pratense .L.S.SH.
- **Laemmli U.K. 1970.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- **Liz, C., 2011.** Species and variety selection. Informed Farmers.
- **Lokil (2008),** - Description= |Source=self-made |Date= |Author= [Lokil](#) |Permission= |other_versions= }} bloemdiagram
- Lquari H, Pedroche J, Giron-Calle J, Vioque J et Millàn F. 2004.** Purification and partial characterization of storage proteins in *Lupinus angustifolius* seeds. *Grasas y aceites.* 5:364-369.
- **Medoukali I., Bellil I., Khelifi D. 2015.** Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Trifolium* L. Prospected in Northern Algeria. *Not Bot Horti Agrobo.* 43(1) DOI: 10.15835/nbha4319676.
- Medoukali 2016,** carte de répartition du genre trifolium. (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Trifolium_Distribution.png)

Références bibliographiques

- Ozenda. 1982.** In **bouredjia.n, 2005** , étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés foliaires de *Rétama monosperma* (boiss) : mémoire de magistère. UNIV .des sciences et de la technologie d'oran MOHAMED BOUDIAF (U.S.T.O) Oran.
- **Parizeau. 1997.** La biodiversité. Edition de boeck.
- 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.
- **Salmanowicz. 2000.** Capillary electrophoresis of seed 2S albumins from *Lupinus* species. *Journal of Chromatography A*. 894:297-310.
- Shewry P. R, Napier J. A et Tatham A. S. 1995.** Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *The Plant Cell*. 7: 945-956.
- **Singh N.K, Shepherd K.W, Cornish G.B. 1991.** Asimplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunit of glutenin. *Journal of Cere al Science*. 14: 203-208.
- Spichiger, 2004 R.E, Salvlaimen V , Figeat M, Jammonob D. 2004.** Botanique systématique des plantes à fleurs .éd :press polytechnique et universitaire romandes, pp203-206 in Bouredje.n, 2005, étude anatomique et biochimique des protéines et des acides aminés
- **Stockdale, C. R., 1994.** Persian clover and maize silage. I. Silage as a supplement for lactating dairy cows offered herbage of different quality. *Aust. J. Agric. Res.*, 45 (8): 1751-1765.
- Suttie.M. 1999.** *Trifolium resupinatum*.L. FAO. Available at : <http://www.Fao.org/ag/AGP/AGCP/doc/Gbase/data/PF000415htm> (accessed spetember 10.2012).
- **Taylor NL, Quesenberry KH, Anderson MK (1979)** Genetic system relationships in *Trifolium*. *Economic Botany* 33: 431-441.
- **Thompson, D. J. ; Stout, D. G., 1997.** Mixtures of Persian clover with Italian ryegrass or barley-Italian ryegrass for annual forage. *Can. J. Plant Sci.*, 77 (4): 579-585.

Références bibliographiques

- **Unesco. 1960.** Recherches sur la zone aride les plantes médicinales des régions arides. Organisation des *Nations Unies* pour l'éducation, la science et la culture. Place de Fontenoy, paris-7^e imprimeries Oberthur, Rennes Unesco 1960 NS.59/17/99P.

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

- **Villax, E. J., 1963.** La culture des plantes fourragères dans la région méditerranéenne occidentale. Les cahiers de la recherche agronomique N°17. Institut National de la Recherche Agronomique, Rabat. *Persian clover (Trifolium resupinatum) (PDF Download Available)*. Available from: https://www.researchgate.net/publication/281992045_Persian_clover_Trifolium_resupinatum [accessed Jun 02 2018].

- Youle R. J., Huang A. H. C. (1978).** Albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant Physiol.* 61:13-16.

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

- **Zohary M, Heller D (1984)** The genus *Trifolium*. Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem

ANNEXES

Annexe 1. 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

ANNEXES

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

Résumé

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

Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des fractions des protéines totales, albumines et globulines par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), en rapportant sur une espèce du genre *Trifolium* (*T. resupinatum*), représentées par des accessions collectées dans 10 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 24 bandes de protéines totales 15 bandes d'albumines et 10 bandes de globulines, dont les fréquences sont variables d'une accession à une autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, néanmoins, aucune bande spécifique n'a été enregistrée. La corrélation avec les origines géographique des accessions ainsi que, la corrélation entre le polymorphisme généré par les trois fractions protéiques a été faible.

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

ملخص

يسهم محتوى البروتين بشكل مباشر في فهم عالم النبات وأصبح الآن سمة رئيسية في دراسة التنوع البيولوجي في البحوث الأساسية ، مع تكييف عدد من الخصائص البيئية للنبات نفسه.

تهدف دراستنا إلى إثبات التباين الوراثي المحتمل للكسور من البروتينات الاجمالية و الألبومين والغلوبيولين عن طريق تقنية الترسيب الكهربائي للهلام بولي أكريلاميد . التي يظهرها الجنس المدروس عن طريق عمليات الانضمام التي تم جمعها في 10 مواقع جغرافية إيكولوجية ، تغطي مجموعة واسعة من المراحل المناخية البيولوجية في شمال الجزائر.

تم تحليل تقلب البروتين على أساس وجود وغياب مصفوفة القيود. تم حساب تكرارها عبر جميع عمليات الانضمام

بالنسبة لكل جزء بروتين ، تم حساب المسافات الإقليدية و من تم بناء مخطط شجري وفقاً لطريقة التجميع كما تم تطوير مصفوفات المسافات الجينية بين المدخلات.

وبشكل عام ، فإن الأنواع التي تم دراستها أنتجت 24 عصبية من البروتين الكلي المكون من 15 نطاقاً من الألبومين و 10 فرق من الجلوبيولين ، تختلف الترددات من واحد إلى آخر. ومن بينها ، تم تقاسم عدة نطاقات من قبل اثنين أو ثلاثة مدخلات ومع ذلك ، لم يتم تسجيل أي نطاقات خاص. العلاقة مع الأصول الجغرافية للانضمام وكذلك كان الارتباط بين تعدد الأشكال التي تم إنشاؤها بواسطة ثلاثة أجزاء البروتين ضعيفة..

النتائج التي تم الحصول عليها تجعل من الممكن أن نخلص إلى أن هناك تعدد أشكال البروتين بين مختلف مدخلات المدروسة و المترجمة بعدد القيود المدرجة وتنوعها.

Nom : CHAFI TALBI prénom : Mehdi Rahil	Date de soutenance : 04/07/2018
Thème : Appréciation de la diversité génétique au sein de l'espèce <i>Trifolium resupinatum</i> L. par les marqueurs protéiques (Protéines totales, albumines et globulines).	
Diplôme : Master en sciences biologiques spécialité Biochimie de la nutrition	
<p>Résumé</p> <p>Le contenu en protéines contribue de manière directe à la compréhension du monde végétal, il est désormais un caractère clé aussi bien à l'étude de la biodiversité qu'en recherche fondamentale, tout en conditionnant un certain nombre de caractères écologiques de la plante elle-même.</p> <p>Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des fractions des protéines totales, albumines et globulines par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), en rapportant sur une espèce du genre <i>Trifolium</i> (<i>T. resupinatum</i>), représentées par des accessions collectées dans 10 sites éco-géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien.</p> <p>La variabilité des protéines a été analysée en se basant sur la matrice de présence et absence des bandes. Leur fréquence a été calculée à travers toutes les accessions. Pour chaque fraction protéique, les distances Euclidiennes ont été calculées et un dendrogramme a été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les accessions ont été élaborées également.</p> <p>Globalement, l'espèce étudiée a généré 24 bandes de protéines totales 15 bandes d'albumines et 10 bandes de globulines, dont les fréquences sont variables d'une accession à une autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, néanmoins, aucune bande spécifique n'a été enregistrée. La corrélation avec les origines géographique des accessions ainsi que, la corrélation entre le polymorphisme généré par les trois fractions protéiques a été faible.</p> <p>Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il existe un polymorphisme protéique entre les différentes accessions étudiées, qui se traduit par le nombre des bandes répertoriées et leur variabilité.</p>	
Mots clés : Protéines, Albumines, Globulines, <i>Trifolium</i> , polymorphisme, SDS-PAGE, Algérie.	
Laboratoire de Génétique Biochimie et Biotechnologies Végétales, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri -Constantine	
Jury de soutenance Président : M NOUADRI T. Maitre de Conférences. UFM - Constantine Rapporteur : Mme MEDOUKALI I. Maitre-assistant. UFM - Constantine Examinatrice : Mme. MOUSSAOUI S. Maitre-assistant. UFM - Constantine.	