



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة 1  
كلية علوم الطبيعة والحياة

قسم: الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزيئية

Département : de Biochimie et Biologie Cellulaire et Moléculaire

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie de la nutrition

Intitulé :

---

***Medicago truncatula* Algérienne: analyse de la diversité génétique par  
Les marqueurs protéiques et enzymatiques**

---

Présenté et soutenu par : *BENMOUNAH SARAH*

Le : 21/07/2019

*BOUGHABA AIDA*

Jury d'évaluation :

Président du jury : *MOUSSAOUI SAMIRA* (MCB - UFM Constantine).

Rapporteur : *MEDOUKALI IMANE* (MCB - UFM Constantine).

Examineurs : *GUENDOUZE ASSIA* (MAB - UFM Constantine).

*Année universitaire  
2018 - 2019*

# *Dédicace*

*A la personne la plus chère de cette terre,*

*A qui m'apporte que du bonheur,*

*A ma mère,*

*A ma raison de vivre,*

*Symbole du courage et de sacrifice,*

*A toi mon père,*

*A vous également.*

Mon adorable frère *Samir,*

Mes chères Sœurs *Imene et Sabrina,*

*A mes collègues et amis(es).*

*Et a toutes les personnes qui portent le nom Benmounah et Goutal.*

**SARAH.**

# Dédicaces

*À ma très chère mère, Ton souci majeur est de voir réussir tes enfants, tes prières et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études. Puisse Dieu, le tout puissant, Te préserver et t'accorder santé et longue vie. À mon père, Tu aurais tant aimé assister à l'aboutissement de ce travail, que Dieu Le Tout Puissant t'accueille en son Vaste Paradis. Merci papa pour les sacrifices consentis à mon éducation. L'avenir de tes enfants a toujours été le centre de tes préoccupations. Tu es toujours présent dans mon cœur et mon esprit.*

*En témoignage de ma reconnaissance et mon respect,*

- ❖ *Mes frères et ma soeur Ouiem*
- ❖ *A Mon marie et mon Enfant Mohamed Annes,*
- ❖ *A toute ma famille et ceux qui me sont chers,*
- ❖ *A tous les miens et tout la famille Boughaba*

## *Remerciements*

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

*Nous remercions aussi tout particulièrement notre encadreur Mme MEDOUKALI I maitre de conférences au département de biochimie et biologie cellulaire et moléculaire à l'université Constantine 1 pour la confiance, pour ses précieux conseils de tout ordre, sa disponibilité, sa patience et sa gentillesse. S'est toujours montré à l'écoute tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour l'inspiration, l'aide et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

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

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

*Nous désirons également exprimer nos remerciements au Professeur Mr KHLIFI D le directeur du laboratoire de génétique biochimie et biotechnologies végétales de l'université Constantine 1, vous nous avez ouvert les portes de votre laboratoire pour effectuer ce travail.*

*Nos remercions aussi toute personne qui nous a aidé de près ou de loin afin d'effectuer ce mémoire.*

*Enfin, de peur d'oublier des noms nos remerciements vont à tous nos enseignants qui nous ont soutenu et encouragé durant notre parcours universitaire.*

*On remercie chaleureusement nos familles et nos amis.*

*Nous espérons être à la hauteur de votre confiance*

*Par Sarah et aida.*

# *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 albumines et globulines, ainsi des deux systèmes enzymatiques EST et GOT, par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en rapportant sur une seule espèce du genre *Medicago* représentées par 29 accessions, et collectées dans différents sites éco géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien.

La variabilité des protéines et des enzymes a été analysées en se basant sur la matrice de présence et d'absence des bandes. Leur fréquence a été calculée pour toutes les accessions. Pour chaque marqueur analysé, les distances de Jaccard ont été calculées et des dendrogrammes ont été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les 29 accessions ont été élaborées également.

Globalement, les accessions étudiées ont généré 63 bandes de protéines et enzymes 24 bandes pour les albumines, 27 bandes pour les globulines, et 12 pour le GOT et EST dont le nombre et les fréquences sont variables d'une accession à l'autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, il y a quelques bandes spécifiques à certaines accessions. Le polymorphisme a été souligné par la classification hiérarchique des accessions. La corrélation avec les origines géographiques des accessions a été faible. Une forte corrélation entre le polymorphisme généré par les deux fractions protéiques (albumines et globulines) a été observée, avec une corrélation moindre avec le polymorphisme enzymatique.

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

**Mots clés :** Albumines, Algérie, EST, Globulines, GOT, *M. truncatula*, polymorphisme, SDS-PAGE.

The protein content contributes directly to the understanding of the plant world, it is now a key character both in the study of biodiversity in basic research, while conditioning a number of ecological characters of the plant itself. even. Our study aims to demonstrate a possible genetic variability of the albumin and globulin fractions, as well as the two EST and GOT enzymatic systems, by the technique of polyacrylamide gel electrophoresis, reporting on a single species of the genus *Medicago* represented by 29 accessions, and collected in different eco-geographical sites, covering a wide range of bioclimatic floors in northern Algeria.

The variability of proteins and enzymes was analyzed based on the presence and absence matrix of the bands. Their frequency was calculated for all accessions. For each marker analyzed, Jaccard distances were calculated and dendrograms were constructed using the UPGMA aggregative method. Genetic distance matrices between the 29 accessions were also developed.

Overall, the accessions studied generated 63 protein bands and 24 band enzymes for albumins, 27 bands for globulins, and 12 for GOT and EST whose number and frequencies are variable from one accession to another. Of these, several bands have been shared by two or three accessions, there are some bands specific to certain accessions. Polymorphism has been underlined by the hierarchical classification of accessions. The correlation with the geographical origins of accessions has been weak. A strong correlation between the polymorphism generated by the two protein fractions (albumin and globulin) was observed, with a lesser correlation with enzymatic polymorphism.

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

**Key words:** Albumin, Algeria, EST, Globulins, GOT, *M. truncatula*, polymorphism, SDS-PAGE .

## ملخص

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

تهدف دراستنا إلى إثبات التباين الوراثي المحتمل للكسور الألبومين والجلوبيولين و الاستيراز و القلوتامات او كزالو اسيتات عن طريق تقنية الترسيب الكهربائي للهلام بولي أكريلاميد . التي يظهرها الجنس المدروس عن طريق عمليات الانضمام التي تم جمعها في 29 مواقع جغرافية إيكولوجية، تغطي مجموعة واسعة من المراحل المناخية البيولوجية في شمال الجزائر.

تم تحليل تباين البروتينات والإنزيمات بناءً على مصفوفة وجود و غياب العصابات. تم حساب تواترها لكل الملحقات. لكل علامة تم تحليلها، تم حساب المسافات Jaccard وشيدت dendrograms. باستخدام الأسلوب التجميعي UPGMA كما تم تطوير مصفوفات المسافة الوراثية بين 29 ملحقات.

عمومًا، ولدت الإضافات المدروسة 63 نطاقًا للبروتين و 24 إنزيمًا للفرقة للألبومات، و 27 نطاقًا للجلوبيولين، و 12 للـ EST و GOT الذين يتغير عددهم وتردداتهم من انضمام إلى آخر. من بين هذه النطاقات، تمت مشاركة عدة نطاقات من قبل اثنين أو ثلاثة مداخل ، وهناك بعض النطاقات المحددة لبعض المداخل. وقد تم التأكيد على تعدد الأشكال من خلال التصنيف الهرمي للانضمامات. كانت العلاقة مع الأصول الجغرافية للانضمام ضعيفة. ولوحظ وجود ارتباط قوي بين تعدد الأشكال الذي تولده جزأين من البروتين (الألبومين والجلوبيولين) ، مع وجود ارتباط أقل مع تعدد الأشكال الأنزيمي نتيج لنا النتائج التي تم الحصول عليها أن نستنتج أن هناك تعدد الأشكال البروتيني والأنزيمي بين العناصر المختلفة المدروسة، مما يؤدي إلى عدد النطاقات المسجلة وتغيرها.

الكلمات المفتاحية: SDS-PAGE، تعدد الأشكال ، *M. truncatula* ، EST ، GOT ، Albumin ، Globulins ، الجزائر.

# *SOMMAIRE*

## Liste des abréviations

## Liste des tableaux

## Liste des figures

Introduction.....	1
-------------------	---

Chapitre 1 : revue bibliographique.....	3
---	---

### **1. Généralités sur les légumineuses.....3**

### **2. présentation du genre *Medicago*.....4**

#### 2.1. Taxonomie et génétique.....4

#### 2.2. Aire de répartition du genre *Medicago*.....5

#### 2.3. Espèces spontanées du genre *Medicago* rencontrées en Algérie.....6

### **3. Présentation de l'espèce étudiée (*M. truncatula*).....6**

#### 3.1. Description botanique.....6

#### 3.2. Position systématique.....7

#### 3.3. Air répartition.....7

#### 3.4. *M. truncatula* Plante modèle.....7

#### 3.5. Intérêt Biologique.....8

#### 3.6. Intérêt Agronomique.....9

#### 3.7. Intérêt de génétique .....9

### **4. la diversité génétique.....9**

#### 4.1. Etude de la diversité génétique.....10

#### 4.2. Les marqueurs morphologiques et agronomiques.....10

#### 4.3. Marqueurs biochimiques.....10

#### 4.4. Les marqueurs moléculaires.....11

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

### **1. Matériel végétal.....12**

<b>2. Méthode d'étude.....</b>	<b>14</b>
2.1. Analyse protéique.....	14
2.1.1. Extraction séquentielle des Albumines et des globulines.....	14
a) Délipidation de la farine.....	14
b) Extraction des Albumines .....	14
c) Extraction des globulines.....	14
2.1.2 Préparation des extraits pour l'électrophorèse.....	14
2.2. Technique d'électrophorèse.....	15
2.2.1. Principe .....	15
2.2.2. Préparation des gels.....	15
2.2.3. Tampon d'électrophorèse.....	16
2.2.4. Conditions de migration.....	16
2.2.5. Fixation, coloration et décoloration .....	16
2.3. Analyse enzymatique.....	17
2.4. Analyse des données.....	17

<b>CHAPITRE 3 : Résultat et Discussion.....</b>	<b>18</b>
---	-----------

<b>1. Analyse de la diversité génétique des accessions de <i>M. truncatula</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Analyses de la diversité protéique.....</b>	<b>18</b>
2.1. Fractionnement des Albumines et lecture des profils électrophorétiques.....	18
2.1.2. Fréquences des albumines.....	21
2.1.3. Distances génétiques.....	23
2.1.4. Classification hiérarchique.....	25
2.2. Fractionnement des Globulines et lecture des profils électrophorétiques.....	26
2.2.1. Fréquences des globulines.....	28
2.2.2. Distances génétiques.....	30
2.2.3. Classification hiérarchique.....	32

<b>3. Analyse enzymatique.....</b>	<b>33</b>
3.1. Fréquences alléliques des enzymes.....	35
3.2. Distances génétiques.....	37
3.3. Classification hiérarchique.....	39
<b>4. Corrélation entre les trois fractions protéiques étudiées.....</b>	<b>40</b>
<b>5. Discussion.....</b>	<b>41</b>
<hr/>	
Conclusion générale et perspectives.....	44
<hr/>	
Références bibliographiques.....	46
<hr/>	
Annexe	
<hr/>	
Résumés	

## ABREVIATIONS

<b>Alt</b>	Altitude
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Chlorure de calcium
<b>DG</b>	Distance Génétique
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tetra-acétique
<b>EGRA</b>	Ethylène Glycol Tetraacetic Acid
<b>KDa</b>	Kilo Dalton
<b>LAT</b>	Latitude
<b>LON</b>	Longitude
<b>Mg</b>	Milli gramme
<b>Min</b>	Minute
<b>Pm</b>	La pluviométrie moyenne
<b>PMSF</b>	Phenylmethanesulfonylfluoride
<b>RAPD</b>	Random Amplified Polymorphic DNA
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>Rpm</b>	Rotation par minute
<b>SDS</b>	Sodium dodecyl sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
<b>TCA</b>	Trichloroacétique Acide
<b>TEMED</b>	tétraméthyléthylènediamine
<b>TM</b>	La température maximale
<b>Tm</b>	Moyenne de la Température minimale du mois le plus froid
<b>UI</b>	Micro litre
<b>UPGMA</b>	Unweighted pair group method arithmetic average
<b>HH</b>	Hyper-Humide
<b>SH</b>	Subhumide
<b>SS</b>	Semi Sec
<b>APS</b>	Solution d'ammonium persulfate
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Acide sulfurique
<b>AA</b>	Acide Aminé

<b>AAT</b>	Aspartate aminotransferase
<b>TAMET</b>	Tris- Acide ascorbique-2-Mercapto éthanol- EDTA- Triton
<b>H</b>	Humide
<b>Na Cl</b>	chlore de sodium
<b>Mg Cl<sub>2</sub></b>	Chlorure de magnésium

## TABLE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau 1.** Composition des réserves de quelques graines d'espèces cultivées.....4

**Tableau 2.** Espèces annuelles et pérennes du genre *Medicago* rencontrées en Algérie  
.....6

### CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

**Tableau 3.** Origines géographiques des 29 accessions étudiées, avec les paramètres éco-géographiques correspondants.....13

### CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION

**Tableau 4.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences des albumines des 29 accessions de *M. truncatula* .....22

**Tableau 5.** Distances génétiques obtenues entre les 29 accessions de *M. truncatula* en se basant sur les données des albumines.....24

**Tableau 6.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences des globulines des 29 accessions de *M. truncatula* .....29

**Tableau 7.** Distances génétiques obtenues entre les 29 accessions de *M. truncatula* en se basant sur les données des Globulines.....31

**Tableau 8.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences des allozymes des 29 accessions de *M. truncatula* .....36

**Tableau 9.** Distances génétiques basées sur la diversité enzymatique obtenues entre les 29 accessions de *M. truncatula* .....38

## TABLE DES FIGURES

### CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>Figure 1.</b> Phylogénie de quelques Légumineuses .....	3
<b>Figure 2.</b> Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae .....	3
<b>Figure 3.</b> Distribution mondiale du genre <i>Medicago</i> .....	5
<b>Figure 4.</b> Distribution géographique de quelques espèces de genre <i>Medicago</i> .....	5
<b>Figure 5.</b> Un rameau de <i>Medicago truncatula</i> ; fleur, gousse, graines .....	6
<b>Figure 6.</b> Cycle de vie de la plante model <i>M. truncatula</i> . A : stade plante B : stade feuille C : stade fleur D : stade gousse E : stade graine .....	7

### CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

<b>Figure 7.</b> Localités géographiques des 29 accessions de l'espèce <i>M. truncatula</i> dans le nord Algérien.....	12
---	----

### CHAPITRE 3 : RESULTAT ET DISCUSSION

<b>Figure 8.</b> Profils électrophorétiques des albumines obtenus par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes nom réductrices chez 29 accessions de <i>M. truncatula</i> : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin.....	20
<b>Figure 9.</b> Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de <i>M. truncatula</i> basée sur le polymorphisme des albumines : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe.....	26
<b>Figure 10.</b> Profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes nom réductrices chez 29 accessions de <i>M. truncatula</i> : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin. ....	27
<b>Figure 11.</b> Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de <i>M.</i> <i>truncatula</i> basée sur le polymorphisme des globulines : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe, 5) le cinquième groupe, 6) le sixième groupe.....	33
<b>Figure 12.</b> Zymogrammes du système enzymatique EST pour les 29 accessions de l'espèce <i>M. truncatula</i> : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin.....	34

<b>Figure 13.</b> Zymogramme de système enzymatique GOT pour 29 accessions de l'espèce <i>M.truncatula</i> : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin.....	34
<b>Figure 14.</b> Les phénotypes des deux systèmes enzymatiques : a) pour l'Est, b) pour le GOT.....	35
<b>Figure 15.</b> Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de <i>M. truncatula</i> basée sur le polymorphisme des enzymes (Got-Est) : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe.....	40

# *INTRODUCTION*

L'Algérie est réputée pour sa richesse en ressources phytogénétiques grâce à sa situation géographique et à sa diversité pédoclimatique, La préservation de ces ressources phytogénétiques a été une préoccupation majeure pour les fourrages sauvages et les légumineuses pastorales, car ils ont été soumis à une grave érosion génétique. Les espèces de *Medicago* et surtout les espèces annuelles peuvent être utilisées pour valoriser et améliorer ces ressources, parce qu'ils constituent un patrimoine phylogénétique extrêmement diversifié.

Le problème persistant est que la plupart des légumineuses sont difficiles à étudier parce qu'elles ont un grand génome (Barker et al, 1990. Handberg et Stougaard, 1992). A cet effet, *M. truncatula* a été choisi comme une espèce modèle pour des légumineuses pour atteindre l'objectif d'avoir un système génétique simple, et tout ça grâce à ses plusieurs avantages et intérêts qui font une plante incomparable : c'est une plante annuelle originaire du pourtour méditerranéen, résistante au froid et à la sécheresse, autonome en azote et surtout très riche en protéine (lesins et lesins, 1979). Elle offre de nombreux atouts aux niveaux de la biologie, de la génétique et des différents outils génomiques (Huguet et Prospero, 1996. Young et al, 2005). De plus, *M. truncatula* présente une grande syntenie avec beaucoup de légumineuses cultivées (Zhu et al, 2005), permettant ainsi le transfert des acquis sur cette plante modèle vers ces légumineuses. Ces avantages sont mis à profit pour des études de génomique fonctionnelle et structurale en vue de l'identification des gènes agronomiques intéressants, ainsi que l'étude des interactions légumineuses-agents pathogènes et symbiotes (Cook, 1999. Cook et al, 2000). Cette plante a des propriétés pharmaceutiques également, grâce à sa résistance à certaines maladies (Dixon, 1999).

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

L'amélioration des plantes est basée sur l'utilisation de la variabilité génétique naturelle et sur des méthodes d'exploitation rapides et fiables de cette diversité dans les programmes de sélection (Eagles et al, 2001. Dekkers et Hospital, 2002). Les

marqueurs enzymatiques et protéiques directement issus du polymorphisme, sont utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'améliorations des plantes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la diversité génétique de différents écotypes de l'espèce *M. truncatula*, qui sont prélevés dans différentes régions éco-géographiques dans le nord Algérien, par des marqueurs protéiques (albumines et globulines) et enzymatiques (estérases et glutamate oxaloacétate transaminase), on se basant sur la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE).

Le manuscrit se décline en trois chapitres :

Le premier chapitre est une revue bibliographique qui comprend une présentation générale des légumineuses, du genre *Medicago* L. et plus particulièrement l'espèce modèle *M. truncatula*. Ainsi qu'un aperçu sur la diversité génétique, et les marqueurs enzymatiques et protéiques.

Le deuxième chapitre décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude.

Les étapes suivies dans l'exploitation des résultats ainsi que leur discussion sont présentées dans un troisième chapitre. Une conclusion générale et des perspectives sont enfin données.

*REVUE*  
*BIBLIOGRAPHIQUE*

## 1. Généralités sur les légumineuses

Les légumineuses (*Fabaceae*) constituent une famille très diversifiée et importante d'angiosperme, avec plus de 650 genres et 18 000 espèces sont la troisième plus grande famille de plantes supérieures et la deuxième plus importante pour les pâturages d'intérêt agricole, après les Poacées (graminées) qui incluent la canne à sucre et les céréales tel le maïs, le riz, le blé, l'orge, l'avoine, le seigle et le millet (Young et al., 2003).

Cette famille est répartie en 3 sous familles : *Mimosoideae*, *Caesalpinioideae* et *Papilionoideae* (Figure 1) (Doyle et Luckow., 2003). La sous famille des *Papilionoideae* regroupe les espèces cultivées les plus importantes économiquement (Sprent., 1995): le soja (*Glycine max*,  $2n = 4x = 40$ ), le haricot (*Phaseolus vulgaris*,  $2n = 2x = 22$ ), le pois (*Pisum sativum*,  $2n = 2x = 14$ ), la luzerne (*Medicago sativa*,  $2n = 4x = 32$ ), l'arachide (*Arachis hypogaea*,  $2n = 4x = 40$ ), le pois chiche (*Cicer arietinum*,  $2n = 2x = 16$ ), et la fève (*Vicia faba*,  $2n = 2x = 16$ ). Ces légumineuses cultivées forment deux groupes appelés Galegoïdes et Phaseoloïdes (Figure 2), à l'exception de l'arachide qui appartient au groupe des Aeschynomeneae (Broughton et al., 2003).

Une caractéristique connue des légumineuses est leur capacité à développer des nodules racinaires et à fixer l'azote en symbiose avec les bactéries rhizobiennes, une telle caractéristique rend ces plantes adaptées à la recolonisation de sols perturbés, déficients en azote, donnant un matériel végétal riche en protéines (Cornara et al., 2015). Les légumineuses forment également une symbiose bénéfique avec les champignons du sol, qui colonisent les cellules des racines et transfèrent les nutriments du sol tels que le phosphore vers la plante, Comme pour toutes les plantes, la croissance et la productivité des légumineuses sont réduites par les contraintes environnementales telles que les agents pathogènes et Les parasites, la sécheresse et la salinité (He et al., 2009).

Les graines de légumineuses sont plus riches en protéines et moins riches en glucides que celles de céréales (Tableau 1), on distingue les espèces à graines riches en protéines et en huile, sans amidon, classées comme oléagineux (soja, arachide) et les espèces à graines riches en protéines, classées comme protéagineux (pois, féverole) ou légumes secs (haricot, lentille, pois chiche) (Lazrek - Ben Friha., 2008). Les graines de légumineuses sont des aliments de base dans de nombreuses régions du monde et constituent une source importante de protéines, de lipides, de glucides et de minéraux. Tandis que, les légumineuses fourragères telles que la

luzerne et le trèfle constituent une source importante de nutrition pour les bétails (He et al., 2009).

**Tableau 1.** Composition des réserves de quelques graines d'espèces cultivées d'après (Lazrek - Ben Friha, 2008).

	Composition moyenne en %		
	Protéines	Huiles	Carbohydrates (amidon)
<b>Céréales</b>			
Orge	12	3	76
Maïs	10	5	80
Avoine	13	8	66
Seigle	12	2	76
Blé	12	2	75
<b>Légumineuses</b>			
Haricot	23	1	56
Petit pois	25	6	52
Arachide	31	48	12
Soja	37	17	26

## 2. Présentation du genre *Medicago* L.

Selon Fournier (1961), le terme "*Medicago*" vient du mot latin "*Medica*" ou "herbes de médic", il a été modifié par la suite et devient : *Medicago*.

### 2.1. Taxonomie et génétique

Le genre *Medicago* appartient à la tribu *Trifolieae* (famille des *Fabaceae*), sous-famille des *papilionoideae*, Il est proche des genres *Melilotus* et *Trigonella* (Lesins et Lesins, 1979). Plus de 60 espèces différentes, notamment des annuelles et des vivaces, des diploïdes, Des tétraploïdes et des hexaploïdes, avec des nombres chromosomiques de base de  $n = 7$  et  $n = 8$  (Quiros, 1983). Présentant 55 espèces : 34 herbacées annuelles et herbacées 21 pérennes (Lesins et Lesins, 1979). Ce genre comprend la principale culture fourragère largement cultivée et les espèces de mauvaises herbes *M. sativa* L. (luzerne) et l'espèce modèle de légumineuses *M. truncatula* Gaertn (Sadeghian et Hesamzadeh Hejazi, 2014).

Trois niveaux de ploïdies se trouvent dans *Medicago* : Des diploïdes, des tétraploïdes et des hexaploïdes. La plupart des diploïdes sont du type  $2n = 16$ , avec un nombre chromosomique de base de  $x = 8$ , quatre espèces de diploïdes ont  $2n = 14$  chromosomes et une a des membres avec  $2n = 16$  et  $2n = 14$  chromosomes (Lesins et Lesins, 1979). Les

pérennes tétraploïdes ( $2n = 4x = 32$ ) et hexaploïdes ( $2n = 6x = 48$ ) (Lesins, 1970). Les espèces annuelles sont strictement autogames par contre les espèces pérennes sont allogames (Quiros, 1983).

## 2.2. Aire de répartition du genre *Medicago*

Il est admis à la suite de Vavilov que le centre d'origine du genre *Medicago* est le Croissant fertile (Prosperi et al., 1993). La plupart des espèces de *Medicago* sont originaires du bassin méditerranéen et aussi de l'ouest de l'Asie (Lesins et Lesins, 1979). Au XIXe siècle, ils envahissent d'autres parties du monde, notamment les continents américain et australien et surtout dans les régions qui ont un climat ressemblant au bassin méditerranéen, en faveur de plusieurs vagues de colonisation (Delalande et al., 2007) (indiquées par les flèches sur la figure 3).

Les luzernes s'accoutument des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides (Lapeyronie, 1982) (figure 3, 4). Les espèces annuelles du genre *Medicago* L. se retrouvent dans tous les étages bioclimatiques de l'humide au saharien, les uns à large spectre de répartition, les autres à répartition spatiale délimitée (Chebouti et al., 2001). *M. truncatula* et *M. polymorpha*, présentes dans tous les étages bioclimatiques, sont considérées comme des formes ubiquistes, un ensemble d'espèces formé par *M. ciliaris*, *M. intertexta*, *M. orbicularis* et *M. murex*, s'étend de l'étage humide au semi-aride. Tandis que *M. laciniata* et *M. minima* sont présentes du semi-aride au saharien.

Les *Medicago* pérennes se rencontrent essentiellement sur les rives nord de la Méditerranée et s'étendent jusqu'en Asie centrale, quelques formes spontanées sont localisées sur les hauts plateaux des chaînes de l'Atlas Nord-Africain. Dans le complexe d'espèces pérennes, l'inter-fertilité est entretenue naturellement entre les différentes formes spontanées qui le composent, ainsi le maintien de types différents (populations naturelles ayant des caractères singuliers) est dû essentiellement à l'isolement géographique (Medoukali, 2016).

Les *Medicago* arbustives sont représentées, depuis peu, par trois espèces pérennes ligneuses récemment décrites *Medicago arborea* ( $2n = 4x = 32$ ) présente en Méditerranée orientale, la seule espèce ligneuse cultivée, *Medicago citrina* ( $2n = 6x = 48$ ) localisée dans le bassin occidental de la Méditerranée, *Medicago strasseri*, endémique de Crète, est une forme insulaire (Bakhti, 2011).

### 2.3. Espèces spontanées du genre *Medicago* rencontrées en Algérie

Le genre *Medicago* est représenté par de nombreuses espèces spontanées dont les plus importantes sont :

**Tableau 2.** Espèces annuelles et pérennes du genre *Medicago* rencontrées en Algérie (Hireche, 2006).

Espèces	Caractéristique et aire de répartition en Algérie
<i>M. sativa</i>	plante vivace rencontré un peu partout.
<i>M. falcate</i>	plante vivace très résistante au froid.
<i>M. lupulina</i>	dite lupiline ou minette : plante annuelle ou bisannuelle.
<i>M. scundiflora</i>	plante annuelle ou bisannuelle.
<i>M. marina</i>	plante vivace, elle pousse sur les sables maritimes.
<i>M. scutellata</i>	dite luzerne à écusson : plante annuelle, se rencontre sur les sols argileux du Tell.
<i>M. orbicularis</i>	plante annuelle du pâturage de Tell.
<i>M. echuris</i>	Plante annuelle, elle est assez commune dans les pâturages de Telle (constantinois).
<i>M. ciliaris</i>	rencontré surtout dans les pâturage et prairies du Tell à sol semi salin.
<i>M. truncatula</i>	plante annuelle très commune dans le Tell.
<i>M. littoralis</i>	plante annuelle, elle est abonde sur les dunes et les littoral et de l'intérieur. Elles constituent des pâturages de bonne qualité
<i>M. murex</i>	plante annuelle commune dans tout le territoire algérien.
<i>M. minima</i>	plante annuelle, est souvent rencontré sur les sols pauvres.
<i>M. Arabica</i>	plante annuelle.
<i>M. lanciniata</i>	plante annuelle.
<i>M. hispida</i>	plante annuelle.

### 3. Présentation de l'espèce d'étude *M. truncatula*

La luzerne tronquée (*Medicago truncatula* Gaertn = *M. Tribuloides* Dsr) est une espèce végétale herbacée des régions méditerranéennes (Adel Amar, 2016).

#### 3.1. Description botanique

C'est une plante annuelle herbacée, ramifiée au port souvent rampant de 15 à 80 cm de long. Elle porte des feuilles trifoliolées. Ses petites fleurs jaunes de 5 à 8 mm donnent après autofécondation des gousses cylindriques très dures, en forme de vrilles renfermant 4 à 6 graines (figure 5). Les spires jointives de la gousse portent des épines recourbées

perpendiculaires au plan des spires. Les graines de cette plante ont une durée de vie importante supérieure à 40 ans, et une dormance qui peut être levée facilement (Lesins et Lesins,. 1979).

*Medicago truncatula* est une espèce diploïde ( $2n=16$ ) et autogame. Son génome est de petite taille il est estimées à 500-550 (Mpb) c.à.d. 3 à 4 fois supérieur à celui d'*arabidopsi thaliana*, équivalent à celle de riz et est environ dix fois inférieur à celui de pois (Denarie et Gamas,. 2001. young et al,. 2003) puisque elle présente un fort degré de synthèses avec d'autre légumineuses (Choi et al,. 2004. Kalo et al,. 2000. Yan et al,. 2003. Cannon et al,. 2003). *M. truncatula* a un cycle de vie court qui varie de 2 à 3 mois (Lesins et Lesins,. 1979) (figure 6).

### **3.2. Position systématique**

Règne : *plantae*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille : *papilionoideae*

Tribu : *Trifolieae*

Genre: *Medicago*

Espèce: *Medicago truncatula*

### **3.3. Air de repartition**

Cette espèce est localisée principalement dans les régions chaudes et de basse altitude méditerranéennes, elle est considérée comme une espèce assez sensible au froid et aux parasites foliaires. Elle est considérée comme une plante modèle (à un moindre degré que *M. sativa*) essentiellement lors des études sur la symbiose plante-*rhizobium* (Prosperi,. 1995).

### **3.4. *M. truncatula* Plante modèle**

La découverte de l'existence d'une forte similitude dans l'organisation des génomes (conservation synténique) chez des plantes appartenant à une même famille botanique, suggère qu'à l'avenir les progrès réalisés dans l'étude du génome d'une espèce devraient pouvoir être utiles pour d'autres espèces proches (Gale et Devos,. 1998).

Mais la distance phylogénétique existante entre familles botaniques rend indispensable l'étude d'espèces modèles au sein de chaque famille botanique possédant des espèces importantes pour l'agriculture. C'est le cas pour les céréales pour lesquelles le riz a été choisi comme espèce modèle (Shimamoto et Kyozyuka, 2002). De même, l'espèce *Arabidopsis thaliana* a été choisie comme plante modèle pour les crucifères (Jackson et al., 2000).

La plupart des légumineuses sont difficiles à étudier parce qu'elles ont un grand génome. Par contre les espèces *M. truncatula* et *Lotus japonicus* (Barker et al., 1990. Handberg et Stougaard, 1992) ont un génome relativement petit (Udvardi, 2002), et sont devenues des plantes modèles populaires. Ces deux espèces présentent des caractéristiques génétiques similaires, mais développent des nodules de types différents (croissance indéterminée/déterminée). *M. truncatula*, comme la plupart des légumineuses des régions tempérées, forme des nodules indéterminés ce qui la différencie de *L. japonicus* qui présente à l'inverse un type de nodule déterminé. Par ailleurs leurs partenaires symbiotiques sont relativement éloignés du point de vue taxonomique puisqu'elles appartiennent à deux genres différents. En effet, *L. japonicus* est nodulée par *Mesorhizobium loti*, alors que *M. truncatula* est nodulée par *Sinorhizobium meliloti* dont le séquençage de son génome est terminé (Capela et al., 2001).

*M. truncatula* est une espèce autogame qui présente un génome diploïde de taille relativement réduite. Elle se distingue par un temps de génération de graine à graine court, ses niveaux de transformation réalistes, ses excellentes populations mutantes et collections de divers écotypes (Barker et al., 1990. Cook, 1999), permettant et facilitant les analyses génétiques et moléculaires (Denarie et Gamas, 2001). Elle est transformée par *Agrobacterium tumefaciens* et régénérée via embryogenèse somatique (Thomas et al., 1992. Chabaud et al., 1996). *M. truncatula* est également hôte d'un grand nombre d'agents pathogènes (champignons, oomycètes, bactérie et virus) qui attaquent les légumineuses cultivées (Tivoli et al., 2006. Rose, 2008). Toutes ces caractéristiques ont contribué à choisir *M. truncatula* comme légumineuse modèle (Cook, 1999).

### 3.5. Intérêt Biologique

*M. truncatula* est une espèce prolifique puisque chaque plante produit 500 à 1000 graines. Elle peut être également multipliée aisément par bouturage. Cette espèce possède

un habitat variable. Elle prédomine au niveau des stations sèches, des sols lourds, marneux ou argileux. Comme toutes les légumineuses sa principale caractéristique biologique est la fixation symbiotique de l'azote atmosphérique (lesins et lesins,. 1979).

Récemment, l'intérêt fut focalisé sur *M. truncatula* comme système pour examiner la grande richesse de production de métabolites secondaires par les légumineuses (Gepts et al., 2005) et la résistance aux maladies (Frugoli et Harris,. 2001). Cette plante est aussi largement étudiée pour analyser le déterminisme des symbioses endo-mycorhiziennes lui permettant de prélever le phosphore du sol (Journet et al., 2001).

### **3.6. Intérêt Agronomique**

Notre espèce d'étude possède un intérêt agronomique majeur pour la production fourragère en zone sèche et pour la suppression ou la diminution de l'épandage d'engrais azotés. Son intérêt est étroitement lié à sa capacité à se ressemer naturellement d'une année à une autre. Cette propriété peut aboutir à une installation pérenne adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes diminuant ainsi le phénomène d'érosion des sols. Par ailleurs, de nombreuses espèces et sous-espèces de *Medicago* présentent aussi des caractères d'intérêt agronomique, qu'il serait souhaitable d'introduire dans la luzerne cultivée, tels que la tolérance au pâturage (capacité d'enracinement et de repousse), la résistance à la sécheresse, à la salinité et aux maladies (Prosperi et al., 1993).

### **3.7. Intérêt génétique**

*M. truncatula* forme de petites graines permettant leur culture dans des tubes à essais. Le partenaire bactérien de cette plante modèle est le plus étudié parmi les bactéries rhizobiales et le séquençage du génome de la souche de référence de *S. meliloti* 1021 a été achevé (Capela et al, 2001). Elle est facilement transformée par *Agrobacterium rhizogenes* et *A. tumefaciens* (Boisson et al., 2001).

*M. truncatula* a permis d'identifier un grand nombre de gènes reliés à la symbiose dont certains ont déjà été isolés, séquencés et leur expression étudiée (Gamas et al., 1996. Ane et al., 2002. Amor et al., 2003. Lévy et al., 2004).

## **4. Diversité génétique**

Il existe un grand nombre de variante entre les individus au sein d'une même espèce (variabilité génétique). C'est cette diversité génétique (Ressources Génétiques) qui constitue la matière première du sélectionneur pour créer de nouvelles variétés. Ces ressources

génétiques contiennent un patrimoine qu'il est nécessaire de préserver et de mieux connaître afin de mieux l'utiliser.

Diversité génétique c'est la différence ou la variation qui se trouve au niveau des gènes, c'est la variation de la quantité d'information génétique des individus. Elle est définie par le niveau de similarité ou de différence dans cette composition génétique et représente le fondement de la biodiversité (Parizeau,. 1997).

La diversité biologique ou la biodiversité désigne la variété de forme de vie comprennent des plantes, les animaux et les micro-organismes, les gènes qu'ils contiennent et les écosystèmes qu'ils forment. Elle englobe à la fois la diversité à sein des espèces (diversité intra-spécifique) entre les espèces (niveau interspécifique) et entre les écosystèmes (diversité d'écosystème) (Parizeau,. 1997).

#### **4.1. Etude de la diversité génétique**

L'estimation de la variabilité génétique est indispensable pour la gestion, la conservation (in situ et ex situ) et l'utilisation efficace des ressources phylogénétiques (Djé et al., 2000). La diversité peut être évaluée par l'utilisation des marqueurs morphologiques (à travers les descripteurs) et génétiques (à travers des techniques biochimiques ou moléculaires).

#### **4.2. Marqueurs morphologiques et agronomiques**

La diversité génétique est évaluée en mesurant la variation de traits phénotypiques (la couleur et la forme de graine, la couleur de fleur, l'habitude de croissance, etc.) ou des traits agronomiques quantitatifs (le rendement, la tolérance au stress, etc.).

Le nombre de marqueurs morphologiques est très limité. Ils sont généralement dominants rendant possible la distinction entre individus homozygote et hétérozygote (Lefebvre et Chèvre,. 1995. Kumar,. 1999). Enfin les caractères morphologiques monogéniques ne peuvent être utilisés comme marqueurs génétiques que si leur expression est reproductible sous différents environnements (Staub et al., 1996).

#### **4.3. Marqueurs biochimiques**

Il est important pour le sélectionneur de connaître l'aspect purement génétique du caractère étudié, indépendamment de son expression. A cet effet, de nombreux marqueurs biochimiques ou moléculaires ont été développés depuis une vingtaine d'années. Les marqueurs biochimiques, généralement des isozymes ou des protéines de réserve, ont un

pouvoir de discrimination plus élevé que les marqueurs morphologiques, traduisent directement l'activité des gènes, sont neutres et peuvent être révélés dans plusieurs organes à différents stades de développement. Ils sont mis en évidence par électrophorèse, sur la base des propriétés de migration des protéines, et révélés par une simple coloration pour les protéines ou par une coloration histochimique spécifique pour les enzymes. Les protéines ont l'avantage d'être plus nombreuses que les marqueurs morphologiques, mais dépendent également de l'organe considéré (Mebarek, 2010).

Les isoenzymes présentent un polymorphisme basé sur les différentes formes d'une enzyme. Généralement codominant, ils sont les produits de différents allèles d'un ou de plusieurs gènes. Les isoenzymes ont un faible niveau de polymorphisme et dépendent souvent de stades de développement physiologiques de la plante (Tanksley et Orton, 1983).

#### **4.4. Marqueurs moléculaires**

Les marqueurs moléculaires correspondent à des différences nucléotidiques existant au niveau de la molécule d'ADN (d'où le terme moléculaire), des techniques de biologie moléculaire permettent de révéler ce polymorphisme de séquences. Ces différences entre allèles peuvent correspondre à des mutations ponctuelles (substitution, insertion, délétion), des réarrangements chromosomiques, ou des mutations silencieuses (sans effet sur l'expression du locus).

Les marqueurs moléculaires ont un développement stable, ils sont détectables dans tous les tissus et à tous les stades de développement, ils ne sont pas influencés par les conditions environnementales (Santoni et al., 2000).

Ces marqueurs moléculaires deviennent aujourd'hui un outil essentiel d'amélioration des plantes et ouvrent de nouvelles perspectives pour le sélectionneur. Ils sont utilisés pour étudier la variabilité et la diversité directement sur l'ADN plutôt que sur des caractères qui sont soumis à l'environnement. On étudie la diversité à sa base plutôt que sur les produits de son expression. Ils sont donc moins subjectifs (Rieseberg et Ellstrand, 1993).

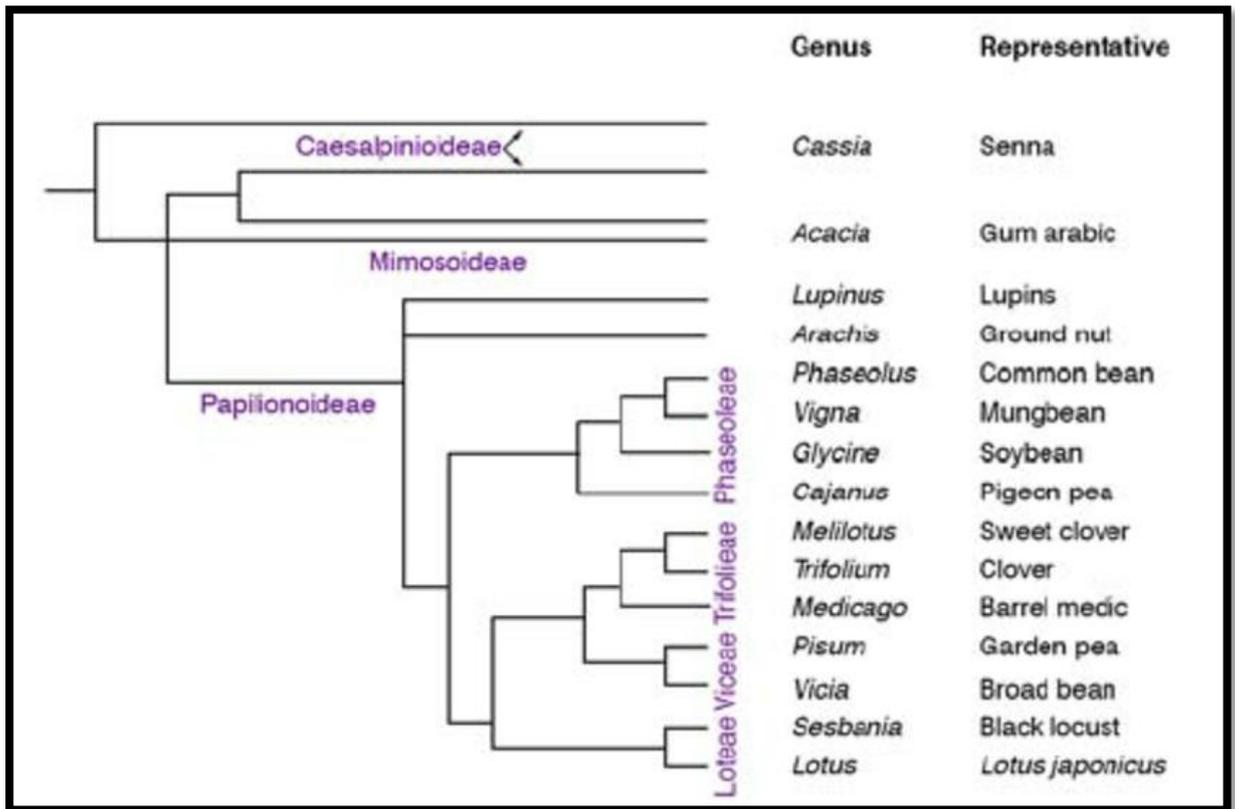


Figure 1. Phylogénie de quelques Légumineuses (Udvardi et col, 2005).

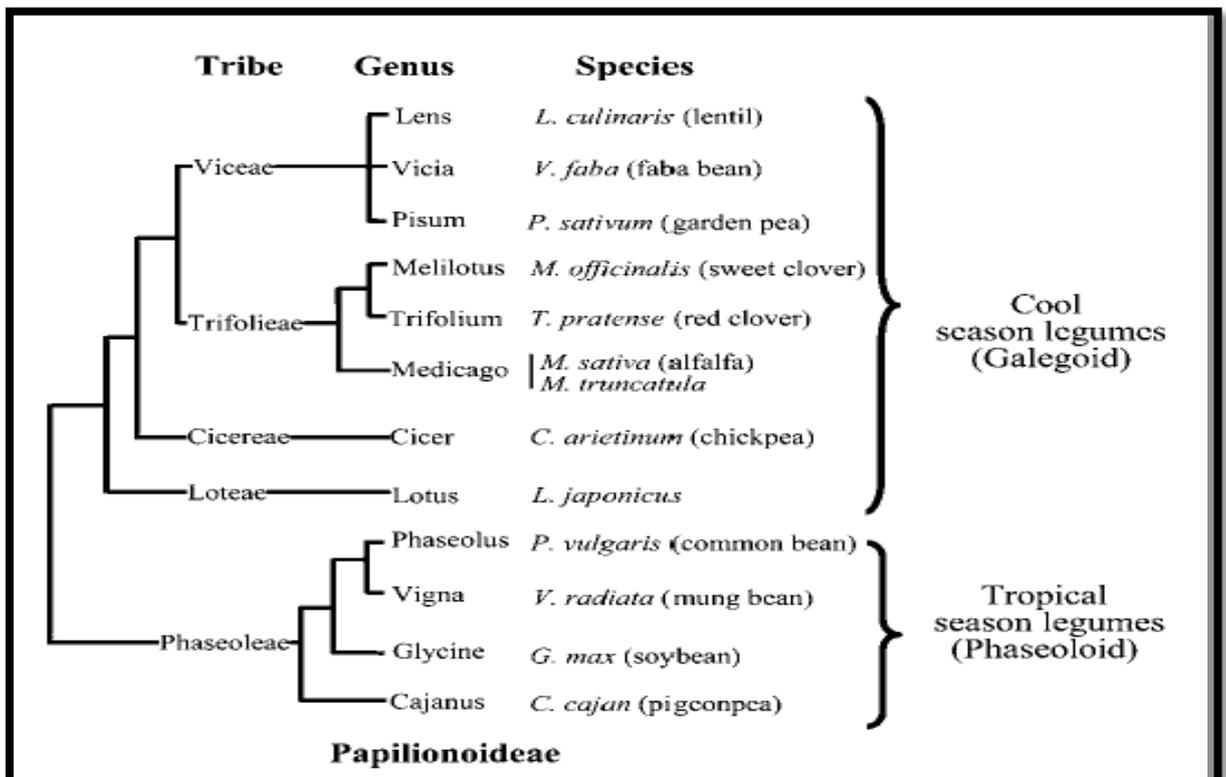


Figure 2. Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae (Zhu et al, 2005).

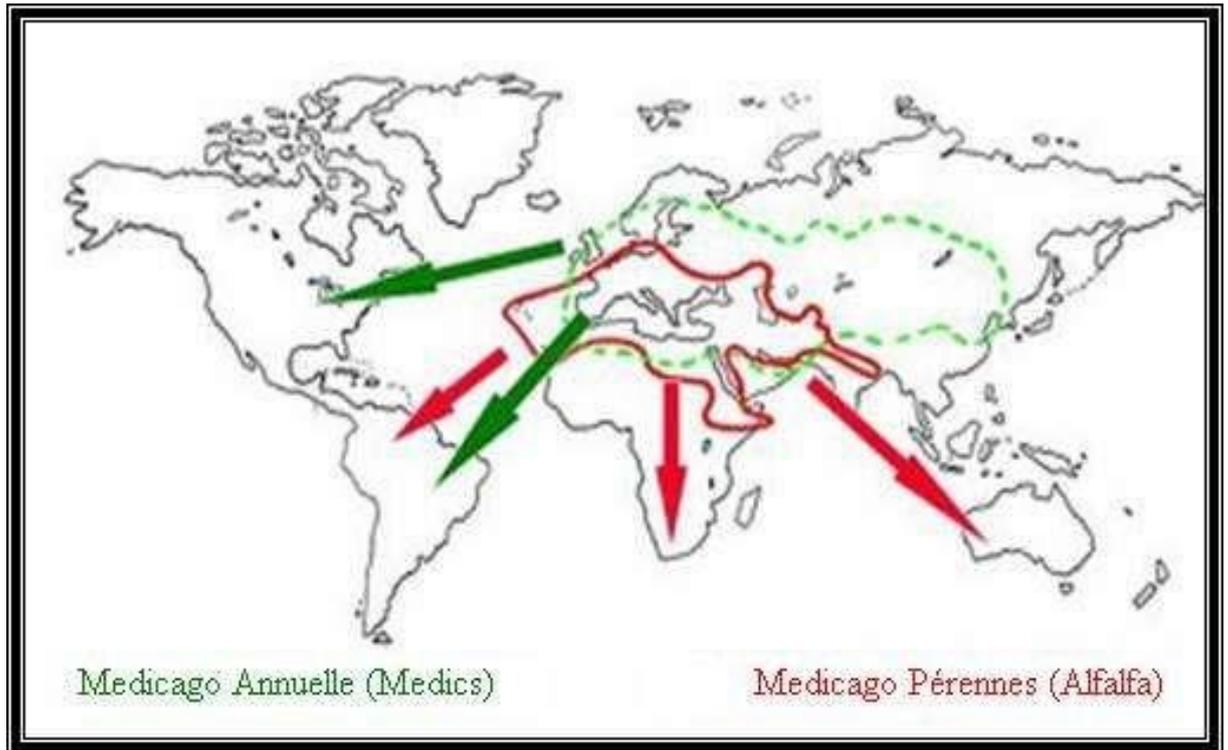


Figure 3. Distribution mondiale du genre *Medicago* (Delalande et al, 2007).

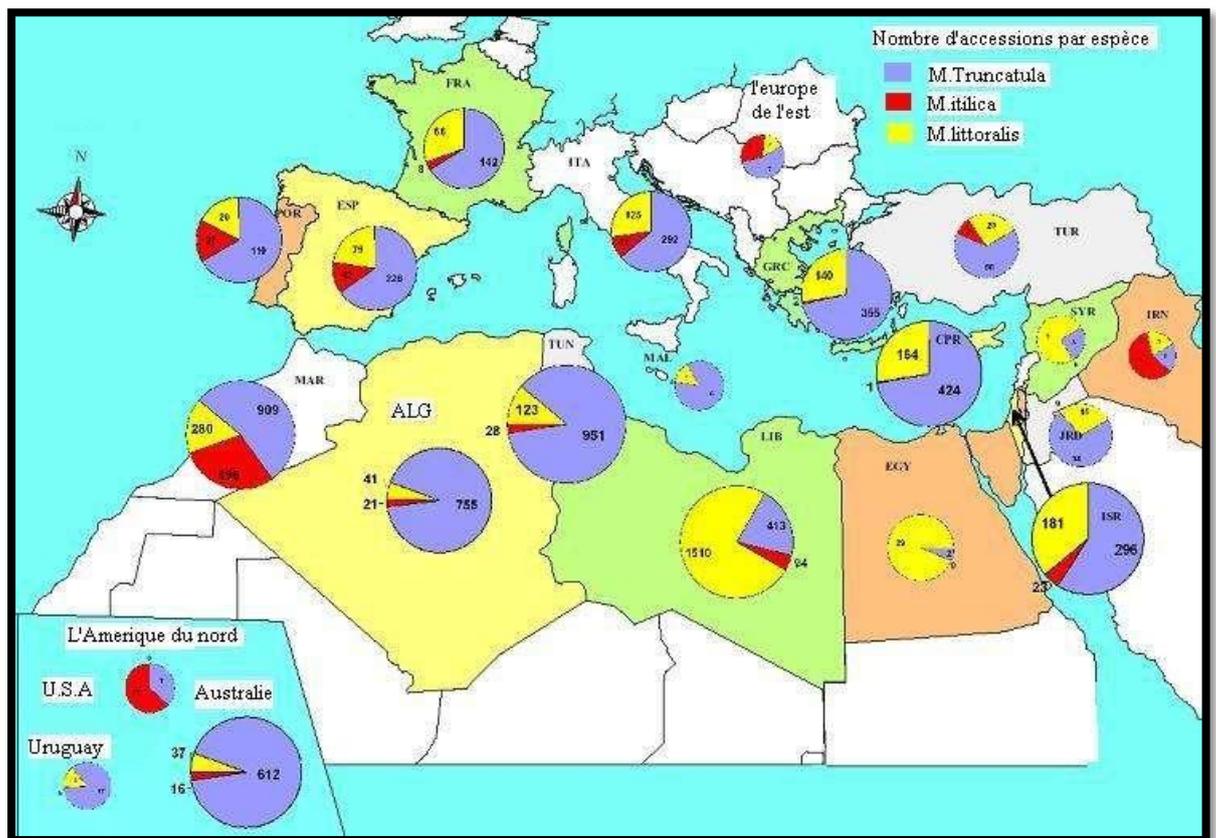
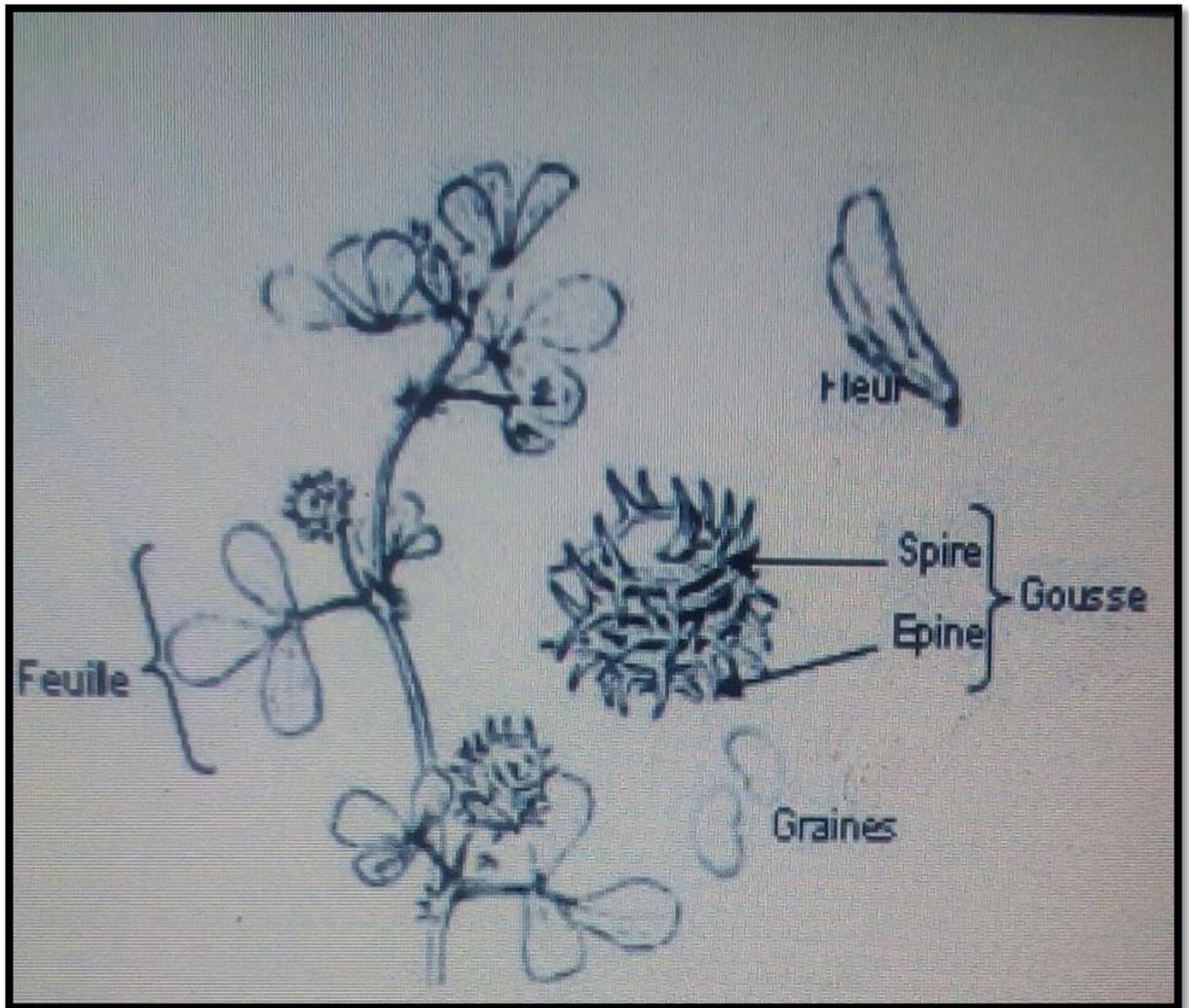
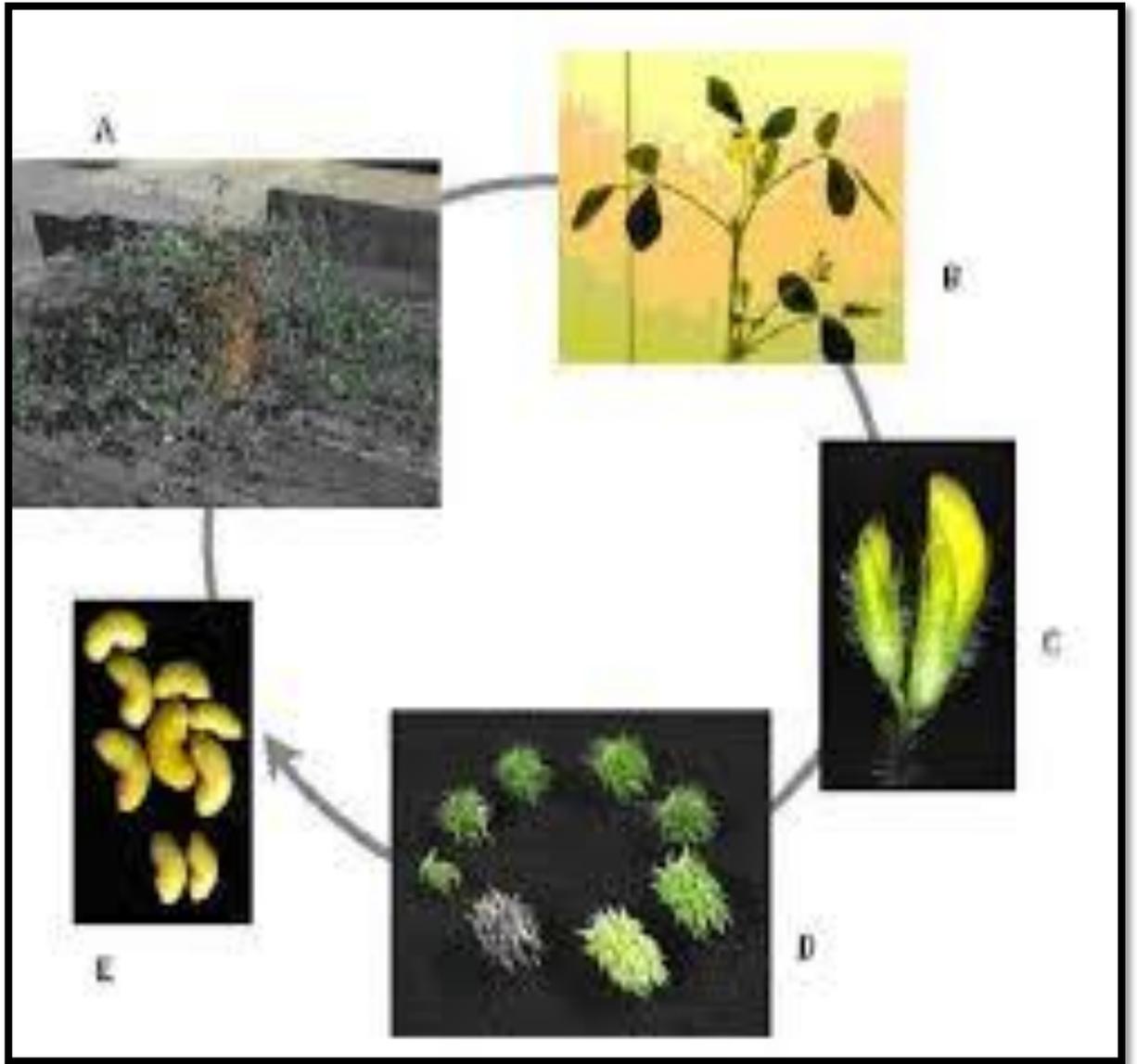


Figure 4. Distribution géographique de quelques espèces de genre *Medicago* (Delalande et al, 2007).



**Figure 5.** Un Rameau de *Medicago truncatula*; fleur, gousse, graines  
(hippolyte, 1906 modifie).



**Figure 6.** Cycle de vie de la plante model *M. truncatula* : A : stade plante, B : stade feuille, C : stade fleur, D : stade gousse, E : stade graine (Bakhti, 2011).

*MATERIEL ET  
METHODES*

Ce chapitre décrit le matériel biologique et l'ensemble des méthodes utilisées dans notre étude.

### 1. Matériel Végétal

Notre étude vise à estimer le niveau de la diversité génétique existant au sein de l'espèce *M. truncatula* appartenant au genre *Medicago* L. Pour cela, nous avons analysé des graines matures de 29 accessions de cette espèce qui ont été collectées dans 29 sites éco-géographiques différents dans le Nord Algérien (figure 7), durant la période de 15 Mai au 15 Juillet 2013 par Mme Medoukali I.

Cette collection couvre un large éventail des stades bioclimatiques allant de l'humide jusqu'à l'aride et subissent des contraintes abiotiques diverses (Tableau 3).



**Figure 7.** Localités géographiques des 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* dans le nord Algérien.

**Tableau 3.** Origines géographiques des 29 accessions étudiées, avec les paramètres éco-géographiques correspondants.

N°	REGION	PROVENANCE	ALT	LAT	LON	Pm	Tm	TM	CLIMAT
Mt1	Mila	Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E	568	2,5	31,3	HH
Mt2	Mila	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	742	4,4	31,1	HH
Mt3	Constantine	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E	704	3,2	31,4	SH
Mt4	Constantine	Chettaba	850	36°18'08,13"N	6°27'50,96"E	558	3	32,2	SH
Mt5	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624	3,3	32	SH
Mt6	Oum Bouaghi	-	883	35°51'27,30"N	7°06'45,04"E	462	0,4	31,3	HH
Mt7	Oum Bouaghi	Ouled Hemla	795	36°04'28,53"N	6°29'06,92"E	454	1,9	31,7	HH
Mt8	Oum Bouaghi	Ain Fakroun	1010	35°56'14,58"N	6°56'45,32"E	492	0,4	30,8	HH
Mt9	Tipaza	-	196	36°35'53,73"N	2°38'20,83"E	626	8,4	30,1	HH
Mt10	Bourdj bouarriridj	-	907	36°04'00,12"N	4°41'18,44"E	368	1,6	33,4	SH
Mt11	Bourdj bouarriridj	mansoura	504	36°11'48,42"N	4°27'00,50"E	409	3,1	32,6	SH
Mt12	Bourdj bouarriridj	air lac ain zada 2000 m	997	36°02'57,40"N	4°51'29,75"E	495	0,2	31,1	SH
Mt13	Bourdj bouarriridj	-	984	36°04'21,92"N	4°38'52,93"E	420	1,2	33,1	SH
Mt14	Bouira	-	537	36°22'09,18"N	3°51'33,64"E	506	0,2	30,9	H
Mt15	Bouira	Akhdaria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E	711	5,9	31,9	H
Mt16	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E	670	7,6	29,8	H
Mt17	Alger	Ben Aknoun	172	36°44'00,09"N	3°01'33,28"E	762	6,9	28,4	HH
Mt18	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	791	7	30,9	HH
Mt19	Ain Defla	1	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E	593	6	33,5	H
Mt20	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	593	6	33,5	H
Mt21	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E	405	6,6	32,6	H
Mt22	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O	368	7,5	29	SS
Mt23	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	736	2,5	30,6	SH
Mt24	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E	609	1,1	30,1	SH
Mt25	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E	564	1,9	32,1	H
Mt26	Sétif	Eulma	1022	36°10'34,10"N	5°45'27,03"E	482	1	31,3	H
Mt27	Sétif	centre-ville	1089	36°11'41,65"N	5°24'25,79"E	473	0,3	31,7	H
Mt28	Batna	-	946	35°37'10,44"N	6°15'23,70"E	335	0,7	32,6	HH
Mt29	Oran	-	87	35°37'40,78"N	0°36'01,72"O	383	8,2	26,6	H

ALT : Altitude, LAT : Latitude, LON : Longitude, Pm : La pluviométrie moyenne ; Tm : La température minimale du mois le plus froid ; TM : La température maximale, HH : Hyper-humide, H : Humide, SH : Subhumide, SS : Semi sec.

## 2. Méthodes d'étude

### 2.1. Analyse protéique

Les protéines sont extraites séquentiellement à partir des graines finement broyées à l'aide d'un mortier. La farine obtenue a été récupérée dans des tubes d'ependorff (l'équivalent de 10 mg de farine par tube).

#### 2.1.1 Extraction séquentielle des Albumines et des globulines

Le fractionnement d'Osborne assemble différentes méthodes d'extraction en un fractionnement séquentiel (Osborne, 1924). Cette procédure a constitué très rapidement la référence des méthodes d'extraction et de purification des protéines des plantes.

Nous avons pratiqué différents protocoles expérimentaux 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

##### a) Délipidation de la farine

10 mg de farine ont été mélangés avec environ 300 µl de *n*-hexane sous agitation pendant 30 min à température ambiante, ce mélange est centrifugé, le *n*-hexane contenu dans le surnageant a été évacué et décanté et le culot est séché.

##### b) Extraction des Albumines

Le résidu délipidé est mélangé avec 250 µl d'une solution d'eau distillée, pH 8, contenant 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub> 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. Cette extraction a été répétée deux fois à partir du culot obtenu après centrifugation. Le surnageant contenant la fraction albumines est récupéré.

##### c) Extraction des globulines

Le résidu d'extraction des albumines a été mélangé avec 250 µl 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 a été agité 30 min à 4°C puis centrifugé à vitesse maximale pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contenant la fraction globulines est récupéré.

#### 2.1.2. Préparation des extraits pour l'électrophorèse

Les fractions extraites ont été précipitées en y ajoutant de l'acétone froide. Après 1 heure

de contacte à  $-20^{\circ}\text{C}$ , les protéines précipitées ont été séparées du surnageant par centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min puis portées à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 15 min. Les culots protéiques ont été mis en suspension dans 100  $\mu\text{l}$  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  $65^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  par puits.

## **2.2. 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).

### **2.2.1. Principe**

L'électrophorèse est une technique connue depuis 1930, permettant la séparation des constituants d'un mélange protéiques ou 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  $\text{pH}_i$  moyen (pH en général 8.2 à 8.6), les protéines sont toutes chargées négativement et se comportent comme des anions par suite de l'ionisation des groupements carboxyliques des AA dicarboxyliques (glutamine et acide aspartique). Sous l'action d'un champ électrique, elles vont migrer vers l'anode (+). La mobilité des protéines est en fonction de :

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

### **2.2.2 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  $T^1 = 12.58\%$  et  $C^2 = 0.97\%$ , et d'un gel de concentration (staging 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 bis-acrylamide 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.

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

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

### **2.2.3. 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.

### **2.2.4. 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.

### **2.2.5. 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.

### 2.3. Analyse enzymatique

Le totale de 29 accessions de *M. truncatula* ont été évaluées par deux systèmes enzymatiques : Estérases (EST, E.C. 3.1.1.-) et Glutamate Oxaloacétate Transaminase (GOT, E.C. 2.6.1.1) (Weeden et Wendel., 1990).

Les graines de chaque accession ont été mises à germer (protocole de germination disponible en annexe 3, les enzymes ont été extraites à partir des feuilles de plantules âgées de 15 jours en utilisant le processus de Bendiab et al., (1993).

Une quantité de 0.25g de feuilles a été broyé au froid, avec 1 ml de tampon TAMET, pH 7, contenant : Tris 0.5M, 0.3M acide ascorbique, 2% Mercapto-éthanol, 0.01M EDTA Na<sub>2</sub>, 0.8% triton x100, 10% PVP. Puis centrifugé pendant 7 min à 9000 rpm. Le surnageant représente la fraction contenant les enzymes.

La séparation des enzymes a été réalisée selon Singh et al., (1991) par la méthode d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE). Des gels contenant 10% de polyacrylamide ont été utilisés pour l'analyse de l'EST, alors que le système GOT nécessitait un gel de Polyacrylamide de 7%. L'analyse a été effectuée à 40 mA pendant 3 heures à 4 °C. Les gels ont été colorés selon les méthodes données par Bendiab et al., (1993) (voir annexe 4).

### 2.4. Analyse des données

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

*RESULTATS ET  
DISCUSSION*

Notre travail consiste à l'étude de la diversité génétique de 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* par les marqueurs protéiques (globulines, albumines) et enzymatiques (Estérases et GOT). Pour cela nous avons utilisé la technique d'électrophorèse décrite Singh et al., (1991), en conditions non dénaturantes (PAGE) pour les enzymes et en conditions dénaturantes non réductrices (SDS-PAGE) pour les protéines.

### **1. Analyse de la diversité génétique des accessions de *M. truncatula***

L'analyse des diagrammes électrophorétiques met en évidence des différences entre les 29 accessions de *M. truncatula*. L'ensemble des mobilités relatives des bandes ont été exploité pour l'établissement des matrices fondées sur un caractère qualitatif (présence (1) et absence (0) de toutes les bandes examinées). Ces matrices représentent les configurations des albumines et des globulines, des enzymes GOT et EST, et permettent de conserver une image réelle des gels. Elles peuvent aussi servir comme base de données pour l'établissement d'un catalogue et ont de ce fait une application directe dans l'identification.

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

### **2. Analyses de la diversité protéique**

#### **2.1. Fractionnement des Albumines et lecture des profils électrophorétiques**

L'étude des profils électrophorétiques a permis de détecter des différences dans les albumines entre les 29 accessions de *M. truncatula*. Les bandes sont très bien séparées avec une bonne résolution et elles révèlent un polymorphisme entre les accessions. La figure 8 représente le profil obtenu quand la migration est arrêtée au moment où le front de bleu de bromophénol atteint la limite du gel. Le diagramme divisé en trois zones A, B et C.

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

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

• **Zone (C)** : c'est la zone rapide, elle est caractérisée par une considérable variabilité des profils avec des poids moléculaires moins de 25KDa.

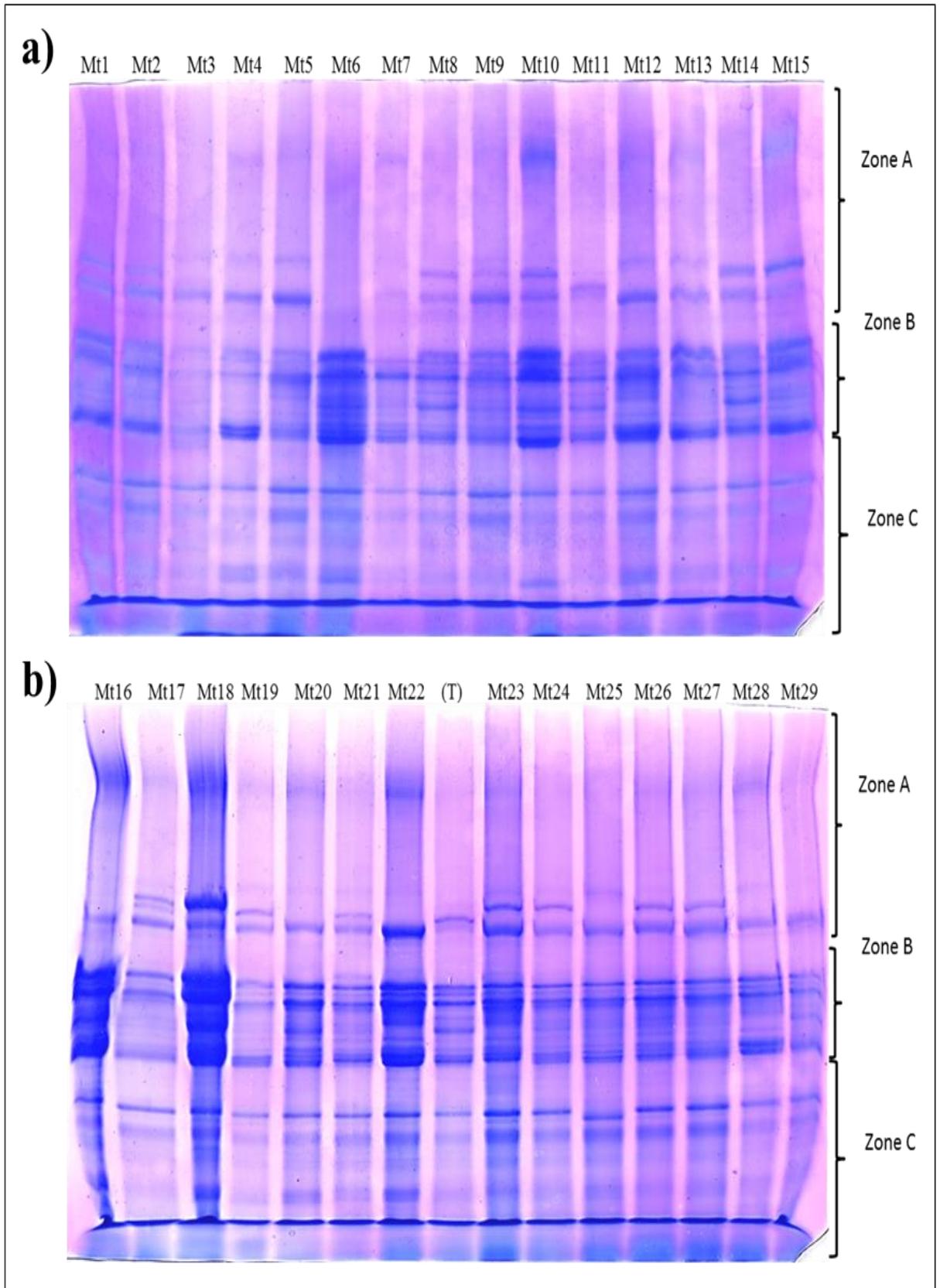
Ces 3 zones sont caractérisées par les gammes de mobilité suivantes :

$$53.7 \text{ mm} < \text{Zone A} < 74.5 \text{ mm}$$

$$74.5 \text{ mm} < \text{Zone B} < 111.9 \text{ mm}$$

$$125 \text{ mm} < \text{Zone C} < 168 \text{ mm}$$

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. A cet effet, nous avons utilisé une accession de référence qui a servi de repère pour tenir compte des variations de mobilité observées entre les gels.



**Figure 8.** Profils électrophorétiques des albumines obtenus par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez 29 accessions de *M. truncatula* : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin.

### 2.1.1. Fréquences des albumines

Dans les diagrammes électrophorétiques des albumines, nous avons détecté 24 bandes protéiques réparties dans tout le gel, et que nous avons numérotées de la bande la plus lente à la bande la plus rapide, avec des mobilités allant de 5.54 à 15.07 cm. Les fréquences des bandes détectées dans les 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* sont représentées dans le tableau 4.

La comparaison entre les accessions montre que les quatre bandes monomorphes (A5, A9, A21, A24) sont présentes dans toutes les accessions avec des fréquences égales à 1, ce qui implique leurs dominances. Neuf bandes (A7, A8, A13, A14, A16, A17, A18, A22 et A23) ont été marquées avec des fréquences moins élevées, qui varient entre 0.62 et 0.97.

Des bandes (A2, A3, A10, A11, A12, A15, A20) avec des fréquences moyennes qui varient entre 0.34 et 0.55 ont été notées. La bande A4 de mobilités 6.54 cm a été présente dans cinq accessions de *M. truncatula* avec une fréquence de 0.17. Alors que, la plus faible fréquence (0.07) a été enregistrée pour deux bandes (A6, A19) qui ont été partagée chacune par deux accessions.

Troisième partie : Résultats et discussion

**Tableau 4.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences des albumines des 29 accessions de *M. truncatula*.

Bandes	Mobilité (cm)	MT 1	MT 2	MT 3	MT 4	MT 5	MT 6	MT 7	MT 8	MT 9	MT 10	MT 11	MT 12	MT 13	MT 14	MT 15	MT 16	MT 17	MT 18	MT 19	MT 20	MT 21	MT 22	MT 23	MT 24	MT 25	MT 26	MT 27	MT 28	MT 29	somme	fréquence	
A1	5,5	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	16	0,55	
A2	5,9	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	13	0,45	
A3	6,3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	10	0,34	
A4	6,5	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0,17	
A5	7,4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1,00	
A6	8,2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,10	
A7	8,4	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	0,62	
A8	8,7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	28	0,97	
A9	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1,00	
A10	9,3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	14	0,48
A11	9,8	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	0,38
A12	9,9	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	10	0,34
A13	10	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	21	0,72
A14	10	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	26	0,90
A15	10	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	10	0,34
A16	11	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	27	0,93
A17	11	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	28	0,97
A18	12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	27	0,93
A19	13	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,07
A20	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	0,48
A21	13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1,00
A22	14	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	0,62
A23	14	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24	0,83
A24	15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1,00

### 2.1.2. Distances génétiques

Les distances génétiques entre les 29 accessions étudiées ont été calculées sur la base des données des albumines et en utilisant l'indice de Jaccard. Les résultats sont représentés sous forme d'une matrice dans le tableau (5).

Les valeurs ressortent que les distances génétiques se situent entre 0.05 et 0.62 avec une valeur moyenne  $d= 0.32$ . Les valeurs faibles signifient que les diagrammes protéiques apparaissent très voisins et que les accessions sont génétiquement proches les unes des autres. La valeur de distance la plus faible ( $d= 0.05$ ) a été noté entre les accessions Mt24 et Mt23, sachant que l'accession Mt24 a été collectée dans une région de Tissemsilt avec une altitude de 575, tandis que Mt23 a été collectée dans une région de Medea avec une altitude de 385 (voir tableau 3). Suivie par la valeur  $d=0.06$ , qui a été observée entre quatre couples d'accessions, parmi eux : Mt21 / Mt17 qui ont été prélevées dans deux zones relativement proches géographiquement (Chlef/ Alger) et écologiquement (Humide / Hyper-humide) avec des valeurs de pluviométrie annuelle de 405 et 762, respectivement. Cependant, et malgré la similarité ( $d= 0.06$ ) entre ce couple d'accession, Mt29/ Mt28 représentent deux régions assez distantes (Oran/ Batna), proches écologiquement (Humide / Hyper-humide), avec des sites de collecte particularisée par différentes valeurs d'altitude (87/ 946).

Inversement, lorsque les valeurs des distances génétiques sont élevées, les accessions sont génétiquement éloignées. Tels que le couple Mt29/ Mt11 (Oran/ Bourdj bouarridj ; mansoura) qui a été caractérisé par la valeur la plus élevée de distance  $d= 0.62$ . Ces deux échantillons ont été collectés dans deux sites assez éloignés avec une grande différence entre leurs valeurs d'altitude (87 et 504, respectivement).

Une valeur moins élevée ( $d= 0.59$ ) a été enregistrée entre les deux couple d'accessions Mt25/ Mt3 (Guelma/ Constantine ; Beni Hemiden) et Mt20/ Mt3 (Ain Defla 2/ Constantine ; Beni Hemiden), qui sont caractérisés par une différence au niveau des distances entre les sites de collecte (une proche et l'autre éloignée), et au niveau de leurs altitudes et leur climat (voir tableau 3).

Des distances intermédiaires ont été obtenue pour d'autres couples d'accessions qui présentent des diagrammes plus ou moins proches, avec autant de ressemblances que de dissemblances (moyenne= 0.32).

Troisième partie : Résultats et discussion

**Tableau 5.** Distances génétiques obtenues entre les 29 accessions de *M. truncatula* en se basant sur les données des albumines.

	MT1	MT2	MT3	MT4	MT5	MT6	MT7	MT8	MT9	MT10	MT11	MT12	MT13	MT14	MT15	MT16	MT17	MT18	MT19	MT20	MT21	MT22	MT23	MT24	MT25	MT26	MT27	MT28	MT29
MT1	0,00	0,25	0,35	0,47	0,35	0,29	0,29	0,33	0,39	0,35	0,44	0,44	0,31	0,38	0,35	0,45	0,48	0,37	0,37	0,45	0,45	0,57	0,55	0,50	0,52	0,43	0,42	0,42	0,47
MT2		0,00	0,35	0,38	0,25	0,19	0,39	0,24	0,29	0,25	0,25	0,31	0,27	0,13	0,28	0,40	0,28	0,37	0,37	0,37	0,42	0,40	0,35	0,37	0,43	0,33	0,42	0,42	0,47
MT3			0,00	0,56	0,53	0,47	0,47	0,42	0,47	0,44	0,53	0,53	0,50	0,47	0,44	0,45	0,55	0,45	0,45	0,59	0,52	0,57	0,48	0,50	0,59	0,50	0,50	0,50	0,47
MT4				0,00	0,27	0,31	0,41	0,53	0,41	0,47	0,38	0,27	0,21	0,29	0,27	0,39	0,42	0,47	0,39	0,39	0,39	0,44	0,42	0,45	0,47	0,45	0,44	0,35	0,41
MT5					0,00	0,19	0,39	0,42	0,19	0,35	0,35	0,13	0,20	0,27	0,25	0,37	0,32	0,28	0,28	0,28	0,28	0,42	0,40	0,35	0,37	0,35	0,33	0,33	0,39
MT6						0,00	0,42	0,37	0,33	0,39	0,29	0,29	0,35	0,31	0,19	0,22	0,35	0,22	0,32	0,32	0,32	0,45	0,43	0,38	0,40	0,38	0,28	0,37	0,42
MT7							0,00	0,37	0,42	0,39	0,47	0,39	0,25	0,41	0,39	0,48	0,43	0,48	0,40	0,40	0,48	0,52	0,50	0,45	0,48	0,38	0,45	0,37	0,42
MT8								0,00	0,28	0,24	0,24	0,42	0,39	0,35	0,33	0,35	0,45	0,35	0,43	0,35	0,43	0,40	0,38	0,33	0,35	0,33	0,40	0,40	0,45
MT9									0,00	0,19	0,29	0,19	0,25	0,41	0,29	0,40	0,43	0,40	0,32	0,40	0,40	0,45	0,43	0,38	0,40	0,38	0,45	0,37	0,42
MT10										0,00	0,25	0,35	0,31	0,38	0,25	0,45	0,48	0,37	0,37	0,45	0,45	0,50	0,48	0,43	0,45	0,43	0,42	0,42	0,47
MT11											0,00	0,35	0,41	0,27	0,13	0,28	0,48	0,37	0,52	0,45	0,45	0,50	0,48	0,43	0,45	0,50	0,42	0,57	0,62
MT12												0,00	0,20	0,38	0,25	0,28	0,32	0,37	0,28	0,28	0,28	0,33	0,32	0,26	0,28	0,35	0,33	0,33	0,39
MT13													0,00	0,33	0,31	0,42	0,37	0,42	0,24	0,33	0,33	0,47	0,45	0,40	0,42	0,32	0,39	0,29	0,35
MT14														0,00	0,27	0,39	0,42	0,29	0,47	0,39	0,39	0,44	0,42	0,45	0,47	0,45	0,35	0,44	0,50
MT15															0,00	0,28	0,48	0,37	0,45	0,45	0,45	0,50	0,48	0,43	0,45	0,50	0,42	0,50	0,55
MT16																0,00	0,25	0,21	0,30	0,30	0,21	0,35	0,25	0,20	0,30	0,29	0,17	0,43	0,48
MT17																	0,00	0,16	0,16	0,16	0,06	0,30	0,20	0,15	0,25	0,15	0,11	0,30	0,35
MT18																		0,00	0,21	0,21	0,11	0,35	0,25	0,20	0,30	0,20	0,06	0,35	0,40
MT19																			0,00	0,21	0,11	0,35	0,25	0,20	0,30	0,11	0,17	0,17	0,22
MT20																				0,00	0,11	0,17	0,16	0,11	0,11	0,11	0,17	0,17	0,22
MT21																					0,00	0,26	0,16	0,11	0,21	0,11	0,06	0,26	0,32
MT22																						0,00	0,11	0,16	0,17	0,25	0,32	0,22	0,28
MT23																							0,00	0,05	0,16	0,15	0,21	0,21	0,26
MT24																								0,00	0,11	0,10	0,16	0,25	0,30
MT25																									0,00	0,20	0,26	0,26	0,32
MT26																										0,00	0,16	0,16	0,21
MT27																											0,00	0,32	0,37
MT28																												0,00	0,06
MT29																													0,00

### **2.1.3. Classification hiérarchique**

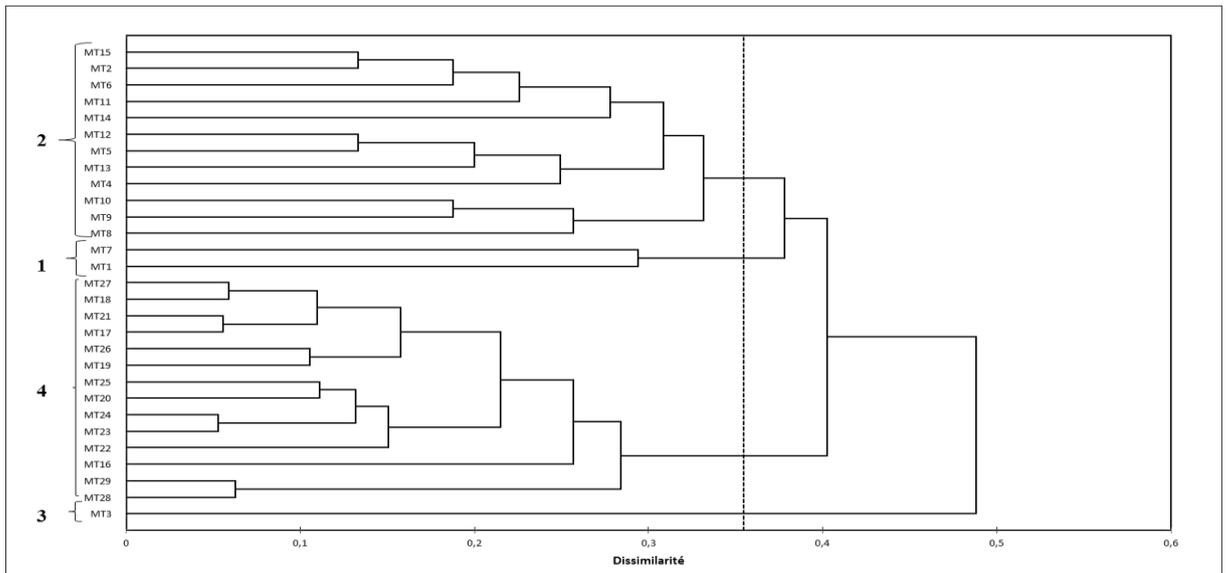
Un dendrogramme UPGMA basé sur la matrice de dissimilarité de Jaccard des albumines a été construit (figure 9). Cette classification hiérarchique a montré la présence de quatre groupes majeurs au niveau  $d= 0.35$ .

Le premier groupe majeur forme un clade entre les deux accessions Mt1 et Mt7 à une valeur de distance  $d= 0.29$ . Ces accessions appartiennent à deux régions proches géographiquement avec un climat hyper-humide ; Oued Athmenia /Mila et OuledHemla /Oum Bouaghi, respectivement.

Le deuxième groupe renferme 12 accessions au niveau de distance  $d= 0.33$ , Ces 12 accessions ont la particularité d'être collectées dans les régions de l'Est du pays avec une gamme des étages bioclimatiques relative (de l'hyper-humide jusqu'au subhumide), sauf Mt9 (Tipaza) et Mt 14 et 15 (Bouira) sont à l'origine du centre de l'Algérie. Ce deuxième groupe est subdivisé lui-même en trois sous-groupes à des niveaux de distance proches, sans corrélation logique avec les origines géographiques des accessions.

L'accession Mt3 qui est collectée dans une région subhumide de Beni Hamiden/Constantine, forme un groupe indépendant des autres avec le degré le plus élevé de distance génétique ( $d= 0.48$ ).

Le groupe quatre est constitué des accessions collectées dans régions allant du centre jusqu'à l'Ouest du Nord Algérien appartenant à différents climats (varient du hyper-humide au semi sec), à l'exception de Guelma (Mt25), Sétif (Mt26, Mt27) et Batna (Mt28) qui représente le coté Est. Il est subdivisé lui-même en plusieurs sous-groupes à la valeur de distance  $d= 0.28$ .



**Figure 9.** Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de *M. truncatula* basée sur le polymorphisme des albumines: 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe.

## 2.2. Fractionnement des Globulines et lecture des profils électrophorétiques

L'analyse intra-spécifique de l'espèce *M. truncatula* sur la base des globulines a permis de générer des profils électrophorétiques clairs avec des bandes bien décelées (Figure 10). Le diagramme se décompose en trois principales zones de mobilité décroissante 1, 2 et 3.

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

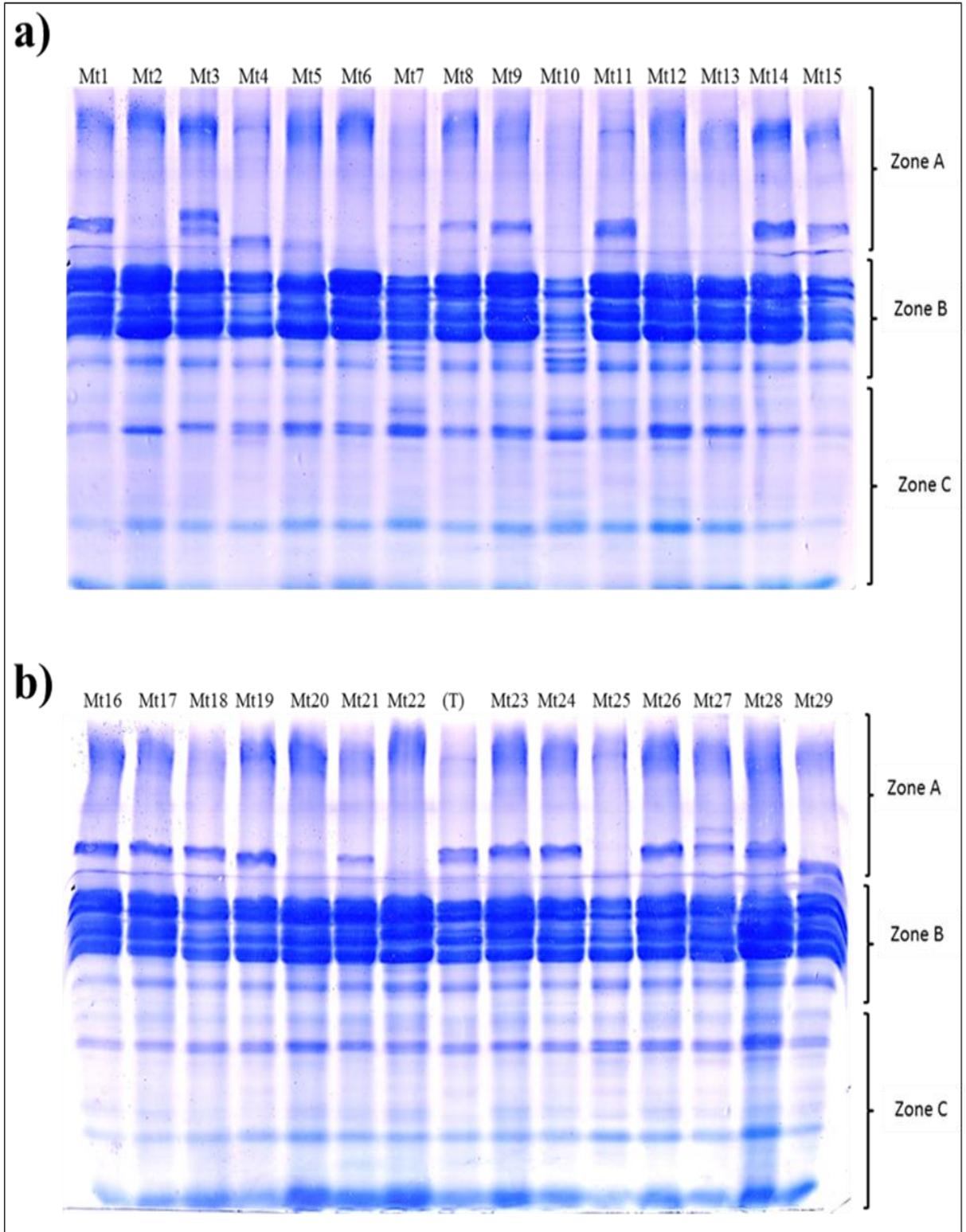
- **Zone (2) :** les globulines sont localisées majoritairement dans cette zone de mobilité avec une considérable variabilité qualitative et quantitative des profils et un poids moléculaire s'étendant approximativement de 25 à 100 kDa.

- **Zone (3) :** C'est la zone la plus rapide, se caractérise par un nombre de bandes moins intenses que les bandes de la deuxième zone. Ces bandes sont bien séparées dont leurs poids moléculaires est moins de 25 kDa. Ces trois zones sont caractérisées par les gammes de mobilité suivantes :

11.6 mm < Zone A < 52.3 mm

55.2 mm < Zone B < 86.8 mm

90 mm < Zone C < 166.7 mm



**Figure 10.** Profils électrophorétiques des globulines obtenus par SDS/PAGE dans les conditions dénaturantes non réductrices chez 29 accessions de *M. truncatula* : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin.

### 2.2.1. Fréquences des globulines

Les diagrammes électrophorétiques des accessions analysées renferment 27 bandes protéiques décelables qui se répartissent dans tout le gel avec des mobilités allant de 1.16 à 16.67 cm. Leurs fréquences sont représentées dans le tableau 6.

D'après le tableau 6, nous avons constaté une grande variabilité de fréquences des globulines dans les accessions de *M. truncatula*. Parmi les 27 bandes détectées, seulement neuf sont monomorphes (G1, G2, G12, G13, G17, G18, G22, G23 et G27) elles sont omniprésentes dans toutes les accessions avec un taux maximum (1.00), ce qui implique leurs dominances. Suivies par les bandes (G14, G16, G26 et G25) qui ont été marquées avec une valeur moins élevées varient entre 0.82 et 0.96.

Des fréquences intermédiaires varie entre 0.51 et 0.72 ont été enregistrées (G6, G10, G11 et G19). Plusieurs bandes (G5, G9, G15, G20, G21 et G24) avec des fréquences faibles (de 0.06 à 0.27) ont été également notées, parmi elles y a des bandes qui sont partagée par deux ou trois accessions (tableau 6).

La fréquence la plus faible 0,03 a été observé pour les bandes (G3, G4 et G8), qui ont été présentes dans une seule accession chacune, elles sont considérées donc spécifiques à leurs accessions : la bande G3 particularise l'accession Mt27 provenant de Sétif/ centre-ville, la bande G4 a été spécifique à l'accession Mt3 appartenant à la région de Constantine / Béni Hemiden, et la bande G8 se trouve dans l'accession Mt4 provenant de Constantine/ Chettaba.

**Tableau 6.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences des globulines des 29 accessions de *M. truncatula*.

Ban des	Mobilité (cm)	M t1	M t2	M t3	M t4	M t5	M t6	M t7	M t8	M t9	Mt 10	Mt 11	Mt 12	Mt 13	Mt 14	Mt 15	Mt 16	Mt 17	Mt 18	Mt 19	Mt 20	Mt 21	Mt 22	Mt 23	Mt 24	Mt 25	Mt 26	Mt 27	Mt 28	Mt 29	Somme	Fréquence	
G1	1,16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G2	1,71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G3	2,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0,03	
G4	3,08	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,03	
G5	4,61	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0,1	
G6	4,79	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	15	0,51	
G7	5,23	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	8	0,27	
G8	5,52	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0,03	
G9	7,26	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,06	
G10	7,44	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	21	0,72	
G11	7,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0,51	
G12	8,13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G13	8,42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G14	8,68	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	24	0,82
G15	9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	6	0,2		
G16	9,22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	28	0,96	
G17	9,47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G18	9,73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G19	10,52	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	15	0,51
G20	10,89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0,06
G21	11,18	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0,1	
G22	11,78	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G23	13,86	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	
G24	14,08	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0,06	
G25	14,76	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	24	0,82	
G26	16,43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	27	0,93	
G27	16,67	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	1	

### 2.2.2. Distances génétiques

Les dissimilarités entre les 29 accessions de *M. truncatula* ont été calculées sur la base des données des globulines en utilisant la distance de Jaccard comme coefficient (Tableau 7). Les distances entre les différentes accessions ont été plus ou moins importantes vue les valeurs enregistrées qui variaient entre 0.00 et 0.50 avec une moyenne de 0.23.

Une similarité totale des profils des globulines a été observée entre quatre paires d'accessions : Mt24 (Tissemsilt) et Mt18 (Blida), Mt26 (Sétif/Eulma) et Mt18 (Blida), Mt29 (Oran) et Mt20 (Ain Defla 2), Mt26 (Sétif) et Mt24 (Tissemsilt), présentant la valeur de distance 0.00. Elles ont été prélevées dans des zones relativement éloignée géographiquement (Blida/Ain Defla /Tissemsilt / Sétif /Oran) et écologiquement (varient du hyper-humide au subhumide) avec des valeurs d'altitude (70, 257, 575, 1022, 87), respectivement.

Les accessions les plus proches avec une distance moins élevée 0.06, ont été représentées par 12 paires d'accessions (tableau 7). Ces accessions sont à l'origine du centre jusqu'à l'Ouest du Nord Algérien, et qui sont caractérisés par une différence au niveau des distances entre les sites de collecte (unes proches et d'autres éloignées) représentant des paramètres écologiques et des valeurs d'altitude différentes. À l'exclusion de Sétif qui est à l'origine de l'Est et qui représente un climat humide avec une altitude la plus haute (1022).

La distance génétique la plus élevée (0.50) a été obtenue pour les trois couples d'accessions (Mt10/ Mt21), (Mt10/ Mt22), (Mt10/ Mt23), qui sont prélevées dans des sites géographiquement plus au moins éloignés et représente des climats varie entre (subhumide jusqu'à humide). Sachant que l'accession Mt10 a été collectée dans une région de Bourdjbouarridj avec une altitude 907 (voir Tableau 3), et les accessions (MT21, MT22, MT23) sont collectées dans des régions de l'Ouest (Chlef, Mascara, Medea) avec des valeurs d'altitude (135, 281, 38), respectivement.

Comme nous observons aussi des valeurs intermédiaires pour les autres accessions (tableau 7).

Troisième partie : Résultats et discussion

**Tableau 7.** Distances génétiques obtenues entre les 29 accessions de *M. truncatula* en se basant sur les données des Globulines.

	Mt1	Mt2	Mt3	Mt4	Mt5	Mt6	Mt7	Mt8	Mt9	Mt10	Mt11	Mt12	Mt13	Mt14	Mt15	Mt16	Mt17	Mt18	Mt19	Mt20	Mt21	Mt22	Mt23	Mt24	Mt25	Mt26	Mt27	Mt28	Mt29
Mt1	0,00	0,23	0,17	0,28	0,28	0,18	0,16	0,13	0,17	0,37	0,16	0,26	0,18	0,17	0,18	0,18	0,26	0,22	0,18	0,28	0,28	0,37	0,37	0,22	0,24	0,22	0,32	0,25	0,28
Mt2		0,00	0,28	0,29	0,29	0,07	0,35	0,13	0,18	0,29	0,26	0,18	0,19	0,18	0,07	0,19	0,28	0,24	0,19	0,19	0,29	0,29	0,39	0,24	0,13	0,24	0,33	0,35	0,19
Mt3			0,00	0,32	0,32	0,22	0,29	0,28	0,30	0,40	0,20	0,30	0,22	0,21	0,32	0,32	0,38	0,35	0,22	0,32	0,32	0,40	0,48	0,35	0,28	0,35	0,43	0,36	0,32
Mt4				0,00	0,13	0,24	0,38	0,29	0,32	0,33	0,38	0,32	0,24	0,40	0,33	0,33	0,40	0,37	0,33	0,33	0,42	0,42	0,42	0,37	0,29	0,37	0,37	0,45	0,33
Mt5					0,00	0,24	0,38	0,29	0,32	0,33	0,38	0,22	0,24	0,40	0,33	0,33	0,32	0,37	0,33	0,33	0,42	0,33	0,33	0,37	0,29	0,37	0,37	0,38	0,33
Mt6						0,00	0,30	0,19	0,12	0,33	0,21	0,12	0,13	0,22	0,13	0,13	0,22	0,18	0,13	0,13	0,24	0,24	0,33	0,18	0,07	0,18	0,28	0,30	0,13
Mt7							0,00	0,26	0,20	0,30	0,19	0,29	0,21	0,29	0,30	0,30	0,29	0,25	0,30	0,30	0,30	0,38	0,38	0,25	0,35	0,25	0,41	0,19	0,30
Mt8								0,00	0,18	0,29	0,26	0,28	0,19	0,18	0,07	0,19	0,28	0,24	0,29	0,29	0,39	0,39	0,39	0,24	0,25	0,24	0,33	0,35	0,29
Mt9									0,00	0,40	0,11	0,11	0,12	0,21	0,12	0,12	0,11	0,06	0,22	0,12	0,22	0,22	0,22	0,06	0,18	0,06	0,26	0,20	0,12
Mt10										0,00	0,45	0,40	0,33	0,40	0,33	0,42	0,48	0,45	0,42	0,42	0,50	0,50	0,50	0,45	0,39	0,45	0,37	0,45	0,42
Mt11											0,00	0,20	0,21	0,11	0,21	0,21	0,20	0,16	0,21	0,21	0,21	0,30	0,30	0,16	0,26	0,16	0,33	0,19	0,21
Mt12												0,00	0,12	0,30	0,22	0,22	0,11	0,17	0,22	0,12	0,22	0,12	0,22	0,17	0,18	0,17	0,35	0,20	0,12
Mt13													0,00	0,32	0,24	0,24	0,22	0,18	0,24	0,13	0,24	0,24	0,33	0,18	0,19	0,18	0,37	0,30	0,13
Mt14														0,00	0,12	0,22	0,30	0,26	0,22	0,32	0,32	0,40	0,40	0,26	0,28	0,26	0,35	0,29	0,32
Mt15															0,00	0,13	0,22	0,18	0,24	0,24	0,33	0,33	0,33	0,18	0,19	0,18	0,28	0,30	0,24
Mt16																0,00	0,12	0,06	0,13	0,13	0,24	0,24	0,24	0,06	0,07	0,06	0,18	0,21	0,13
Mt17																	0,00	0,06	0,22	0,12	0,22	0,12	0,12	0,06	0,18	0,06	0,26	0,11	0,12
Mt18																		0,00	0,18	0,06	0,18	0,18	0,18	0,00	0,13	0,00	0,22	0,16	0,06
Mt19																			0,00	0,13	0,13	0,24	0,33	0,18	0,07	0,18	0,28	0,21	0,13
Mt20																				0,00	0,13	0,13	0,24	0,06	0,07	0,06	0,28	0,21	0,00
Mt21																					0,00	0,24	0,24	0,18	0,19	0,18	0,37	0,21	0,13
Mt22																						0,00	0,24	0,18	0,19	0,18	0,37	0,21	0,13
Mt23																							0,00	0,18	0,29	0,18	0,28	0,21	0,24
Mt24																								0,00	0,13	0,00	0,22	0,16	0,06
Mt25																									0,00	0,13	0,24	0,26	0,07
Mt26																										0,00	0,22	0,16	0,06
Mt27																											0,00	0,33	0,28
Mt28																												0,00	0,21
Mt29																													0,00

### **2.2.3. Classification hiérarchique**

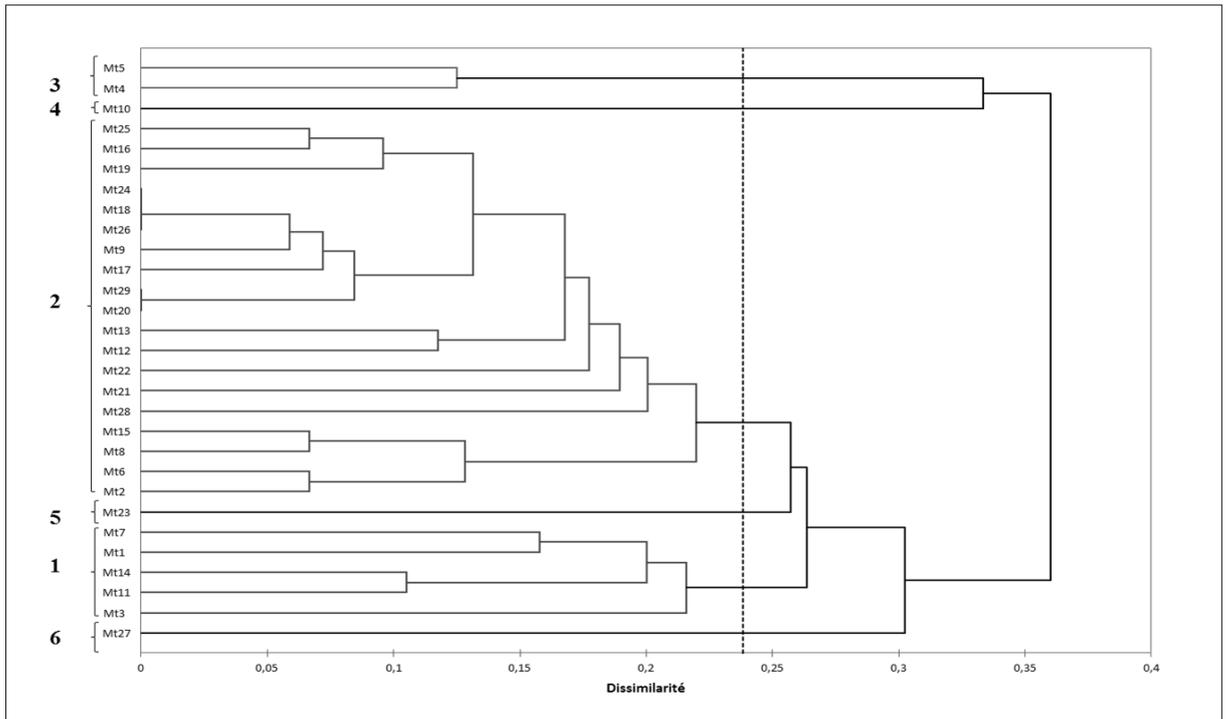
Les distances de Jaccard basées sur le polymorphisme des globulines nous ont aidés à élaborer un dendrogramme en UPGMA (figure 9).

Le dendrogramme a défini six clusters majeurs à une distance  $d= 0.24$ . Le premier cluster ( $d= 0.21$ ) regroupe cinq accessions (Mt1, Mt3, Mt7, Mt11 et Mt14) appartenant à des régions relativement éloignées de l'Est algérien (Mila, Constantine / Beni Hemiden, Oum Bouaghi, Bourdj bouarriridj et Bouira, respectivement), avec des étages bioclimatiques variant de l'hyper-humide au subhumide.

Le deuxième groupe renferme 19 accessions au niveau de distance  $d= 0.22$ . Ces 19 accessions représentent tout le nord Algérien (de l'Est jusqu'à l'Ouest) avec une large gamme des étages bioclimatiques qui varie de l'hyper-humide jusqu'au semi-sec (figure 9). Ce deuxième groupe est subdivisé lui-même en deux sous-groupes à des niveaux des distances éloignées, sans corrélation logique avec les origines géographiques des accessions.

Le troisième cluster forme un clade entre Mt3 et Mt4 à un degré de distance équivalent à 0.12. Ces deux plantes provenaient de la même région (Constantine), mais des sites de prélèvement différents (Beni Hemiden et Chettaba, respectivement), représentés par le même climat (subhumide) mais une large différence d'altitude (429 et 850, respectivement).

Le quatrième, le cinquième et le sixième cluster comprennent chacun une seule accession : Mt10 (Bourdj bouarriridj), Mt23 (Medea) et Mt27 (Sétif/centre-ville) à des degrés de distances  $d= 0.33$ ,  $d= 0.25$  et  $d= 0.30$ , respectivement.



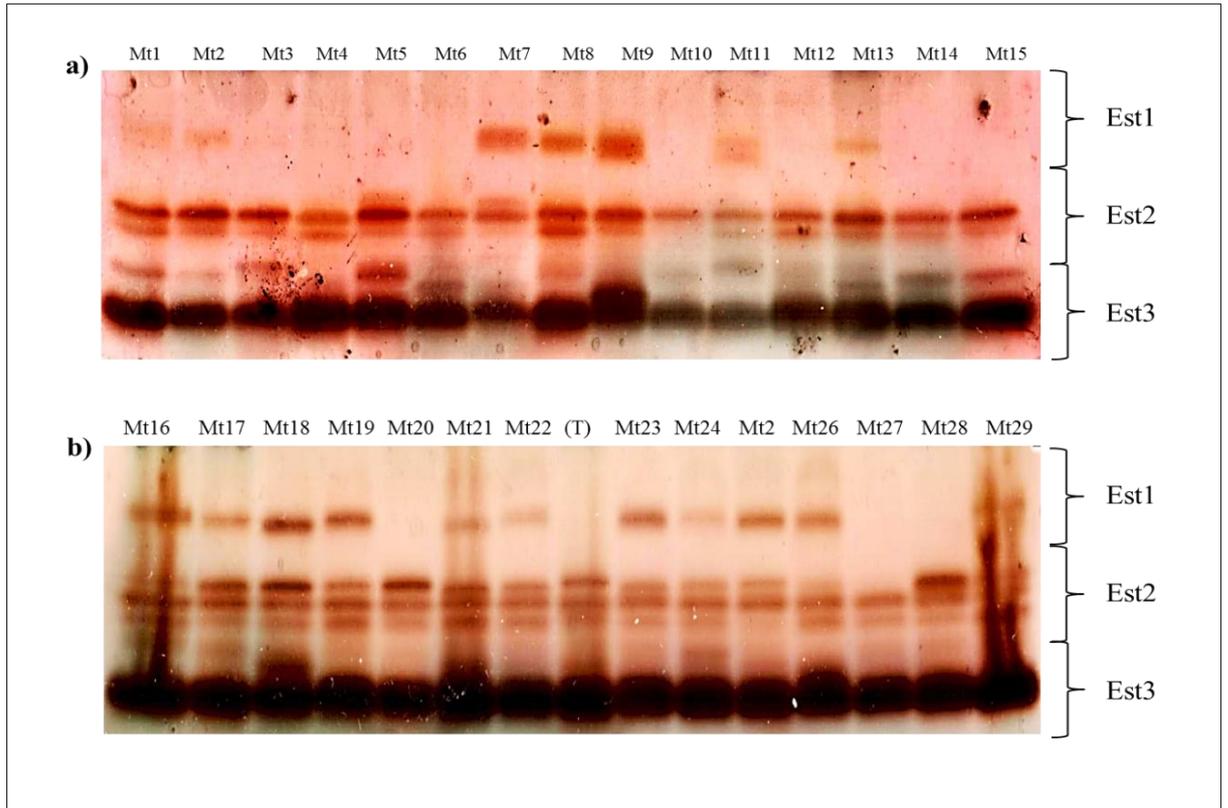
**Figure 11.** Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de *M. truncatula* basée sur le polymorphisme des globulines : 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe, 4) le quatrième groupe, 5) le cinquième groupe, 6) le sixième groupe.

### 3. Analyse enzymatique

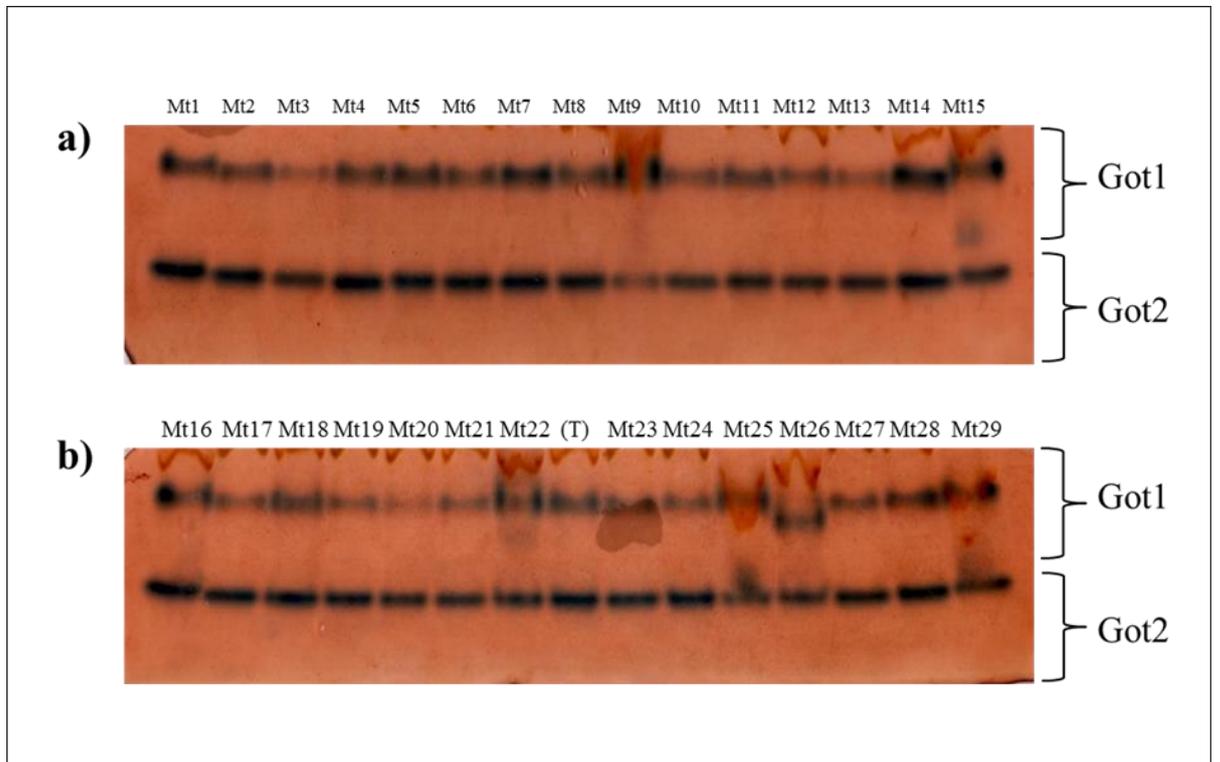
C'est la technique de Bendiab et al, (1993) (Annexe 4) qui a été utilisée pour estimer la diversité des systèmes enzymatiques. Les figures (12 et 13) représentent les zymogrammes des systèmes enzymatiques EST et GOT pour les 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* collectés dans le Nord Algérien.

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

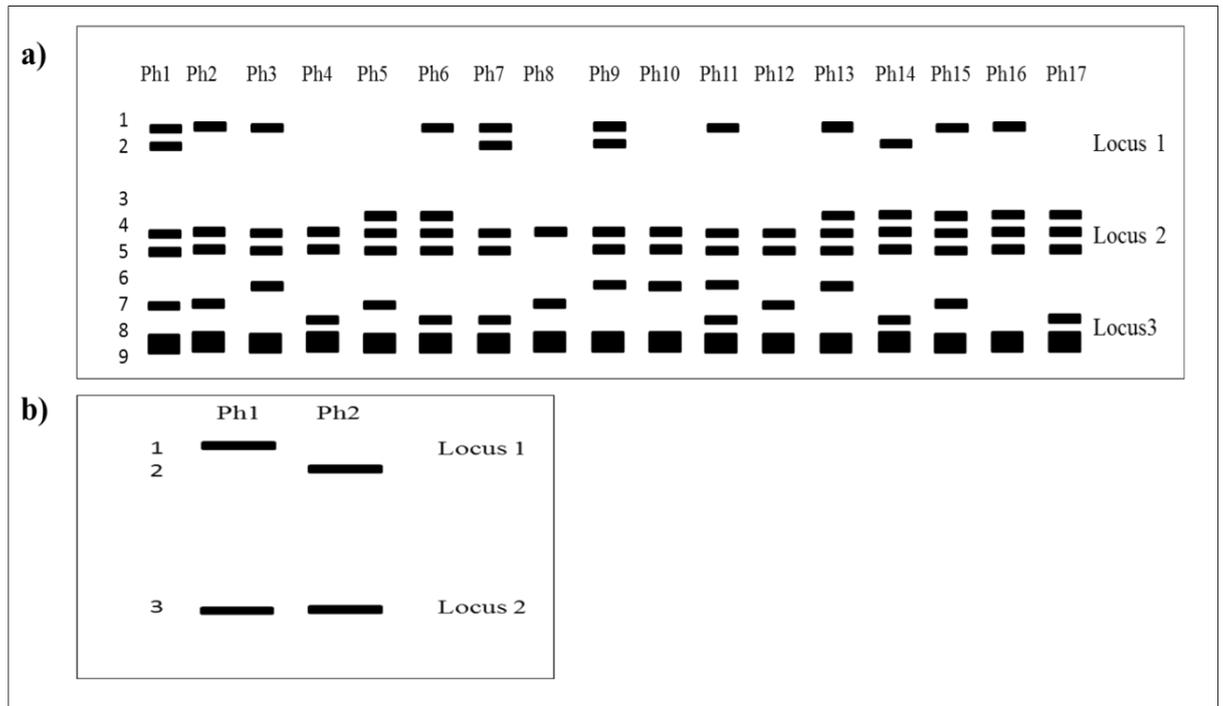
L'étude des profils enzymatiques des deux systèmes enzymatiques a permis de dénombrer neuf allozymes pour les estérases (figure 12), répartis en trois loci (Est1, Est2 et Est3) produisant 17 phénotypes différents (figure 14a). Tandis que, trois allozymes ont été observés pour la GOT, localisés dans deux zones d'activité bien distinctes (Got1 et Got2) (figure 13) engendrant deux phénotypes seulement (figure 14b).



**Figure 12.** Zymogrammes du système enzymatique EST pour les 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin.



**Figure 13.** Zymogramme de système enzymatique GOT pour 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* : a) de Mt1 à Mt15, b) de Mt16 à Mt29, (T)= Témoin.



**Figure 14.** Les phénotypes des deux systèmes enzymatiques : a) pour l'Est, b) pour le GOT.

### 3.1. Fréquences alléliques des enzymes

Au total, nous avons compté 12 bandes alléliques avec des mobilités différentes pour les deux systèmes enzymatiques (EST et GOT) analysés, réparties à travers trois loci pour l'Est et deux loci pour le Got. Nous avons enregistré donc, 2, 3 et 4 allèles pour Est1, Est2 et Est3, respectivement ; et 2 et 1 allèle pour Got1 et Got2, respectivement. Les fréquences des allèles détectées dans les 29 accessions de l'espèce *M. truncatula* sont représentées dans le tableau 8.

Le Got1, Got2 et Got3 étaient les plus fréquentes dans leurs zones de fréquences 0.96 ; 0.03 ; 1 respectivement le Got3 est présent dans tous les accessions (monomorphes) par contre le Got2 est présent dans une seule accession qu'est Mt26 (Sétif) plus de Got1 présent dans tous les accessions sauf Mt26.

Tous les autres phénotypes étaient spécifiques pour l'Est4 et Est9 sont présent dans les 29 accessions avec une fréquence très élevée égale à 1 qui montre que les deux isoenzymes sont très similaires dans tous les accessions, l'Est1, Est3, Est5 et Est7 étaient les plus fréquents à 0.60 ; 0.60 ; 0.96 ; 0.50 respectivement.

Le reste, les phénotypes Est2, Est6, Est8 étaient considérés comme rares ou spécifiques à une accession avec des fréquences relativement basses. Est2 se trouve dans 4 accessions Mt1 (Mila), Mt 9 (Tipaza), Mt17(Alger) et Mt20 (Ain Defla) qui sont partagées dans des régions géographiques éloignées.

Troisième partie : Résultats et discussion

**Tableau 8.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences des allozymes des 29 accessions de *M. truncatula*.

Loci	Allèles	Mt	Sommes	Fréquences																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27			28	29
Est1	E1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	16	<b>0,6</b>
	E2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	4	<b>0,1</b>
Est2	E3	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	16	<b>0,6</b>	
	E4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	<b>1</b>
	E5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	28	<b>0,96</b>
Est3	E6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	<b>0,2</b>	
	E7	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	14	<b>0,5</b>
	E8	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	9	<b>0,3</b>	
	E9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	<b>1</b>
Got1	Gt1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	28	<b>0,96</b>
	Gt2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	<b>0,03</b>
Got2	Gt3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	29	<b>1</b>

### 3.2. Distances génétiques

Le calcul des distances génétiques entre les accessions de *M. truncatula* sur la base des deux systèmes enzymatiques (EST et GOT), indique que les valeurs varient entre 0.00 et 0.70 avec une moyenne de 0.29 (Tableau 9).

La distance la plus élevée (0.70) a été obtenue seulement entre Mt26 et Mt10. Ces deux échantillons ont été ramassés dans des sites proches géographiquement (Sétif/Bourdjouarridj) et écologiquement (humide / semi humide) avec des valeurs d'altitude de 907 et 1022, respectivement. Suivie par d'autres valeurs légèrement moins élevées et intermédiaires.

La valeur la plus faible (DG= 0.00) est notée entre 17 paires d'accessions qui sont très proches génétiquement, ce qui implique une forte similarité. Dont certaines sont prélevées dans des sites géographiquement proches, exemple : Mt8 (Oum Bouaghi / Ain Fakroun) et Mt2 (Mila), qui possède le même climat (hyper humide) avec des valeurs d'altitude de 1010 et 831, respectivement. D'autres sont géographiquement éloignées comme Mt25 (Guelma) et Mt21 (Chlef). Ces deux accessions représentent des valeurs d'altitude différentes (798, 135), mais un climat humide.

Troisième partie : Résultats et discussion

**Tableau 9.** Distances génétiques basées sur la diversité enzymatique obtenues entre les 29 accessions de *M. truncatula*.

	Mt1	Mt2	Mt3	Mt4	Mt5	Mt6	Mt7	Mt8	Mt9	Mt10	Mt11	Mt12	Mt13	Mt14	Mt15	Mt16	Mt17	Mt18	Mt19	Mt20	Mt21	Mt22	Mt23	Mt24	Mt25	Mt26	Mt27	Mt28	Mt29
Mt1	0,00	0,13	0,33	0,44	0,33	0,44	0,40	0,13	0,22	0,38	0,40	0,44	0,40	0,25	0,25	0,40	0,40	0,22	0,33	0,40	0,33	0,50	0,22	0,22	0,33	0,55	0,25	0,33	0,22
Mt2		0,00	0,25	0,38	0,25	0,38	0,33	0,00	0,33	0,29	0,33	0,38	0,33	0,14	0,14	0,33	0,50	0,13	0,25	0,50	0,25	0,44	0,13	0,13	0,25	0,50	0,14	0,25	0,13
Mt3			0,00	0,38	0,44	0,38	0,33	0,25	0,33	0,50	0,13	0,14	0,13	0,38	0,38	0,13	0,50	0,33	0,44	0,50	0,25	0,44	0,33	0,33	0,25	0,50	0,38	0,44	0,33
Mt4				0,00	0,38	0,00	0,25	0,38	0,25	0,43	0,44	0,29	0,25	0,29	0,29	0,44	0,25	0,44	0,38	0,25	0,38	0,14	0,44	0,44	0,38	0,44	0,29	0,38	0,44
Mt5					0,00	0,38	0,33	0,25	0,50	0,29	0,33	0,38	0,50	0,14	0,14	0,33	0,33	0,13	0,00	0,33	0,25	0,25	0,13	0,13	0,25	0,50	0,14	0,00	0,13
Mt6						0,00	0,25	0,38	0,25	0,43	0,44	0,29	0,25	0,29	0,29	0,44	0,25	0,44	0,38	0,25	0,38	0,14	0,44	0,44	0,38	0,44	0,29	0,38	0,44
Mt7							0,00	0,33	0,22	0,56	0,22	0,44	0,22	0,44	0,44	0,22	0,22	0,22	0,33	0,22	0,13	0,13	0,22	0,22	0,13	0,22	0,44	0,33	0,22
Mt8								0,00	0,33	0,29	0,33	0,38	0,33	0,14	0,14	0,33	0,50	0,13	0,25	0,50	0,25	0,44	0,13	0,13	0,25	0,50	0,14	0,25	0,13
Mt9									0,00	0,56	0,40	0,44	0,22	0,44	0,44	0,40	0,22	0,40	0,50	0,22	0,33	0,33	0,40	0,40	0,33	0,40	0,44	0,50	0,40
Mt10										0,00	0,56	0,43	0,56	0,17	0,17	0,56	0,56	0,38	0,29	0,56	0,50	0,50	0,38	0,38	0,50	0,70	0,17	0,29	0,38
Mt11											0,00	0,25	0,22	0,44	0,44	0,00	0,40	0,22	0,33	0,40	0,13	0,33	0,22	0,22	0,13	0,40	0,44	0,33	0,22
Mt12												0,00	0,25	0,29	0,29	0,25	0,44	0,44	0,38	0,44	0,38	0,38	0,44	0,44	0,38	0,60	0,29	0,38	0,44
Mt13													0,00	0,44	0,44	0,22	0,40	0,40	0,50	0,40	0,33	0,33	0,40	0,40	0,33	0,40	0,44	0,50	0,40
Mt14														0,00	0,00	0,44	0,44	0,25	0,14	0,44	0,38	0,38	0,25	0,25	0,38	0,60	0,00	0,14	0,25
Mt15															0,00	0,44	0,44	0,25	0,14	0,44	0,38	0,38	0,25	0,25	0,38	0,60	0,00	0,14	0,25
Mt16																0,00	0,40	0,22	0,33	0,40	0,13	0,33	0,22	0,22	0,13	0,40	0,44	0,33	0,22
Mt17																	0,00	0,40	0,33	0,00	0,33	0,13	0,40	0,40	0,33	0,40	0,44	0,33	0,40
Mt18																		0,00	0,13	0,40	0,13	0,33	0,00	0,00	0,13	0,40	0,25	0,13	0,00
Mt19																			0,00	0,33	0,25	0,25	0,13	0,13	0,25	0,50	0,14	0,00	0,13
Mt20																				0,00	0,33	0,13	0,40	0,40	0,33	0,40	0,44	0,33	0,40
Mt21																					0,00	0,25	0,13	0,13	0,00	0,33	0,38	0,25	0,13
Mt22																						0,00	0,33	0,33	0,25	0,33	0,38	0,25	0,33
Mt23																							0,00	0,00	0,13	0,40	0,25	0,13	0,00
Mt24																								0,00	0,13	0,40	0,25	0,13	0,00
Mt25																									0,00	0,33	0,38	0,25	0,13
Mt26																										0,00	0,60	0,50	0,40
Mt27																											0,00	0,14	0,25
Mt28																												0,00	0,13
Mt29																													0,00

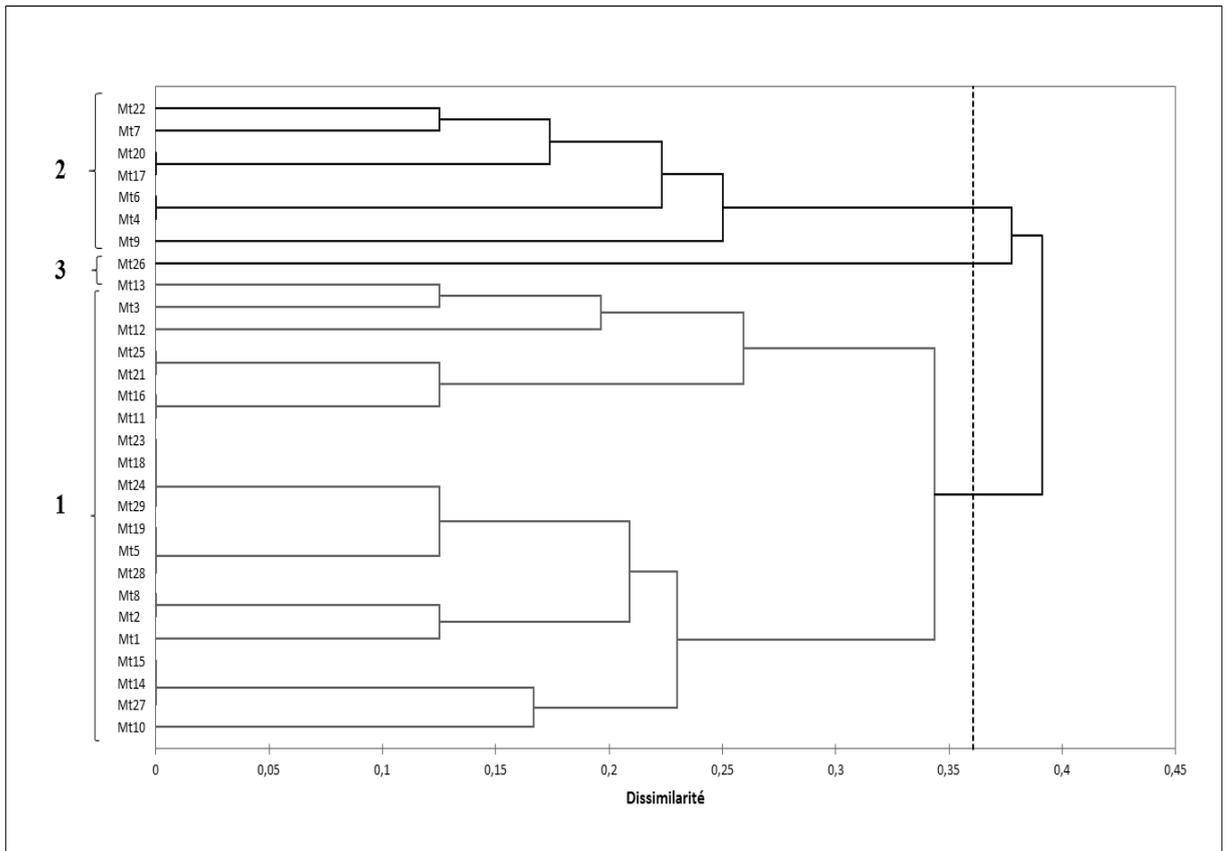
### 3.3. Classification hiérarchique

Analyse de cluster basée sur les marqueurs d'isoenzymes, les similitudes entre les accessions ont été évaluées par Coefficient de Jaccard et les valeurs de distance étaient représentées dans un dendrogramme UPGMA (Figure 14). Selon la variabilité des isoenzymes, les accessions de *M. truncatula* ont été classées en trois groupes à  $d= 0.36$ .

Le premier groupe ( $d= 0.34$ ) est le plus large et incarné par 21 accessions qui ont été subdivisés en deux sous-groupes principales. le premier sous-groupe à une distance  $d= 0.23$  il contient 14 accessions : Ces accessions sont à l'origine du l'Est jusqu'à l'Ouest du Nord Algérien, et qui sont caractérisés par une différence au niveau des distances entre les sites de collecte (unes proches et d'autres éloignées) représentant des gammes bioclimatiques varie de l'hyper-humide à subhumide et des valeurs d'altitude différentes. Le sous-groupe deux est composé de sept accessions à une distance 0.26, ces echantillons provenaient de régions différentes : Mt11 (Bourdj bouarriridj), Mt16 (Alger), Mt21 (Chlef), Mt13 (Bourdj bouarriridj), Mt13(Bourdj bouarriridj), sont à l'origine du centre jusqu'à l'Ouest a l'exception de Mt3(Constantine) et Mt25 (Guelma) qui provenaient de l'Est.

Le deuxième groupe est composé de sept accessions au niveau de distance 0.25, qui ont été divisé en deux sous-groupes : le premier contient Mt4 (Constantine/Chettaba) et Mt9 (Tipaza) qui ont été prélevées de region éloignée avec une variation climatique (varie de hyperhumide à subhumide). Mt6, Mt7, Mt17, Mt20 et Mt22 qui ont été prélevé dans des regions avec des étages bioclimatique varie de semi-sec à hyperhumide.

Le troisieme groupe contient une seule accession MT26 (Sétif) à une distance de 0.37.



**Figure 15.** Classification hiérarchique en UPGMA des 29 accessions de *M. truncatula* basée sur le polymorphisme des enzymes (Got-Est): 1) le premier groupe, 2) le deuxième groupe, 3) le troisième groupe.

#### 4. Corrélation entre les marqueurs analysés

Des tests de Mantel (Test de corrélation) ont été réalisés dans l'objectif d'estimer le degré d'association entre les distances génétiques dérivées par les marqueurs protéiques et enzymatiques utilisés. La signification du degré de corrélation est estimée par la valeur  $p$  calculée après 1000 permutations aléatoires en utilisant le programme Xlstat. Nous avons réalisé ce test entre les matrices de distances générées par les albumines et les globulines, la valeur de  $p$  calculée ( $P < 0.0001$ ) a été inférieure au niveau de signification seuil  $\alpha = 0.05$ , on a retenu l'hypothèse qui affirme une forte corrélation entre ces deux fractions protéiques avec un coefficient de corrélation  $r = 0.43$ , suggérant que ces deux fractions protéiques donnent des estimations proches des relations génétiques entre les accessions étudiées.

Pareillement, des corrélations à moindre degré ont été obtenues par le même test entre le polymorphisme des albumines et des enzymes ( $r = 0.17$ ,  $P < 0.0001$ ) et le polymorphisme des globulines et des enzymes ( $r = 0.19$ ,  $P = 0.0003$ ). Un test de corrélation a été réalisé également entre les trois marqueurs étudiés (albumines, globulines et enzymes), Le coefficient normalisé

de Mantel et la probabilité obtenue sont  $r = 0.13$  et  $p = 0.0093$ , Ce dernier test a donc fondé sur l'hypothèse qui confirme la relation de ces trois polymorphismes chez *M. truncatula*.

## 5. Discussion

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

Osborne (1924) a été le premier à élaborer un système de classification des protéines végétales qui a été largement adopté. Sur la base de leur potentiel de solubilité, il a reconnu quatre classes principales parmi elles : les Globulines (peu solubles dans l'eau, mais solubles dans les solutions de sels neutres), qui constitue la partie majeure des protéines de stockage (Yemm, 1958) ; et les albumines (solubles dans l'eau et les solutions salines diluées) qui renferment la majorité des enzymes (Boulter et al., 1967). Cependant, il est bien connu qu'une distinction nette entre ces groupes de protéines n'est pas toujours possible, de nombreuses protéines présentant des comportements de solubilité intermédiaires. À cet égard, des albumines de graines ont été identifiées parmi plusieurs espèces de plantes se comportant comme des globulines en ce qui concerne la solubilité (Bollini et Chrispeels, 1978; Youle et Huang, 1978).

Dans le présent travail, nous avons utilisé une procédure efficace pour isoler des fractions totales des albumines et des globulines (Franco et al., 1997). Plus tard, une technique d'analyse d'électrophorèse (SDS-PAGE) a été utilisée pour une détermination plus précise des diverses fractions des protéines des semences.

Boulter, Thurman et Turner (1966) ont souligné les avantages de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide pour la séparation de protéines végétales. La méthode SDS-PAGE est une technique adéquate pour différencier les variétés et est utilisée avec succès dans l'évaluation de la diversité génétique (Amouri et al., 2014)

Nos résultats, d'électrophorèse des marqueurs protéiques (albumine et globuline) par SDS-PAGE ont révélé trois zones de migration (A, B et C). Ces deux fractions protéiques ont montré une hétérogénéité aux niveaux intraspécifique avec 24 et 27 bandes d'albumines et de globulines, respectivement, qui sont séparées dans les trois zones avec une résolution nette. L'intervalle de variation des fréquences de ces bandes (de 0 à 100 %) reflète une grande diversité intraspécifique au sein l'espèce annuelle *M. truncatula*. 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 agroclimatique (Mahnane, 2009).

D'autres études ont montré que les profils des protéines chez les différents géotypes de *M. truncatula* révèlent des variations quantitatives et qualitatives (Ladizinsky et Hymowitz, 1979), et sont hautement stables et parfois spécifiques à l'espèce (Boulter et al., 1967. Johnson et al., 1965). Ces mêmes auteurs (Ladizinsky et Hymowitz, 1979) rapportent la présence d'une variation dans le nombre, la position et l'intensité des bandes chez des accessions de *M. truncatula*, suggérant que ces bandes sont sous contrôle d'un système de gènes quantitatives.

En revanche, nous avons trouvé un certain degré de similitude entre quelques accessions de l'espèce *M. truncatula*. Des études antérieures au niveau intraspécifique ont également révélé que, malgré des différences écologiques et géotypes possédaient des profils de protéines très similaires (Le Signor et al., 2005). Osborne (1924), à partir de ses études sur les propriétés des protéines de graine, a conclu à la conclusion qu'« on ne trouve donc des protéines similaires que dans des graines étroitement liées du point de vue botanique ».

A la lumière des résultats obtenus, une classification hiérarchique a été élaborée, et les distances génétiques entre les accessions étudiées ont été représentées. La structuration des différentes accessions et la classification hiérarchique des groupes obtenus mettent en relief le degré de similarité et de diversité entre les accessions étudiées. Les indices de similarité de Jaccard allaient de 0.05 et 0.62 avec une moyenne de 0.32 pour la fraction albumine et entre 0.00 et 0.50 avec une moyenne de 0.23 pour les globulines. On note que les accessions s'organisent en groupes et sous- groupes, nous avons défini quatre groupes majeurs pour les albumines et six groupes majeurs pour les globulines.

Le regroupement des différentes accessions selon le polymorphisme des albumines a engendré une corrélation relative avec leurs origines éco-géographiques. Nous avons détecté une organisation des accessions originaire de l'Est algérien dans un groupe et celle du centre et l'Ouest dans autre groupe. Contrairement, la subdivision basée sur les globulines n'a pas été clairement corrélé aux origines éco-géographiques des accessions.

Le développement de techniques électrophorétiques a fourni une méthode plus directe pour estimer la diversité génétique au sein et parmi les populations des plantes (Hamrick et al., 1992). Un grand nombre de variantes électrophorétiques des enzymes ont maintenant été découverts

(Oliveira et al, 1997). Ces découvertes ont permis de savoir que des enzymes peuvent exister dans le même organisme sous plus d'une forme moléculaire. De telles formes moléculaires multiples d'une enzyme dans un seul organisme ont été désignées isozymes. Les isoenzymes, ou formes moléculaires multiples d'enzymes, sont des enzymes qui partagent un substrat commun mais diffèrent par leur mobilité électrophorétique (Markert et Moller,. 1959).

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

Nos résultats ont démontré une grande variabilité pour les estérases, qui ont révélé 9 bandes réparties en 3 loci produisant 17 phénotypes. Une plus faible variabilité a caractérisé le glutamate oxaloacétate transaminase avec 3 bandes localisées dans deux zones d'activité bien distinctes engendrant 2 phénotypes seulement. Ce résultat concorde avec celui de Weeden et Wendel (1990), qui ont trouvé dans leurs études que les estérases sont l'un des systèmes enzymatiques à fort polymorphisme chez les plantes.

La topologie du dendrogramme basé sur l'indice de Jaccard généré à partir de la matrice de données binaires des isoenzymes, a ressorti l'importance de la variation des isoenzymes entre les accessions testées, avec des valeurs de Jaccard qui allait de 0.00 et 0.70 avec une moyenne de 0.29. Le dendrogramme construit a confirmé le degré élevé de diversité entre les accessions de *M. truncatula* et a montré que ces accessions peuvent être classées en trois groupes distincts. Cependant, ces accessions ne se sont pas regroupées sur la base de leurs emplacements éco-géographiques. Haddioui et collaborateurs (2012), ont trouvé le même résultat dans leur étude.

Ce résultat est en accord avec les conclusions de nombreuses études de variation enzymatique sur des populations de *Medicago* (Bullitta et al,. 1994. Chandra et al,. 2011. Cherifi,. 1996. Haddioui et al,. 2012). Les études de Bonnin ont révélé une large diversité génétique au sein de l'espèce autogame *M. truncatula*, entre les populations mais aussi à l'intérieur de certaines populations (Bonnin et al,. 1996. Bonnin et al,. 2001). Cette grande diversité génétique entre les populations pourrait s'expliquer par les niveaux élevés d'autogamie chez *M. truncatula*, Selon Hamrick et Godt (1990). Les espèces à autogamie prédominante peuvent garder des niveaux de polymorphisme à l'intérieur des populations (Cherifi,. 1996).

*CONCLUSION ET  
PERSPECTIVES*

Ce travail de recherche avait pour objectif, d'apprécier la diversité existant au sein de l'espèce *M. truncatula* par des marqueurs protéiques et enzymatiques sur 29 échantillons recueillis dans diverses conditions éco-géographiques dans le nord de l'Algérie.

Nous avons utilisé deux protocoles d'extraction, l'un sur des graines matures pour extraire les protéines et l'autre sur des feuilles de plantules pour extraire les enzymes. Pour obtenir la meilleure expression possible, on a appliqué une électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pour séparer les protéines et une autre en conditions non dénaturantes (PAGE) pour mettre en évidence les enzymes.

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

- Détecter les différences au niveau des profils protéiques et enzymatiques chez les différentes accessions étudiées.
- Dénombrer 51 bandes à travers les deux fractions protéiques et 12 allozymes avec 19 phénotypes pour les deux systèmes enzymatiques, avec des mobilités et des fréquences très variables.
- Répertoire des bandes protéiques rares et communes entre les différentes accessions
- Les profils de protéines de la graine analysés dans la présente étude ont montré un polymorphisme entre la majorité des accessions.
- Détecter une grande variabilité génétique pour les estérases (17 phénotypes) en comparant avec le système GOT qui a été considéré monomorphe avec deux phénotypes seulement.
- Analyser la diversité génétique au niveau intra-spécifique ce qui nous a aidé à estimer les distances génétiques entre pools géniques en comparant leurs origines géographiques.
- Effectuer une caractérisation phylogénétique des différentes accessions étudiées par une classification hiérarchique en UPGMA, ça nous a conduit à constater la présence d'une corrélation entre le regroupement des accessions selon le polymorphisme des albumines, et les facteurs climatiques et géographiques des régions d'origine de chaque accession. Cependant une absence de cette corrélation avec les regroupements des autres marqueurs.
- Estimer les corrélations entre les polymorphismes générés par chaque marqueur analysé. Le résultat du test a démontré une forte corrélation entre les deux fractions protéiques, cependant une corrélation moins importante avec les marqueurs enzymatiques.
- Les résultats obtenus permettent de dégager les intérêts des marqueurs biochimiques à l'échelle du phénotype.

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

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

- Mieux apprécier cette diversité et confirmer les résultats obtenus.
- 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 cette espèce Algérienne, ce qui peut donner une indication sur le modèle d'évolution appliqué aux accessions étudiées dans leurs conditions environnementales.
- Approfondir les connaissances sur cette espèce pour une meilleure valorisation dans les domaines de l'écologie, agriculture, industrie et médicale.
- Essayer de comprendre les mécanismes d'adaptation de ce groupe de plante.
- Elargir le champ d'application des techniques de l'électrophorèse PAGE et SDS PAGE, et étudier d'autres genres et d'autres espèces pour la préservation de la diversité biologique et des ressources génétiques.
- Essayer de corréler cette diversité protéique et enzymatique avec d'autres études.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

**Adel Amar A. (2016).** *caracterisation moleculaire et biochimique en condition de stress salin de Medicago truncatula Gaertner.* Thèse de doctorat. Université Oran 1 ahmed ben bella. Oran.

**Amor BB, Shaw SL, Oldroyd GE, Maillet F, Penmetsa RV, Cook D, Long SR, Denarie J, Gough C. (2003).** The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal*, 34 :495-506.

**Amouri AA, Fyad Lamèche FZ, Yahia N. (2014).** Genetic diversity of seed storage protein in *Medicago truncatula* genotypes in relation with salt stress tolerance. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7 (2): 55-59.

**Ane JM, Levy J, Thoquet P, Kulikova O, de Billy F, Penmetsa V, Kim DJ, Debelle F, Rosenberg C, Cook DR, Bisseling T, Huguet T, Denarie J. (2002).** Genetic and cytogenetic mapping of DMI1, DMI2, and DMI3 genes of *Medicago truncatula* involved in Nod factor transduction, nodulation, and mycorrhization. *Mol Plant Microbe Interact*, 15 :1108-18.

**Ayadi M. (2011).** *Variabilité de la tolérance à la salinité chez des espèces annuelles du genre Medicago.* Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister. Université D'Oran Es-Senia.

**Bakhti A. (2011).** *Recherche d'un polymorphisme de marqueurs microsatellites chez différentes espèces de plantes : cas des espèces annuelles de Medicago.* Mémoire De Magister. Université d'Oran.

**Barker DG, Bianchi S, Blondon F, Dattée Y, Duc G, Flament P, Galluxi P, Genier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T. (1990).** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 233 :78-93.

**Bataillon T, Ronfort J. (2006).** Evolutionary and Ecological Genetics of M, T, M, T Handboock 1-13.

**Bendiab K, Baaziz 1M, Brakez Z, Sedra2 H. (1993).** Correlation of isoenzyme polymorphism and Bayoud-disease resistance in date palm cultivars and progeny.

- Boisson D, Chabaud M, Rosenberg C, David G, Barker. (2001).** *Agrobacterium rhizogenes* -Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations.
- Bollini R, Chrispeels MJ. (1978).** Characterization and subcellular location of vicilin and phytohemagglutinin, the 2 major reserve proteins of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 142: 291-298.
- Bonnin I, Prosperi JM, Olivieri I. (1996).** Genetic markers and quantitative genetic variation in *Medicago truncatula* (Leguminosae): A comparative analysis of population structure. *Genetics*, 143:1795-1805.
- Bonnin I, Ronfort J, Wozniak F, Olivieri I. (2001).** Spatial effects and rare outcrossing events in *Medicago truncatula* (Fabaceae). *Mol Ecol*, 10:1371-1383.
- Boulter D, Thurman DA, Turner BL. (1966).** The Use Of Disc Electrophoresis Of Plant Proteins in Systematics. *Taxon*, 15: 135.
- Boulter D, Thurman DA, Derbyshire E. (1967).** A Disc Electrophoresis Study Of Globulin Proteins Of Legume Seeds With Reference To Their Systematics. *New Phytologists*, 66: 27–36.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J. (2003).** Beans (*Phaseolus* spp): Model Food Legume. *Plant and Soil*, 252: 55-128.
- Bullitta S, Floris R, Hayward MD, Loi A, Porqued du C, Veronesi F. (1994).** Morphological and biochemical variation in Sardinian populations of *Medicago polymorpha* L. suitable for rainfed Mediterranean conditions. *Euphytica*, 77:263-268.
- Cannon SB, McCombie WR, Sato S, Tabata S, Denny R, Palmer L, Katari M, Young ND, Stacey G. (2003).** Evolution and microsynteny of the apyrase gene family in three legume genomes. *Molecular Genetics Genomics*, 270: 347-361.
- Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Puhler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thebault P, Vandenbol M, Weidner S, Galibert F. (2001).** Analysis of the chromosome

sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17): 9877-9882.

**Chabaud M, Larsson C, Marmouget C, Huguet T. (1996).** Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Reports*, 15(5): 305-310.

**Chandra A, Verma S, Pandey KC. (2011).** Genetic similarity based on isozyme banding pattern among fifty species of *Medicago* representing eight sections (Fabaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 39:711-717.

**Chebouti A, Abdelguerfi A, Mefti M. (2001).** Effet du stress hydrique sur le rendement en gousses et en graines chez trois espèces de luzernes annuelles : *Medicago aculeata*, *Medicago orbicularis* et *Medicago truncatula*. *Options Méditerranéennes*, 45 (A):163- 166.

**Cherifi K. (1996).** Polymorphisme enzymatique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L.) Krock et de *Medicago intertexta* (L.) Mill. *Acta Botanica Gallica*, 143:155- 165.

**Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Gale MD, Devos KM. (1998).** Plant comparative genetics after 10 years. *Science*, 282: 656-659.

**Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB, Young ND, Cook DR. (2004).** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *PNAS* 101: 15289-15294.

**Cook DR. (1999).** *Medicago truncatula*- a model in the making. *plant Biology*, 2: 301-304.

**Cook DR, Kim DJ, Zhu HY, Uribe P. (2000).** Plant-pathogen interactions in *Medicago truncatula*. *Grain Legumes*, 28: 20.

**Cornara L, Xiao J, Burlando B. (2015).** Therapeutic Potential of Temperate Forage Legumes: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 41:p3.

**Dekkers JCM, Hospital F. (2002).** The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. *Nature Rev, Genet.* 3, 22-32.

**Delalande M, Greene S, Hughes S, Nair R, Huguet T, Aouani ME, Prospero JM. (2007).** Wild accessions/populations. *Medicago truncatula handbook*, 1-27.

- Dénarie J, Gamas P. (2001).** La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. *Ecole thématique Biologie végétale*, 1-9.
- Dixon RA. (1999).** In *Comprehensive Natural Products Chemistry*. Sankawa U. ed. (Elsevier, Oxford, UK) Vol. 1, pp: 773-823.
- Djè Y, Heuertz M, Lefèbvre C, Vekemans X. (2000).** Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 918–925.
- Doyle JJ, Luckow MA. (2003).** The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol*, 131:900-910.
- Eagles HA, Bariana HS, Ogonnaya FC, Rebetzke GJ, HOLLAMBY GJ, Henry RJ, Henschke PH, Carter M. (2001).** Implementation of markers in Australian wheat breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 52 (11–12), p. 1349–1356.
- Emanuel F, Ricardo BF, Artur R, Teixeira. (1997).** Utilization of an Improved Methodology To Isolate *Lupinus albus* Conglutins in the Study of Their Sedimentation Coefficients.
- Fournier P. (1961).** Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated *rhizobial* colonization. *Plant Physiology*, 148: 1985-1995.
- Franco E, Ferreira RB, Teixeira AR. (1997).** Utilization of an Improved Methodology To Isolate *Lupinus albus* Conglutins in the Study of Their Sedimentation Coefficients.
- Frugoli J, Harris J. (2001).** *Medicago truncatula* on the move. *the Plant Cell*, 13: 458-63.
- Gale MD, Devos KM. (1998).** Comparative genetics in the grasses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95:1971–1974.
- Gamas P, Niebel FDC, Lescure N, Cullimore JV. (1996).** Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*, 9: 233–242.
- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND. (2005).** Legumes as a Model Plant Family. Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. *Plant Physiology*, 137: 1228– 1235.

- Grivet D. (2002).** *Phylogéographie et évolution moléculaire comparée d'arbres forestiers à l'aide des marqueurs chloroplastiques*. Thèse. Université de Nancy I. France.p29.
- Haddioui A, Zinelabidine LH, Nouri M, Ajal EA, El Hansali M, Hanine H. (2012).** Genetic Diversity of Natural Populations of *Medicago Truncatula* in Morocco Using Isozyme Polymorphism. *World journal of Agricultural Science*, 8 :13-19.
- Hamrick JL, Godt MJW. (1990).** Allozyme diversity in plant species, in: Brown A.H.D., M.T. Clegg A.L. Kahler and B.S. Weir, (Eds.), *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, Sinaner Associates, Sinauer Associates Inc, pp, 43-63, Sunderland, Massachusetts.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL. (1992).** Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New For*, 6: 95–124.
- Handberg K, Stougaard J. (1992).** *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2: 487-496.
- Harry M. (2001).** Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine, Paris.
- He J, Benedito VA, Wang M, Murray JD, Zhao PX, Tang Y, Udvardi MK. (2009).** The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. *BMC Bioinformatics*, 10: p441.
- Hippolyte C. (1901-1906).** Flore descriptive et illustrée de la France, de la Corse et des contrées limitrophes, Klincksieck, Paris, 3 volumes.
- Hireche Y. (2006).** *Réponse de la luzerne (Medicago sativa L) au stress hydrique et à la profondeur de semis*. Mémoire De Magister. Université d'EL-Hadj Lakhdar, Batna.
- Huguet T, Proserpi JM. (1996).** *Medicago truncatula*: a legume model-plant. *Cahiers Options méditerranéennes*, 18: 171-175.
- Jack CM, Dekkers, Hospital F. (2002)** .The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations.
- Jackson SA, Cheng Z, Wang ML, Goodman HM, Jiang J. (2000).** Comparative fluorescence in situ hybridization mapping of a 431-kb *Arabidopsis thaliana* bacterial artificial chromosome contig reveals the role of chromosomal duplications in the expansion of the Brassica rapa genome. *Genetics*, 156: 833-838.
- Johnson BL, Hall O. (1965).** Analysis of phylogenetic affinities in Triticinae by protein electrophoresis. *American Journal of Botany*, 52: 506–513.

**Journet EP, Carreau V, Gouzy J, Thoquet P, Rosenberg C, Barker D, Huguet T, Denarie J, Gamas P. (2001).** La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. *Ecole thématique Biologie végétale*, 8(5) : 478–484.

**Kalo P, Endre G, Zimanyi L, Csanadi G, Kiss GB. (2000).** Construction of an improved linkage map diploid alfalfa *Medicago sativa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 641–657.

**Kiss GB , Young ND, Cook DR. (2004).** Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 15289-15294.

**Kumar LS. (1999).** DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnol. Adv*, 17(2-3):143-182.

**Ladizinsky G, Hymowitz T. (1979).** Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theoretical and Applied Genetics*, 54: 145–151.

**Ladizinsky G. (1983).** Study of Evolutionary Problems by Means of Seed Protein Electrophoresis. *Seed Proteins*. Pp 481-498.

**Laemmli UK. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

**Lalaoui-Kamal M, Assali NE. (1997).** Utilisation des marqueurs moléculaires RFLP.

**Lapeyronie A. (1982).** Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. *Maisonneuve et Larose*, Paris.

**Lazrek-Ben friha F. (2008).** *Analyse de la diversité génétique et symbiotique des populations naturelles tunisiennes de Medicago truncatula et recherche de QTL liés au stress salin*. Thèse De Doctorat. L'université de Toulouse. France.

**Lefebvre V, Chèvre AM. (1995).** Tools for marking plant disease and resistance genes: a review. *Agronomie*, 15: 3–19.

**Lesins K. (1970).** Interspecific crosses involving alfalfa. V. *Medicago saxatilis* x *M. sativa* with reference to *M. cancellata* and *M. rhodopea*. *Canadian Journal of Genetics Cytology*, 12:80-86.

**Lesins KA, Lesins I. (1979).** Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Dr. W. Junk bv Publishers, The Hague-Boston-London.

**Lévy J, Bres C, Geurts R, Chalhoub B, Kulikova O, Duc G, Journet EP, Ané JM, Lauber E, Bisseling T, Dénarié J, Rosenberg C, Debelle F. (2004).** A Putative Ca<sup>2+</sup> and Calmodulin-Dependent Protein Kinase Required for Bacterial and Fungal Symbioses. *Science*, 303: 1361 – 1364.

**Mahnane W. (2009).** *Appréciation De La Diversité Génétique Du Genre Rétama Par Les Marqueurs Biochimiques.* Mémoire En Vue De L'obtention Du Diplôme De Magistère. Université Mentouri Constantine.

**Margalé E, Chèvre AM, Delourme R, Hervé Y. (1994).** Description de la diversité génétique chez *Brassica oleracea* à l'aide de marqueurs isoenzymatiques et moléculaires. *Genet Sel Evol* 26. Suppl 1, 137s-153s.

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

**Mebarek I. (2010).** *Analyse comparative de la diversité génétique et de la structure des populations chez l'orge (*hordeum vulgare* L.) à l'aide de marqueurs *ssr*, *dart* et du *pedigree*.* Thèse de doctorat. Département de phytologie faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université, laval québec.

**Medoukali I. (2016).** *Les genres *Medicago* L. et *Trifolium* L. en Algérie: Diversité morphologique, biochimique et moléculaire.* Thèse De Doctorat. Université des Frères Mentouri, Constantine.

**Oliveira Ja, Balfourier F, Charmet G, Arbones E. (1997).** Isozyme polymorphism in a collection of Spanish and French perennial ryegrass populations. *Agronomie*, 17: 335–342

**Osborne TB. (1924).** *The Vegetable Proteins*; Longmans, Green: London.

**Parizeau ME. (1997).** *La biodiversité.* Edition de boeck, Bruxelles.

**Prosperi JM, Angevain M, Genier C, Olivieri I, Mansat P. (1993).** Sélection de nouvelles légumineuses fourragères pour les zones difficiles méditerranéennes. *Fourrages*, 135: 343-354.

- Prosperi JM, Isabelle O, Angevain M, Génier G, Nansat P. (1993).** Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. *Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes*, 4: 1-5.
- Prosperi, JM, Guy P, Genier G, Angevain M. (1995).** Les luzernes ou le genre *Medicago*. In : Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. INRA Editions.
- Quiros CF. (1983).** ALFALFA, LUZERNE (*Medicago sativa L.*). *Isozymes: In Plant Genetics and Breeding*, 1 (B):253-294.
- Rieseberg LR, Ellstrand NE. (1993).** What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization. *Crit. Rev. Plant Sci*, 12: 213-241.
- Rose RJ. (2008).** *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Functional Plant Biol*, 35: 253-264.
- Sadeghian S, Hesamzadeh Hejazi SM. (2014).** Cytogenetic Studies in Some Species of *Medicago L.* in Iran. *European Journal of Biology*, 73(1): 21-30.
- Santoni S, Faivre-Rampant P, Prado E, Prat D. (2000).** Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. *Cahiers d'études et de recherches francophones/ Agricultures*, 9: 311-327.
- Shimamoto K, Kyojuka J. (2002).** Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53: 399-419.
- Signor C, Gallardo K, Prospero J M, Salon C, Quillien L, Thompson R, Duc G. (2005).** Genetic diversity for seed protein composition in *Medicago truncatula*. *Plant Genetic Resources*, 3(1): 59-71.
- Singh NK, Shepherd KW, Cornish GB. (1991).** A simplified SDS-PAGE procedure for separating LMW subunits of glutenin. *Journal of Cereal science*, 14 :203-208
- Sprent JI. (1995).** Legume trees and shrubs in the tropics: N<sub>2</sub> fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4/5): 401-407.
- Staub JE, Serquen FC. (1996).** Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience*, 31: 729-741.

- Tanksley SD, Orton TJ. (1983).** Isozymes in plant genetics and breeding. *Elsevier*, Amsterdam.
- Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE. (1992).** Genetic transformation of *Medicago truncatula* using Agrobacterium with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Reports*, 11: 113- 117.
- Tivoli B, Baranger A, Sivasithamparam K, Barbetti MJ. (2006).** Annual Medicago: From a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the Nature of disease resistance. *Ann Botany*, 98: 1117–1128.
- Udvardi M. (2002).** Legume genomes and discoveries in symbiosis research. *Genome Biology*, 3 reports 4028,1 - reports 4028.3.
- Udvardi MK, Tabata S, Parniske M, Stougaard J. (2005).** *Lotus japonicus*: legume research in the fast lane. *Trends Plant Sci*, 10: 222-228.
- Valizadeh M, Kang KK, Kanno A, Kameya T. (1996).** Analysis of genetic distance among nine Medicago species by using DNA polymorphisms. *Breeding Science*, 46: 7–10.
- Vodenicharova M. (1989).** Use of proteins as molecular-genetic markers in plants. *Genet Sel*, 22: 269-277.
- Yan HH, Mudge J, Kim DJ, Larsen D, Schoemaker RC, Cook DR, Young ND. (2003).** Estimates of conserved microsynteny among genomes of Glycine max, *Medicago truncatula* and Arabidospis thaliana. *Theoretical and Applied genetic*, 106: 1256- 1265.
- Yemm EW. (1958).** The plant proteins and peptides and their localization in cells and tissues. *Der Stickstoffumsatz / Nitrogen Metabolism*, Pp 315-332.
- Youle RJ, Huang AHC. (1978).** Albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant Physio*. 61: 1316
- Young ND, Mudge J, Ellis THN. (2003).** Legume genomes: more than peas in a pod. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:199-204.
- Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD, Roe BA, and Tabata S. (2005).** Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, 137: 1174-1181.
- Weeden NF, Wendel JF. (1990).** Genetics of plant isozymes, In: Soltis DE, Soltis PE (Eds). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press, Portland, pp 46-72.

**Zhu H, Choi HK, Cook DR, Shoemaker RC. (2005).** Bridging Model and Crop Legumes through Comparative Genomics. *Plant Physiology*, 137: 1189–1196.

# *ANNEXES*

**ANNEXE 1. Séparation des albumines et des globulines par SDS-PAGE****Solutions pour la préparation des gels.****Tampon Tris-HCl pH : 8.8** (Conserver à 4°C)

- Tris	60.57 g
- Eau distillé	~ 400 mL
- Ajuster à pH 8.8 avec du HCl fumant	~ 8 à 10 mL
- Eau distillée	Qsp 500 mL

**Tampon Tris-HCl pH : 6.8** (Conserver à 4°C)

- Tris (hydroxyméthyl aminomethan)	30.285 g
- Eau distillée	~200 mL
- Ajuster à pH 6.8 avec du HCl fumant	~ 19.5 mL
- Eau distillée	Qsp 250 mL

**Solution stock de SDS à 10%** Stocker à température ambiante

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

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

- APS (stocké au frigo)	0.2 g
- Eau distillée	Qsp 20 mL

**Gel de séparation (migration= running gel) à 12.52%**

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

**Gel de concentration (stacking gel) à 5%**

- Acrylamide-bisacrylamide (30 : 0.8)	0.5 mL
- Eau permutée	3.25 mL

*ANNEXE*

---

- Tampon Tris-HCL, pH 6.8	1.25 mL
- SDS 10%	0.14 mL
- APS 20%	25 $\mu$ L
- TEMED	4 $\mu$ L

**ANNEXES 2.**

**Tampon d'électrophorèse** (Stocker à température ambiante)

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

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

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

- TCA	30 g
- Solution mère de Bleu de Coomassie R250	12.5 mL
- Eau distillée	Qsp 250 mL

Bien mettre en agitation avant utilisation

**Solution mère de Bleu de Coomassie R250**

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

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

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

**ANNEXE 3.**

**Protocole de germination :**

- Mettre les grains dans 5 volumes de l'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ), concentré pendant 8 min avec une agitation intermittente.
- Mettre les grains dans 5 volumes de 5% de sodium hypochlorite pendant 3 min
- Décant l'eau de javel sous des conditions stériles (haute à flux laminaire).
- Rincer les grains par de l'eau distillée stérile 6 à 8 fois.
- incuber les graines pendant 1 heure dans le dernier rinçage.
- une fois gonflée, elles sont déplacé sur du milieu agar (7g/l) (6.7% d'agar) et incubé à 4°C pendant 3jours, puis à 14°C pendant 24 heures à l'abri de la lumière.

**ANNEXE 4. Révélation des enzymes**

D'après Bendiab et al, 1993.

**Estérases (EST). E.C. 3.1.1.**

- $\alpha$ -Naphtylacétate (se dissout dans l'acétone à 50%) 0.03 g
- Tampon (q.s.p) 100 ml, Tris-HCl 0.05 M, pH 7.2

Incuber 15 minutes à 37°C.

- Rincer le gel deux fois avec de l'eau courante

Incuber 20 min dans la solution de coloration :

- Fast Blue RR salt 0.14 g
- Tampon Tris-HCl 25 ml, pH 7.2
- H<sub>2</sub>O (q.s.p) 100 ml

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

**E.C. 2.6.1.1.**

- Acide -L- Aspartique 0.25 g
- Acide alpha-cétoglutarique 0.1 g
- Tampon 50 ml, Tris-Hcl 0.5 M, pH 7.2
- 100 ml (q.s.p) H<sub>2</sub>O

Incuber 15 min à 37°C puis rincer avec de l'eau courante et rajouter la solution de coloration:

- Fast Blue BB 0.2 g
- Tampon 25 ml
- Tris-Hcl 0.5M, pH 7.2
- H<sub>2</sub>O (q.s.p) 100 ml

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

Nom : <b>Benmounah Boughaba</b> prénom : <b>Sarah Aida</b>	<b>Date de soutenance : 21/07/2019</b>
<b>Thème : <i>Medicago truncatula</i> Algérienne: analyse de la diversité génétique par les marqueurs protéiques et enzymatiques.</b>	
Diplôme : Master en sciences biologiques spécialité Biochimie de la nutrition	
<b>Résumé</b>	
<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. Notre étude a pour objectif la mise en évidence d'une éventuelle variabilité génétique des fractions des albumines et globulines, ainsi des deux systèmes enzymatiques EST et GOT, par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en rapportant sur une seule espèce du genre <i>Medicago</i> représentées par 29 accessions, et collectées dans différents sites éco géographiques, couvrant une large gamme des étages bioclimatiques dans le nord Algérien.</p>	
<p>La variabilité des protéines et des enzymes a été analysées en se basant sur la matrice de présence et d'absence des bandes. Leur fréquence a été calculée pour toutes les accessions. Pour chaque marqueur analysé, les distances de Jaccard ont été calculées et des dendrogrammes ont été construit selon la méthode agrégative UPGMA. Des matrices de distances génétiques entre les 29 accessions ont été élaborées également.</p>	
<p>Globalement, les accessions étudiées ont généré 63 bandes de protéines et enzymes 24 bandes pour les albumines, 27 bandes pour les globulines, et 12 pour le GOT et EST dont le nombre et les fréquences sont variables d'une accession à l'autre. Parmi celles-ci, plusieurs bandes ont été partagées par deux ou trois accessions, il y a quelques bandes spécifiques à certaines accessions. Le polymorphisme a été souligné par la classification hiérarchique des accessions. La corrélation avec les origines géographiques des accessions a été faible. Une forte corrélation entre le polymorphisme généré par les deux fractions protéiques (albumines et globulines) a été observée, avec une corrélation moindre avec le polymorphisme enzymatique.</p>	
<p>Les résultats obtenus permettent de conclure qu'il existe un polymorphisme protéique et enzymatique entre les différentes accessions étudiées qui se traduit par le nombre des bandes répertoriées et leur variabilité.</p>	
<b>Mots clés</b> : Albumines, Algérie, EST, Globulines, GOT, <i>M. truncatula</i> , polymorphisme, SDS-PAGE.	
<b>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</b>	
Jury de soutenance Président : Mme MOUSSAOUI S Maitre de Conférences. UFM – Constantine. Rapporteur : Mme MEDOUKALI I. Maitre de Conférences. UFM – Constantine. Examinatrice : Mme GUENDOZ A. Maitre-assistant. UFM - Constantine.	