



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

**جامعة قسنطينة 1 الإخوة منتوري**  
**كلية علوم الطبيعة والحياة**

**قسم : الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية والجزئية**

**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**

Intitulé :

**Etude de la diversité génétique au sein de *Medicago ciliaris* Algérienne  
par les marqueurs morphologiques et moléculaires**

**Présenté par : KIAS DINA**

**Le : 25/06/2025**

**SAADOUNI DARINE**

**Jury d'évaluation :**

**Présidente : BENSARI S. (MCB-U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Encadrante : MEDOUKALI I. (MCB-U Constantine 1 Frères Mentouri).**

**Examinateuse: OUEL BANI R. (MCB-U UConstantine 1 Frères Mentouri).**

**Année universitaire  
2024 - 2025**

### ***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 encadrante Mme MEDOUKALI I*

*.Maitre de conférence au département de biochimie et biologie cellulaire et moléculaire à l'université Constantine 1 pour l'orientation, sa confiance, sa patience, sa gentillesse, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*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 BENSARI S. pour avoir bien voulu 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 OUELBANI R. de l'honneur qu'elle nous fait d'avoir acceptée de se joindre à ce jury en tant qu'examinatrice et de nous consacrer son temps.*

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

## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à*

*La source de tendresse et d'amour ma très chère maman la plus merveilleuse et la plus courageuse des mères du monde que dieu la protège à chaque moment.*

*A mon chère père*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le respect que j'ai pour toi.*

*Rien au monde ne vaut les efforts tu as fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.*

*A mes très cher frère : Adem, et mon petit Rami.*

*A mon cher grand-père (Amar) et ma chère grand-mère (Fatiha).*

*A Ma chère binome Darine.*

*A tous les membres de ma famille et amis proche pour leur soutien moral.*

**KIAS DINA**

## **Dédicace**

*Je dédie ce travail, avec tout mon amour et ma reconnaissance, à ceux qui occupent une place irremplaçable dans mon cœur.*

**À mes chers parents (Mounir) et (Samira)**

*Pour votre amour inconditionnel, vos sacrifices silencieux, votre patience infinie et votre soutien constant. Vous êtes ma plus grande fierté et ma plus belle force.*

**À mes frères (Sami) et (Radoine)**

*Merci pour votre tendresse, votre présence rassurante et votre soutien dans les moments où J'en avais le plus besoin.*

**À mes proches (karima) (Douaa)(hawa)(chaima ismahane) ikram**  
*pour les moments partagés, les discussions enrichissantes et leur soutien moral.*

*A Ma chère binome Dina*

*Saâdouni Darine.*

# *Sommaire*

## **Liste des abréviations**

## **Liste des tableaux**

## **Liste des figures**

<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
---------------------------	----------

### **CHAPITRE 1 : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>1. Présentation des légumineuses</b> .....	<b>3</b>
1.1. Importance des légumineuses.....	5
<b>2. Présentation du genre <i>Medicago</i></b> .....	<b>6</b>
2.1. Généralité .....	6
2.2. Taxonomie et génétique.....	7
2.3. L'aire de répartition du genre <i>Medicago</i> .....	8
2.3.1. Espèces spontanée du genre <i>Medicago</i> rencontrées en Algérie.....	9
2.4. Description botanique.....	10
<b>3. Présentation de l'espèce d'étude <i>M. ciliaris</i></b> .....	<b>11</b>
3.1. Morphologique et phénologique de <i>M.ciliaris</i> .....	11
3.2. Position systématique.....	12
3.3. Distribution géographique.....	13
3.4. Habitat et répartition écologique.....	13
3.5. Exigences édaphiques et climatiques.....	14
3.6. Nombre chromosomique de <i>M.ciliaris</i> .....	14
3.7. Intérêt de l'espèce étudiée.....	14
<b>4. La diversité génétique et son importance</b> .....	<b>15</b>
<b>5. L'étude de la diversité génétique</b> .....	<b>16</b>
5.1. Marqueurs morphologiques .....	17
5.2. Marqueur moléculaires.....	17
5.3. Marqueurs biochimiques.....	18
5.3.1. Marqueurs enzymatiques.....	18
5.3.2. Marqueurs protéiques.....	19

### **CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES**

<b>1. Matériel végétal</b> .....	<b>20</b>
<b>2. Méthodes d'étude</b> .....	<b>21</b>

2.1. Analyse morphologique.....	21
2.2. Analyse moléculaire.....	23
2.2.1. Préparation des échantillons.....	23
2.2.2. Analyse SSR.....	23
2.2.3. Amplification in vitro de l'ADN par PCR.....	24
a) Principe.....	24
b) Condition d'amplification.....	25
c) Test d'amplification.....	26
2.3. Analyse statistique.....	26

### **CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION**

<b>1. Analyse de la diversité morphologique.....</b>	<b>28</b>
1.1. Analyse en composantes principales des caractères biométriques (ACP ).....	30
1.2. L'analyse des corrélations entre les caractères quantitatifs.....	31
1.3. Corrélation entre les caractéristiques morphologiques et les paramètres écologiques...	33
1.4. L'analyse des corrélations entre les caractères morphologiques et les cinq paramètres écologiques.....	35
1.5. Analyse des distances génétiques et des caractéristiques écogéographiques des accessions de <i>M.ciliaris</i> .....	37
1.6. Classification ascendante hiérarchique (CAH) en se basant sur les données morphologiques.....	39
<b>2. Analyse de la diversité moléculaire.....</b>	<b>40</b>
2.1. Mobilité et fréquence des amplifiants.....	40
2.2. Analyse génétique.....	45
2.3. Analyse des relations génétiques entre accessions de <i>M. ciliaris</i> à partir d'une matrice de similarité (indice de Jaccard).....	45
2.4. Classification ascendante hiérarchique (CAH).....	48
<b>3. Discussion.....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>54</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumés</b>	

## ABREVIATIONS

ACP	Principal Component Analysis
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFL	Aire de la première feuille
ALT	Attitude
BFL	Largeur de la première feuille
DCOT	Date d'émergence des cotylédons
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
dNTP	Désoyribonucléoside triphosphate
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
kDa	Kilo Dalton
LAT	Latitude
LFL	Longueur de la première feuille
LON	Longitude
LP	Longueur des gousses
LS	Longueur des graines
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
N <sub>2</sub>	Azote atmosphérique
pb	Paire de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pm	La pluviométrie moyenne
RAPD	Randomly Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RW	Poids des gousses
SH	Subhumide
SP	Nombre de graines par gousse
SSR	Simple Sequence Repeats
TBE	Tris, acide borique, EDTA
TM	La température maximale
Tm	Moyenne de la température minimale du mois le plus froid

UPGMA	Unweighted Pair Group Method Arithmec Average
WP	Largeur des gousses
WS	Largeur des graines
WTP	Poids de 30 gousses
WTS	Poids de mille graines

## Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Phylogénie des Légumineuse d'après l'analyse des séquences du gène chloroplastique.....	<b>5</b>
<b>Figure 2 :</b> Carte géographique de la distribution de genre <i>Medicago</i> dans le monde.....	<b>9</b>
<b>Figure 3:</b> <i>M.ciliaris</i> (L.) All., 1785.....	<b>12</b>
<b>Figure 4.</b> Localités géographiques des 20 espèces du genre <i>M.ciliaris</i> colletées dans le Nord Algérien.....	<b>20</b>
<b>Figure 5 :</b> La PCR, une amplification exponentielle.....	<b>24</b>
<b>Figure 6 :</b> étapes de PCR.....	<b>25</b>
<b>Figure 7.</b> Analyse en composantes principales de douze caractéristiques morphologiques.....	<b>31</b>
<b>Figure 8.</b> Analyse en composantes principales des caractères biométriques et leur relation avec les paramètres écologiques.....	<b>35</b>
<b>Figure 9.</b> Classification hiérarchique en UPGMA des 16 accessions de <i>M. ciliaris</i> basée sur les données morphologiques: le premier groupe, le deuxième groupe, le troisième groupe, le quatrième groupe.....	<b>40</b>
<b>Figure 10.</b> Classification hiérarchique en UPGMA des 16 accessions de <i>M. ciliaris</i> basée sur le polymorphisme des SSR : le premier groupe, le deuxième groupe, le troisième groupe.....	<b>41</b>
<b>Figure 11.</b> Profil électrophorétique des bandes SSR de l'espèce <i>M. ciliaris</i> révélés par l'amorce AFct32.....	<b>42</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Les espèces spontanées du genre <i>Medicago</i> rencontrées en Algérie.....	<b>10</b>
<b>Tableau 2:</b> Origines géographiques des 20 accessions étudiées, avec les paramètres éco géographiques correspondants.....	<b>21</b>
<b>Tableau 3.</b> Séquence et groupe de liaison de cinq amorces de microsatellites testées.....	<b>24</b>
<b>Tableau 4.</b> Données descriptives des caractères morphologiques et des paramètres écologiques des 20 populations de <i>M. ciliaris</i> .....	<b>28</b>
<b>Tableau 5.</b> Moyenne, écart type et coefficient de variation des 12 traits analysés pour les 16 accessions de <i>M.ciliaris</i> .....	<b>30</b>
<b>Tableau 6.</b> Matrice de corrélations entre les différents caractères morphologiques des 16 accessions étudiés en se basant sur les données des morphologique.....	<b>33</b>
<b>Tableau 7.</b> Matrice de corrélation entre les différents caractères morphologiques et les cinq paramètres écologiques.....	<b>37</b>
<b>Tableau 8.</b> Distances génétiques obtenues entre les 16 accessions de <i>M. ciliaris</i> en se basant sur les données morphologiques.....	<b>39</b>
<b>Tableau 9.</b> Nombre total des bandes amplifiées et polymorphisme dans les 14 accessions pour chaque marqueur SSR.....	<b>44</b>
<b>Tableau 10.</b> Distances génétiques obtenues entre les 14 accessions de <i>M. ciliaris</i> en se basant sur les données moléculaires.....	<b>44</b>

# *INTRODUCTION*

## **INTRODUCTION**

L'Algérie se distingue par une remarquable diversité de climats et de milieux naturels, résultant de fortes variations de température, d'altitude, de précipitations et de caractéristiques édaphiques telles que la texture et la salinité des sols. Ces conditions ont favorisé le développement d'une flore riche et variée, comprenant de nombreuses espèces végétales à vocation fourragère, alimentaire ou médicinale. Certaines sont endémiques, d'autres sont exploitées pour leurs vertus nutritionnelles ou thérapeutiques (Armani, 2006).

Du littoral méditerranéen aux montagnes de l'Atlas et jusqu'aux étendues sahariennes, la diversité floristique algérienne est directement liée aux facteurs géographiques et environnementaux (Boukri, 2017 ; Sakhraoui et al., 2020). On y recense environ 3 139 espèces végétales réparties en 5 402 taxons (Quézel et Santa, 1962), une richesse qui reflète la complexité des biotopes du pays.

Parmi les familles botaniques majeures, les **Fabaceae** (légumineuses) occupent une place importante. Elles comprennent des plantes annuelles ou pérennes, des arbustes et des arbres (Tahkoubit, 2018), et se distinguent par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, enrichissant ainsi naturellement les sols (Meriane, 2018). La famille, répartie en trois sous-familles principales (Mimosoideae, Caesalpinoideae, Papilioideae), compte plus de 20 000 espèces (Doyle et Luckow, 2003), dont certaines sont couramment consommées (haricots, lentilles, pois, fèves, arachides), tandis que d'autres, comme la luzerne ou le soja, sont utilisées dans l'alimentation animale.

Au-delà de leur intérêt nutritionnel, les légumineuses jouent un rôle essentiel dans les domaines industriel, économique, écologique et agronomique. Elles représentent une source importante de protéines, fibres, vitamines et composés azotés. Cependant, leur étude reste complexe en raison de la taille importante de leur génome (Barker et al., 1990 ; Handberg et Stougaard, 1992).

Dans ce contexte, *M. ciliaris*, légumineuse annuelle du bassin méditerranéen, présente un intérêt croissant, elle se distingue par une importante variabilité morphologique et génétique, tant intra qu'interpopulation. Cette diversité est renforcée par une forte homozygotie au niveau individuel, caractéristique favorable pour les études génétiques et les programmes de sélection. De plus, sa capacité à s'adapter aux conditions climatiques difficiles en fait un excellent modèle pour les recherches sur la tolérance au stress et la durabilité des systèmes agroécologiques.

Ainsi, *M. ciliaris* constitue une ressource génétique précieuse pour le développement durable de l'agriculture, notamment dans les zones arides et semi-arides.

## **INTRODUCTION**

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la diversité génétique de différents écotypes de l'espèce *M. ciliaris*, récoltés dans plusieurs régions du Nord de l'Algérie selon un gradient bioclimatique. Cette évaluation repose sur l'analyse de marqueurs morphologiques (caractères biométriques) et moléculaires (microsatellites), à l'aide de la technique PCR et de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Le présent travail s'articule autour de trois grandes parties :

- ⊕ **La première partie** est consacrée à une revue bibliographique. Elle présente la famille des Fabaceae (légumineuses), leur importance agronomique, écologique et alimentaire, ainsi que leur situation en Algérie. Un accent particulier est mis sur le genre *Medicago L.* et plus spécifiquement sur *M. ciliaris*. Cette partie aborde également les notions de diversité génétique, ses enjeux, et les outils disponibles pour son évaluation, notamment les marqueurs morphologiques et moléculaires.
- ⊕ **La deuxième partie** décrit le matériel végétal utilisé, à savoir les différents écotypes de *M. ciliaris*, ainsi que les méthodes mises en œuvre pour leur caractérisation. Elle détaille les approches expérimentales employées, de l'extraction de l'ADN à l'amplification par PCR, jusqu'à l'analyse électrophorétique des marqueurs microsatellites.
- ⊕ **La troisième partie** présente l'analyse des résultats obtenus, accompagnée de leur interprétation et discussion. Elle met en évidence les variations génétiques intra-populationnelles et inter-populationnelles observées, leur signification biologique, et leur implication dans les programmes de sélection et de conservation. Cette étude se conclut par une synthèse générale et propose des perspectives de recherche futures autour de l'utilisation durable de cette ressource génétique dans les systèmes agro écologiques méditerranéens.

# **Revue Bibliographique**

## **1. Présentation sur les légumineuses**

La famille des Fabacées (ex. Légumineuses) est l'une des plus importantes du règne végétal (Ozenda, 1991), communément appelée fabales, comptent 750 genres et 20000 espèces environ, réparties sur une aire géographique diversifiée (Cronk et al., 2006). Dans l'Algérie on enregistre 53 genres et 339 espèces (Quezel et Santa, 1962).

Les Fabacées regroupent des plantes d'importance économique et agricole comme le soja, les pois, les lentilles, les haricots, le pois chiche, ainsi que des plantes ornementales et forestières telles que la glycine, le mimosa et le palissandre.

Les légumineuses sont des plantes dicotylédones appartenant à la famille des Fabacées (Leguminosae), qui représentent la troisième famille de plantes par le nombre d'espèces référencées après les composées Astéracées et les orchidées. (Schneider et al. 2015).

Elles sont des plantes capables de fixer l'azote atmosphérique grâce à une symbiose avec les bactéries du genre *Rhizobium* présentes sur leurs racines. Cette capacité leur permet d'améliorer la fertilité des sols et de réduire l'utilisation d'engrais azotés, favorisant ainsi une agriculture durable (Mylona et al., 1995 ; Journet et al., 2001).

Elles comptent environ **19 500 espèces** réparties en **765 genres** (Lewis et al., 2005) . Parmi les plus connues figurent le haricot, le pois, la lentille, l'arachide, la luzerne, le trèfle, le soja et le lupin. Avec les graminées, elles constituent l'une des principales familles botaniques utilisées pour l'alimentation humaine et animale (Klein et al., 2014).

Elles sont riches en protéines (20 à 40 % sur graines sèches), en fibres et en micronutriments. Leur profil en acides aminés est complémentaire à celui des céréales, ce qui a permis aux associations céréales-légumineuses de constituer la base de l'alimentation humaine pendant des millénaires (Marie et al.; 2017).

Les légumineuses sont cultivées pour deux grandes filières (Denhartigh et al., 2015) :

- **L'alimentation animale** : représentée par les légumineuses fourragères comme la luzerne, le pois fourrager, le trèfle et le soja.
- **L'alimentation humaine** : incluant les légumineuses à graines telles que les haricots, les lentilles, les pois, les pois chiches et les fèves.

## **Revue Bibliographique**

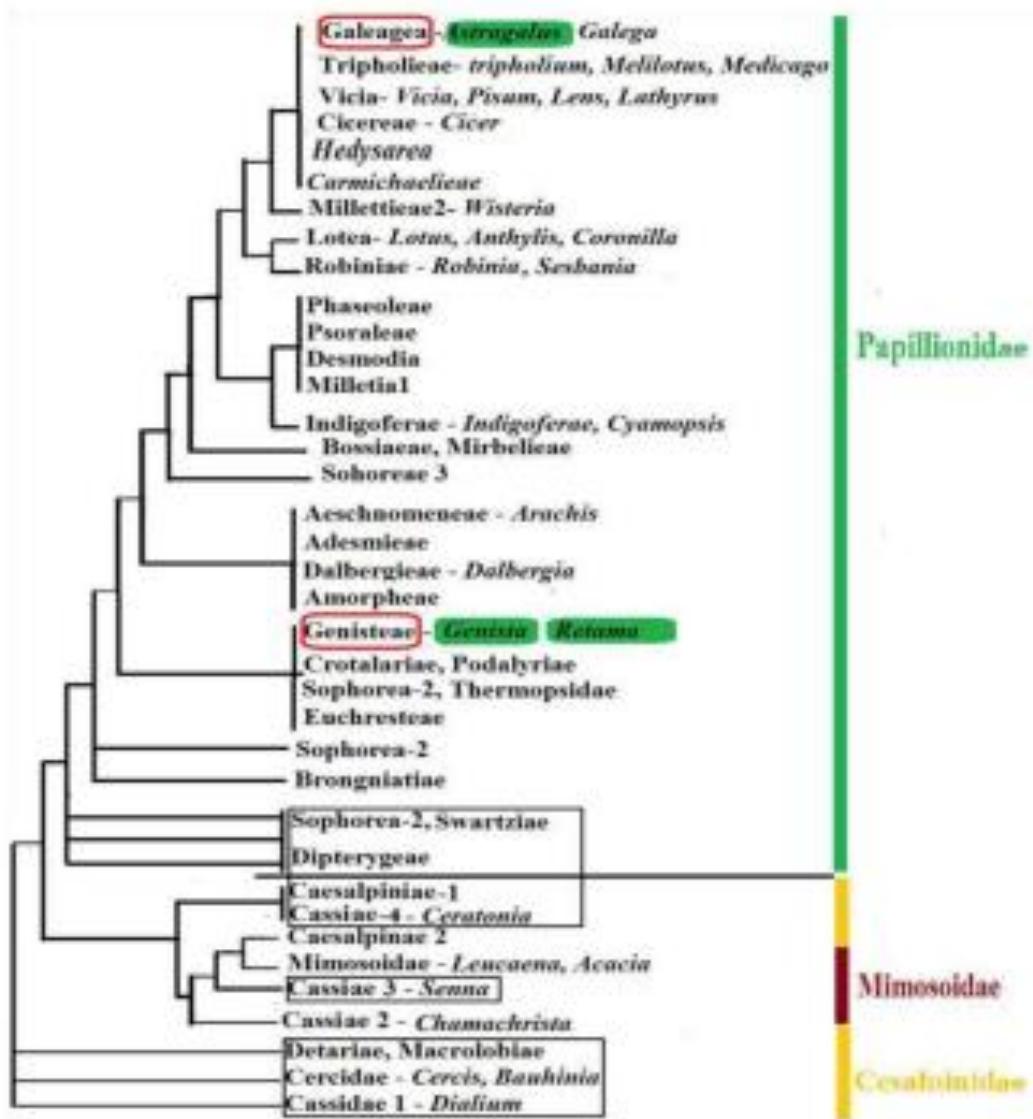
Grâce à leur richesse nutritionnelle et leur rôle dans la durabilité des systèmes agricoles, les légumineuses sont des cultures stratégiques pour l'alimentation mondiale.

Sur la base de leurs caractéristiques florales, les botanistes s'entendent à regrouper ces espèces en trois sous-familles (Doyle, 1994; de Lajudie et al., 1998; Dommergues et al., 1999; Doyle et Luckow 2003).

La sous-famille des Mimosoïdeae, comprend environ 3 000 espèces regroupées dans quelques 77 genres ex : Mimosa ; Acacia(Cannon, 2008).

La sous-famille des Caesalpinoïdeae, considérée comme la plus primitive, regroupe environ 4200 espèces dans quelques 162 genres (Simon, 2005; Cannon, 2008)

La sous-famille Papilioïdeae, d'une évolution plus récente, comprend quelques 14.000 espèces aux fleurs irrégulières, regroupées dans environ 476 genres (Lewis et al., 2003).



**Figure 1 :** Phylogénie des Légumineuse d'après l'analyse des séquences du gène chloroplastique (Doyle et al. 1998 modifiée par Chaich 2018)

### 1.1. Importance des légumineuses

Les légumineuses jouent un rôle clé dans les systèmes de culture en fixant l'azote atmosphérique et en enrichissant le sol grâce à leurs résidus riches en azote. Cette contribution bénéficie aux cultures suivantes, augmentant souvent leurs rendements. Toutefois, cet effet positif ne s'explique pas uniquement par l'apport en azote, d'autres facteurs comme l'amélioration des propriétés physiques et biologiques du sol ou la solubilisation du phosphore interviennent également (Chalck, 1998 ; Chalek, 1998).

L'agriculture algérienne, confrontée au défi de la sécurité alimentaire (FAO, 2009), utilise les légumineuses dans les rotations culturales pour améliorer la fertilité des sols. Malgré leur

importance stratégique comme source de protéines, la production nationale ne couvre qu'un tiers de la consommation (Bouzid, 2017).

Les légumineuses se distinguent par leur capacité à fixer l'azote de l'air grâce à une symbiose avec les bactéries Rhizobium. Cette particularité leur confère des avantages agronomiques majeurs, notamment dans une approche d'agriculture durable. Elles permettent de réduire l'usage des engrains azotés et la consommation d'énergie fossile nécessaire à leur production, leur transport et leur application. De plus, elles contribuent à la diminution des émissions de gaz à effet de serre, en limitant les rejets de protoxyde d'azote ( $\text{NO}_2$ ), un gaz dont le pouvoir de réchauffement est environ 300 fois supérieur à celui du dioxyde de carbone (Mollier, 2014).

Les graines des légumineuses alimentaires, bien que petites, sont très riches en protéines, contenant deux fois plus que le blé et trois fois plus que le riz. Contrairement aux protéines d'origine animale, elles ne contiennent ni résidus d'hormones ni antibiotiques. Elles constituent une excellente source de protéines de qualité (20-45%), riches en acides aminés essentiels, notamment la lysine (Maphosa et Jideani, 2017).

Elles apportent également des glucides complexes, de l'acide folique, du fer, du zinc, du calcium, du magnésium, du potassium, des vitamines B et divers oligo-éléments. En particulier, le pois chiche, la lentille et les fèves ont une faible teneur en matières grasses mais sont riches en fibres. Les minéraux qu'elles contiennent sont essentiels à la croissance et au développement harmonieux de l'organisme.

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

### **2.1. Généralité**

Le genre *Medicago* (les luzernes) est un groupe de plantes dicotylédones appartenant à la famille des Fabaceae (Légumineuses), sous-famille des Faboideae. Originaire de l'Ancien Monde, il regroupe environ une centaine d'espèces reconnues. Ces plantes proches des trèfles sont souvent annuelles ou vivaces et bien que majoritairement herbacées certaines espèces comme *Medicago arborea* peuvent être des petits arbustes. Elles se caractérisent par des feuilles trifoliolées, et plusieurs de leurs espèces sont cultivées pour leur valeur fourragère. L'espèce la plus connue est la luzerne cultivée (*Medicago sativa*), bien que d'autres variétés soient présentes, particulièrement en région méditerranéenne.

Les luzernes possèdent des fleurs généralement jaunes et de petite taille, disposées en racèmes ayant l'apparence de capitules. Ces fleurs se distinguent par leur proximité les unes des autres et la forme particulière de leurs fruits, qui prennent souvent une forme spiralée. En tant

que légumineuses, elles établissent une symbiose avec des bactéries du genre *Rhizobium*, permettant ainsi la fixation de l'azote atmosphérique dans le sol. Cette capacité fait des luzernes les légumineuses les plus performantes dans ce domaine, avec une fixation de plus de 200 unités d'azote par hectare et par an.

L'étymologie du nom scientifique *Medicago* fait référence à l'origine supposée de la plante en Médie, selon les écrits de Théophraste, et n'est pas liée à ses propriétés médicinales. Le nom vernaculaire "luzerne" provient de l'occitan "luserna", un terme qui désigne également une petite lumière ou un ver luisant, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante.

### **2.2. Taxonomie et génétique**

Le genre *Medicago*, auparavant appelé « *Midica* » ou « herbes de médic », fait partie des légumineuses. Il appartient à la famille des Fabaceae, à la sous-famille des Papilionoideae, et à la tribu des Trifolieae. Il est étroitement lié aux genres *Melilotus* et *Trigonella* (Lesins KA et Lesins I., 1979).

Ce genre se situe dans la tribu des Trifolieae, qui inclut la majorité des légumineuses fourragères tempérées, telles que la luzerne cultivée et le trèfle. Il est phylogénétiquement proche de la tribu des *Vicieae*, qui comprend des légumineuses à graines comme le pois (*Pisum sativum*) et la féverole (*Vicia faba*) (Doyle et Luckow 2003 ; Choi et al. 2004). Selon Ernest et al. (1998), le genre *Medicago* compte 86 espèces (annuelles, bisannuelles et vivaces), réparties sur 12 sections et 8 sous-sections.

Le nombre chromosomique de base du genre *Medicago* est généralement  $x = 8$ , à l'exception de quatre espèces annuelles : *M. constricta*, *M. praecox*, *M. polymorpha* et *M. rigidula*, ainsi que certaines formes de *M. murex*, qui présentent un nombre chromosomique de base  $x = 7$ .

Parmi les différentes espèces du genre, trois niveaux de ploïdie existent : les diploïdes ( $2n = 2x = 14$  et  $2n = 2x = 16$ ), qui constituent la majorité des espèces, les tétraploïdes ( $2n = 4x = 32$ ) et les hexaploïdes ( $2n = 6x = 48$ ) (Quiros et Bauchan 1988). La plupart des espèces annuelles sont des diploïdes autogames, tandis que les espèces pérennes sont des tétraploïdes allogames (Négre 1959 ; Heyn 1963 ; Lesins et Lesins 1979 ; Small et Jomph 1989). À l'origine, le genre était probablement diploïde, et les espèces tétraploïdes seraient issues d'un phénomène de non-réduction des gamètes, produisant des plantes vigoureuses et hétérozygotes capables de s'adapter et de coloniser de nouveaux habitats, ce qui a permis au genre *Medicago* d'étendre son aire géographique (Quiros et Bauchan 1988)

### **Position systématique ( Halmi, 2010)**

Règne : *Plantae*

Embranchement : *Spermatophytes*

Sous- embranchement : *Angiospermes*

Classe : *Dicotylédones*

Sous- classe : *Rosidées*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Sous-famille : *Faboideae*

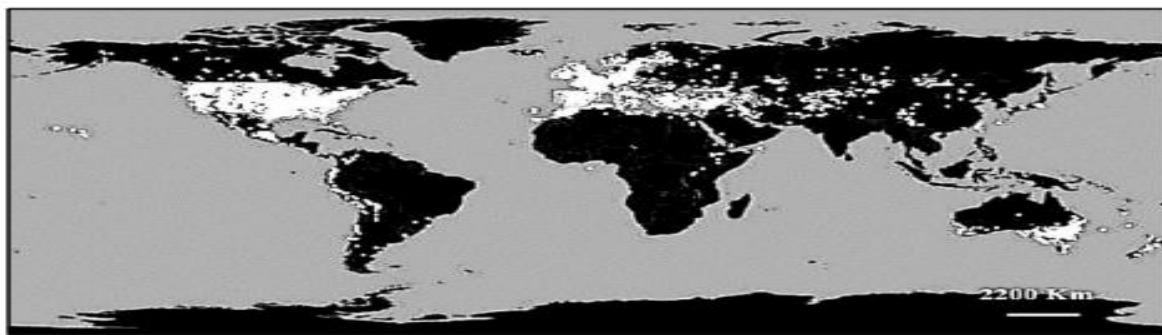
Tribus: *Trifolieae*

Genre: *Medicago* (L.)

### **2.3. L'aire de répartition du genre *Medicago***

Les luzernes annuelles présentent parfois des distributions géographiques restreintes. Certaines espèces sont endémiques, tandis que d'autres ont une tendance colonisatrice. Une étude approfondie de leur répartition a été réalisée grâce à des prospections de matériel spontané menées sur plusieurs années dans l'ensemble du bassin méditerranéen (Prosperi et al. 1993). Les espèces annuelles du genre *Medicago* se rencontrent dans tous les étages bioclimatiques, allant des zones humides aux zones sahariennes. Certaines espèces ont une large aire de répartition, tandis que d'autres présentent une distribution plus restreinte. *M. truncatula* et *M. polymorpha*, présentes dans tous les étages bioclimatiques, sont considérées comme des formes ubiquistes. Un groupe d'espèces comprenant *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. Quant aux espèces pérennes de *Medicago*, elles se rencontrent principalement sur les rives nord de la Méditerranée et s'étendent jusqu'en Asie centrale, avec quelques formes spontanées localisées sur les hauts plateaux des chaînes de l'Atlas en Afrique du Nord. Dans le complexe des espèces pérennes, l'infertilité naturelle entre les différentes formes spontanées contribue au maintien de types distincts (populations naturelles présentant des caractéristiques uniques), un phénomène largement dû à l'isolement géographique.(Medoukali ,2016)

Géographiquement, les espèces pérennes et annuelles du genre *Medicago* n'ont pas la même répartition. Les espèces annuelles se trouvent principalement dans la région méditerranéenne, tandis que les espèces pérennes ont une répartition plus large, étant surtout présentes à l'Est de la Méditerranée et dans les régions centrales et occidentales de l'Asie. ( Medoukali ,2016)



**Figure 2 :** Carte géographique de la distribution de genre *Medicago* dans le monde

(Prolea, 2002)

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

Parmi les espèces du genre *Medicago* présentes en Afrique, environ 16 croissent spontanément dans le nord de l'Algérie, comme le montre le tableau suivant (Hireche, 2006).

**Tableau 1.** Les espèces spontanées du genre *Medicago* rencontrées en Algérie.

Espèces	Caractéristique et aire de répartition en Algérie
<i>M. sativa</i>	Plante vivace rencontré un peu partout
<i>M. falcata</i>	Plante vivace très résistante au froid
<i>M. lupulina</i>	Dite lupuline 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>	Rencontré surtout dans les pâturages et prairies du tell à sol semi salin
<i>M. ciliaris</i>	Plante annuelle très commune dans le tell
<i>M. truncatula</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. littoralis</i>	Plante annuelle comme dans tout le territoire algérien
<i>M. murex</i>	Plante annuelle, est souvent rencontré sur les sols pauvres.
<i>M. minima</i>	Plante annuelle.
<i>M. arabica</i>	Plante annuelle.
<i>M. lanciniata</i>	Plante annuelle.
<i>M. hispida</i>	Plante annuelle.

#### **2.4. Description botanique**

Selon Heyn (1963), toutes les espèces du genre *Medicago* partagent des caractéristiques morphologiques communes :

- ❖ **Feuilles** : Elles sont trifoliées, composées de trois folioles et d'un pétiole inséré à la tige en un point où se trouvent deux stipules incisées. Les folioles peuvent être rondes, obovées, elliptiques, obcordées, ou ovées et présentent des dents émoussées ou pointues. Elles peuvent être poilues sur les faces inférieures et présenter des taches sur les faces supérieures.
- ❖ **Fleurs** : La fleur comprend un calice, une corolle papilionacée, 10 étamines (9+1), et un pistil avec un tube en forme de cloche à 5 dents subégales. L'étandard de la corolle peut être de différentes formes (arrondie, obovée, ovée) avec une extrémité jaune ou violette, tandis que les pétales en forme d'ailes sont généralement jaunes sauf chez *M. sativa* et *M. daghestanica* où ils sont violets.
- ❖ **Inflorescence** : Il s'agit d'une grappe pouvant contenir jusqu'à 20 fleurs dont la couleur varie du mauve au jaune.
- ❖ **Fruits** : Le fruit est une gousse enroulée, en forme de fauille ou spiralée (1 à 4 spires), parfois épineuse. La graine est réniforme, mesurant environ 10 mm, de couleur allant du jaune paille au noir. Les goussettes peuvent être de formes diverses et être poilues ou glabres, avec des épines variées selon les espèces.

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

La luzerne ciliée (*M.ciliaris*), dont le nom dérive du latin *cilium* en raison de l'aspect Description cilié des poils présents principalement sur les goussettes (Small, 2011).

##### **3.1. Morphologique et phénologique de *M.ciliaris***

*M.ciliaris*, espèce herbacée présente une hauteur comprise entre 35 et 55 cm. Ses fleurs sont de couleur jaune, tandis que ses goussettes matures, de forme sphérique à ovale, arborent une teinte allant du gris-jaunâtre au brun clair. Elles sont couvertes de poils multicellulaires et présentent de 9 à 10 spires disposées dans le sens des aiguilles d'une montre (Lesins et Lesins, 1979).

Les graines de *M. ciliaris* sont noir-brunâtre à noires et mesurent environ 4,8 mm de long sur 3 mm de large (Lesins et Lesins, 1979). La présence de taches violettes sur les feuilles demeure un caractère rare au sein de cette espèce (Small et Jomphe, 1989).

les fruits de cette espèce sont des gousses épineuses indéhiscentes, adaptées à une dispersion zoothore, notamment par accrochage aux poils des animaux (Small, 2011).

Concernant son cycle phénologique, *M. ciliaris* fleurit principalement à la fin du printemps et au début de l'été. Les populations issues de zones à fortes précipitations en Algérie tendent à présenter une floraison plus tardive et sur une période plus courte (Yahiaoui et Abdelguerfi, 1999).



**Figure 3:** *M.ciliaris* (L.) All., 1785

([https://www.florealpes.com/fiche\\_medicagociliaris.php](https://www.florealpes.com/fiche_medicagociliaris.php))

### **3.2. Position systématique**

Règne : *Plantae*

Sous- règne : *Tracheobionta*

Division : *Magnoliophyta*

Classe : *Magnoliopsida*

Sous-classe : *Rosidae*

Ordre : *Fabales*

Famille : *Fabaceae*

Genre : *Medicago*

Espèce : *M. ciliaris*

### **3.3. Distribution géographique**

L'Algérie est l'un des pays méditerranéens, voire le seul, où *M. ciliaris* et *M. intertexta* affichent les plus fortes fréquences de présence. En effet, la fréquence de *M. intertexta* y atteint 38 %, un taux relativement élevé comparé aux autres régions de la Méditerranée occidentale. De son côté, *M. ciliaris* est également bien représentée en Algérie, avec une fréquence de 39,6 % (Abdelguerfi, 1978; Abdelguerfi et al., 1988a et 1988b).

*M.ciliaris* est une espèce omni-méditerranéenne largement distribuée des îles Canaries jusqu'à Israël, couvrant ainsi les deux rives de la mer Méditerranée. Selon Lesins et Lesins (1979), cette espèce a été collectée au Liban, en Espagne, en Afrique du Nord ainsi que dans plusieurs îles méditerranéennes, notamment Chypre, Crète, Sicile, Malte et Sardaigne.

### **3.4. Habitat et répartition écologique**

*M.ciliaris* est une espèce caractéristique des environnements humides, tels que les marécages et les sols hydromorphes. Thanopoulos (2007) a signalé sa présence dans divers habitats, notamment les formations de macchie, les prairies ouvertes, les pentes en terrasses abandonnées, les oliveraies ainsi que les abords des routes et des champs cultivés. Cette espèce semble être plus largement répartie que *Medicago intertexta*.

En Algérie, *M. ciliaris* est présente dans les régions semi-arides, sub-humides et humides. Il a été observé que les populations adaptées aux conditions les plus arides ont tendance à fleurir plus précocement (Laouar et Abdelguerfi, 1999). Clarkson et Russell (1976) ont suggéré que les espèces annuelles du genre *Medicago* ne possèdent pas de mécanisme spécifique leur permettant d'échapper à la sécheresse par une floraison précoce. Toutefois, les études de Yahiaoui et Abdelguerfi (1999) montrent que certaines populations de *M. ciliaris* présentent un processus de floraison accéléré une fois initié.

De son côté, *M. intertexta* est associée à des habitats relativement plus mésiques et fertiles que la plupart des autres espèces annuelles du genre *Medicago*. En Algérie, Laouar et al. (2003)

ont étudié l'écologie et la distribution de *M. intertexta* et *M. ciliaris*, révélant que la première est essentiellement restreinte au nord-est du pays, où elle occupe des bioclimats sub-humides et humides. *M. intertexta* y est principalement présente sur des sols pauvres en calcium, à des altitudes généralement inférieures à 250 m. À l'inverse, *M. ciliaris* occupe une aire de distribution plus large et présente une tolérance climatique plus étendue par rapport à *M. intertexta*.

### **3.5. Exigences édaphiques et climatiques**

*M.ciliaris* préfère les sols argileux (Piano et Francis, 1992) et colonise généralement des sols lourds (Heyn, 1963 ; Lesins et Lesins, 1979). En Algérie, cette espèce est principalement observée sur des sols à texture fine à très fine (Abdelguerfi et al., 1988). Elle se développe sur des sols neutres à modérément basiques (Piano et al., 1991 ; Small, 2011) et s'adapte particulièrement au climat méditerranéen hivernal. Son cycle biologique s'achève généralement au début de l'été, avant que l'augmentation des températures ne devienne excessive (Small, 2011). Par ailleurs, *M. ciliaris* nécessite un minimum de 350 mm de précipitations annuelles pour assurer son développement optimal (Piano et Francis, 1992).

### **3.6. Nombre chromosomique de *M.ciliaris***

La morphologie chromosomique de *M.ciliaris* a été brièvement décrite par Fryer (1930), puis étudiée plus en détail par Simon et Simon (1965) ainsi que par Schlarbaum et al. (1984). Ces analyses suggèrent que les paires chromosomiques de *M. ciliaris* seraient ancestrales par rapport à celles de *M. granadensis* et *M. muricoleptis*.

Concernant son nombre chromosomique, plusieurs études ont rapporté un caryotype de  $2n = 16$  (Fryer, 1930 ; Lesins et Lesins, 1979 ; Schlarbaum, 1984 ; Abdelguerfi et al., 1988). Toutefois, Heyn (1956) a signalé un nombre chromosomique de  $2n = 18$  pour cette espèce, indiquant ainsi une possible variabilité cytogénétique.

En outre, la présence d'un chromosome surnuméraire accessoire, également appelé chromosome B, a été rapportée chez *M. ciliaris* par Agarwall et Gupta (1983). Ces résultats suggèrent une certaine hétérogénéité chromosomique au sein de l'espèce, nécessitant des investigations supplémentaires pour clarifier sa structure génomique.

### **3.7. Intérêt de l'espèce étudiée**

En plus de sa qualité nutritive, *M. ciliaris* a la faculté d'améliorer la nitrification des sols salés. Il s'agit d'une plante glycophyte capable de se développer dans des sols légèrement salés en compagnie des halophytes, générant jusqu'à 40 % de la végétation lors des années humides. Selon Ben Salah et ses collaborateurs, *M. ciliaris* est un excellent choix pour l'amélioration des sols dégradés ou marginalisés qui présentent une faible fertilité et/ou une forte salinité, comme c'est le cas pour les 'Sebkha'. Sous des conditions de salinité, les espèces sont en danger et il est impératif d'adopter des mesures urgentes pour sauvegarder ces plantes (Aloui, 2022)

Des recherches ont prouvé que *M.ciliaris* présente une résistance à la sécheresse, étant capable de poursuivre sa croissance même en situation de manque d'eau. L'intégration du biochar dans le sol a aussi démontré des impacts positifs, favorisant l'expansion végétale et l'efficience de la consommation d'eau en temps de sécheresse (Gharred, 2022)

Des recherches ont démontré que *M.ciliaris* présente une importante diversité génétique, notamment en matière de sa résistance au sel. Cette variété est indispensable pour détecter les caractéristiques génétiques qui favorisent la résistance à la salinité, élément clé pour l'évolution de cultures aptes aux sols salins (ABDOUS, 2021)

## **4. La diversité génétique et son importance**

La variabilité génétique entre les individus d'une même espèce constitue une ressource essentielle pour la sélection et l'amélioration des variétés. Cette diversité, appelée ressources génétiques, représente un patrimoine précieux qu'il est nécessaire de préserver et d'étudier pour une meilleure utilisation.

La diversité génétique correspond aux différences présentes au niveau des gènes et reflète la variabilité de l'information génétique au sein des individus, des populations et des espèces. Elle est définie par le degré de similarité ou de divergence dans la composition génétique et constitue la base de la biodiversité (Parizeau, 1997).

La biodiversité englobe non seulement la diversité génétique (variabilité au sein des espèces), mais aussi la diversité des espèces (niveau interspécifique) et celle des écosystèmes (diversité écologique) (Parizeau, 1997). Depuis l'Antiquité, les observations sur le monde vivant ont mis

en évidence cette diversité (Gouyon, 1994). Selon la Convention sur la diversité biologique (PNUE, 1992), elle inclut l'ensemble des organismes vivants, terrestres et aquatiques, ainsi que leurs interactions au sein des écosystèmes.

Cette diversité est dynamique : la composition génétique des espèces évolue au fil du temps sous l'effet de la sélection naturelle et des interventions humaines. Les changements environnementaux influencent la répartition et l'abondance des espèces dans les écosystèmes. Le polymorphisme génétique, ou diversité intraspécifique, constitue un atout majeur pour l'adaptation et l'évolution des organismes, à court et à long terme (Lewin, 1992).

Dans le domaine agricole, la diversité génétique est exploitée pour développer des variétés adaptées aux conditions environnementales et aux besoins humains. Elle permet la sélection de plantes résistantes à la sécheresse, aux inondations, aux sols pauvres, aux ravageurs et aux maladies. De plus, elle contribue à l'amélioration des qualités nutritionnelles et gustatives des cultures. Sans cette diversité, l'adaptation des cultures aux évolutions climatiques et agronomiques serait compromise (Cronk, 2001).

La variabilité génétique peut être analysée à différents niveaux : morphologique, moléculaire et biochimique (Budak et al., 2003).

Chez les végétaux, la diversité ne se limite pas aux espèces sauvages et cultivées, mais s'observe également entre les individus d'une même espèce. Ces ressources génétiques sont la base de la sélection végétale et de l'innovation variétale. Leur collecte, caractérisation et conservation sont indispensables pour assurer la pérennité et l'amélioration des cultures futures (Medoukali, 2016).

### **5. L'étude de la diversité génétique**

Un marqueur génétique correspond à tout marqueur biochimique, chromosomique ou moléculaire permettant de mettre en évidence un polymorphisme. L'identification des différentes formes de polymorphisme chez les espèces contribue à une meilleure compréhension de leur répartition, de leur évolution historique, ainsi que de leurs interactions et coévolutions avec d'autres espèces (De Moraes et al., 2007).

Un marqueur génétique « idéal » doit être polymorphe, car la variabilité constitue la base du travail du généticien. Il doit également être multi-allélique, Co-dominant (l'hétérozygote

exprimant simultanément les caractères des deux parents), non épistatique (son génotype étant lisible à partir de son phénotype, indépendamment des autres loci), neutre (les substitutions alléliques n'ayant aucun effet phénotypique), et insensible aux conditions environnementales (le génotype pouvant être déduit du phénotype, quel que soit le milieu) (De Vienne, 1998).

Selon De Vienne (1998), un marqueur génétique est un élément polymorphe fournissant des informations sur le génotype de l'individu qui le porte, notamment en génétique des populations, ainsi que sur le génotype d'un ou plusieurs loci voisins. Ces applications s'étendent du clonage positionnel à la sélection assistée par marqueurs.

L'étude de la diversité génétique, ou polymorphisme génétique, est étroitement liée aux avancées de la biologie, qui ont permis le développement de divers marqueurs (Khalfallah et Lachelah, 2020). Ces outils offrent l'avantage d'évaluer objectivement la diversité des génomes, indépendamment des conditions environnementales (Ollivier et Foulley, 2013).

### **5.1. Marqueurs morphologiques**

Dans les programmes de sélection végétale, les caractères morphologiques sont les premiers à être examinés. Ils concernent différentes parties de la plante, telles que la longueur des tiges, la surface foliaire ou encore l'initiation de la floraison (Cui et al., 2001; Gomez et al., 2004). Ces caractères sont également utilisés pour évaluer la variabilité au sein et entre les populations. Toutefois, leur nombre est généralement restreint, et ils sont fortement influencés par l'environnement. Malgré ces limites, ils apportent des informations précieuses pour la description et l'identification du matériel biologique (Andersson et al. 2006).

On observe ces indicateurs à toutes les phases de développement de la plante, et typiquement sur un large éventail d'individus. Cependant, de nombreux marqueurs phénotypiques présentent plusieurs désavantages qui rendent leur utilisation complexe. Le phénotype peut fluctuer en fonction du stade physiologique de la plante et il manque d'informations dans le cas d'une sélection hâtive (Adam et Dron, 1993).

### **5.2. Marqueur moléculaires**

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui fournit des informations sur le génotype de l'individu le portant. Il doit être Co-dominant avec une hérédité simple et multi-allélique.

Ainsi, les marqueurs moléculaires font référence au polymorphisme décelé dans la séquence nucléotidique de l'ADN.

L'examen de ce polymorphisme via les méthodes de biologie moléculaire concerne la totalité du génome, qu'il soit traduit en protéine ou pas, et ne dépend pas des conditions environnementales (Langridge et al. 2001). Ils offrent simultanément une analyse précise et immédiate de la diversité génétique des individus tout en facilitant l'élaboration rapide de stratégies de création et de sélection variétale. Ce diagnostic contribue également à la création d'une base de données qui sera utile pour authentifier l'identité des plantes candidates à la multiplication et établir une collection de référence (Khadari et al., 2003).

Les diverses techniques de marquage moléculaire qui sont actuellement disponibles sont :

- Les marqueurs moléculaires AFLP (Amplification Fragment Length Polymorphism)
- Les marqueurs moléculaires RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
- Les marqueurs moléculaires RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)
- les marqueurs Microsatellites ou SSR (Simple sequence repeats)

### **5.3. Marqueurs biochimiques**

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs à avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique. En 1966, deux progrès majeurs, l'un conceptuel et l'autre technologique, ont permis d'explorer pour la première fois la variabilité génétique. D'une part, la variation génétique pouvait être analysée de manière indirecte en étudiant la séquence des acides aminés des protéines codées par les gènes. L'idée fondamentale étant que toute variation dans la séquence des acides aminés reflète une modification dans le gène responsable de cette protéine. D'autre part, l'avancée technologique réside dans le développement de l'électrophorèse des protéines, une méthode permettant de séparer et d'analyser ces protéines (Harry, 2001).

Les isozymes sont utilisés comme marqueurs biochimiques en amélioration des plantes. Ce sont des enzymes exprimées dans les cellules végétales, qui peuvent être extraites et analysées par électrophorèse pour évaluer le polymorphisme enzymatique. Bien que ces marqueurs soient plus efficaces que les marqueurs morphologiques, leur polymorphisme reste relativement faible, notamment chez les génotypes homozygotes (Zhu et al., 1999).

### **5.3.1. Marqueurs enzymatiques**

Les marqueurs iso enzymatiques (nommés ainsi par market et moller, 1959), définissent un polymorphisme biochimique lié aux différentes formes alléliques d'une même enzyme. Chez de nombreuses espèces cultivées, l'utilisation de ces marqueurs iso enzymatiques a joué un rôle important dans la création des cartes génétiques (Marchand, 1999).

Le terme "iso enzyme" désigne les différentes formes moléculaires d'une même enzyme, toutes capables de catalyser la même réaction. Ces variantes présentent des différences de structure, de masse moléculaire ou de point isoélectrique, dues aux variations dans la composition en acides aminés, elles-mêmes liées à la séquence des nucléotides des gènes correspondants. En conséquence, leur mobilité électrophorétique diffère (El Aoufir, 2001).

### **5.3.2. Marqueurs protéiques**

Les protéines consistent en un mélange complexe des protéines extractibles (variable selon le protocole suivi) présente au moment du prélèvement dans les tissus analysés (Prat et al., 2006). La séparation électrophorétique des protéines solubles est couramment utilisée pour mettre en évidence les polypeptides spécifiques à un individu (Riousset, 2001). L'étude de leur polymorphisme a ainsi ouvert une nouvelle voie pour la classification des individus et, de ce fait, pour l'identification et la différenciation des organismes (Prat et al., 2006).

***MATERIEL ET***

***METHODES***

Cette partie est dédiée à la présentation du matériel végétal utilisé dans cette étude ainsi qu'aux l'ensemble des méthodes adoptées.

### **1. Matériel végétal**

L'objectif de notre étude est d'évaluer le niveau de diversité génétique au sein de l'espèce *M.ciliaris* du genre *Medicago*. À cet effet, nous avons analysé des graines matures provenant de 20 accessions de cette espèce, collectées dans 20 sites écogéographiques distincts situés dans le nord de l'Algérie (Figure 4).

Un total de 20 accessions de l'espèce *M.ciliaris* ont été examinées dans cette étude. Ces accessions ont été collectées à partir de gousses provenant entre le 15 mai et le 15 juillet 2013, s'étendant des régions côtières aux montagnes du Tell Atlas. Les sites de collecte ont été décrits en fonction de plusieurs paramètres : altitude (ALT), latitude (LAT), longitude (LON), précipitations annuelles moyennes (Pm), température minimale moyenne du mois le plus froid (Tm) et température maximale moyenne du mois le plus chaud (TM), comme indiqué dans le **Tableau 2**.

Cette collection couvre une large gamme de stades bioclimatiques, allant de l'humide à l'aride, et les sites subissent diverses contraintes abiotiques (**Tableau 2**).



**Figure 4.** Localités géographiques des 20 espèces du genre *M.ciliaris* colletées dans le Nord Algérien.

**Tableau 2:** Origines géographiques des 20 accessions étudiées, avec les paramètres éco géographiques correspondants.

## Matériel et Méthodes

N°	Region	Provenance	ALT	LAT	LON	Pm	Tm	TM	Q2
<b>MC1</b>	Mila	Oued Athmenia	757	36°16'17,87"N	6°16'36,31"E	568	2,5	31,3	67,65
<b>MC2</b>	Mila	Bab Trouche	831	36°21'31,41"N	6°19'27,41"E	742	4,4	31,1	95,32
<b>MC3</b>	Constantine	Beni Hemiden	429	36°31'04,89"N	6°33'52,68"E	704	3,2	31,4	85,63
<b>MC4</b>	Constantine	Chaabet ersas	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624	3,3	32	74,58
<b>MC5</b>	Constantine	Chaabet ersas 2	584	36°20'20,08"N	6°37'27,04"E	624	3,3	32	74,58
<b>MC6</b>	Sidi Belabbes	-	465	35°14'20,82"N	0°37'03,24"E	450	4,8	29,7	61,99
<b>MC7</b>	Bouira	Akhdiria	144	36°34'38,26"N	3°33'16,25"E	711	5,9	31,9	93,80
<b>MC8</b>	Alger	El madania	120	36°44'43,41"N	3°04'10,22"E	707	8,1	28,5	118,87
<b>MC9</b>	Alger	Mohamadia	3	36°44'21,62"N	3°08'50,41"E	670	7,6	29,8	103,52
<b>MC10</b>	Blida	-	70	36°32'48,32"N	2°48'23,72"E	791	7	30,9	113,52
<b>MC11</b>	Ain Defla	1	396	36°15'41,71"N	2°17'55,96"E	593	6	33,5	73,96
<b>MC12</b>	Ain Defla	2	257	36°09'57,25"N	1°43'25,04"E	593	6	33,5	73,96
<b>MC13</b>	Ain Defla	3	382	36°18'58,41"N	2°25'46,37"E	593	6	33,5	73,96
<b>MC14</b>	Relizane	-	58	35°56'37,06"N	0°51'00,37"E	348	6,8	31,1	49,12
<b>MC15</b>	Chlef	-	135	36°14'45,30"N	1°14'17,86"E	405	6,6	32,6	53,43
<b>MC16</b>	Mascara	-	281	35°30'09,15"N	0°05'30,19"O	368	7,5	29	58,71
<b>MC17</b>	Medea	-	385	36°20'33,96"N	2°46'04,83"E	736	2,5	30,6	89,84
<b>MC18</b>	Tissemsilt	-	575	36°00'36,95"N	2°09'11,39"E	609	1,1	30,1	72,03
<b>MC19</b>	Guelma	-	798	36°22'08,93"N	7°13'59,93"E	564	1,9	32,1	64,06
<b>MC20</b>	Béjaïa	Akbou	207	36°30'03,58"N	4°34'28,30"E	659	6,2	31,3	90,05

## 2. Méthodes d'étude

### 2.1. Analyse morphologique

Un total de 20 accessions de **M.ciliaris** ont été évaluées à l'aide de mesures morphologiques, réalisées à l'aide d'un cadran-micromètre avec une précision de 0,01 mm. Pour

chaque accession, douze caractères quantitatifs liés aux graines, aux gousses et aux cotylédons, tels que décrits par Issolah et Abdelguerfi (1999), ont été analysés :

**Caractéristiques mesurées :**

**Gousses :**

Longueur (LP)

Largeur (WP)

Nombre de graines par gousse (SP)

**Graines :**

Longueur (LS)

Largeur (WS)

Poids de 30 gousses (WTP)

Poids de mille graines (WTS)

Rapport poids des graines / poids des gousses (RW)

**Semis :**

Date d'émergence des cotylédons (DCOT)

Longueur de la première feuille (LGFT6)

Largeur de la première feuille (LRFT6)

SFT6 : Surface de la première feuille, ( $SFT6 = LGFT6 \times LRFT6$ )

Le **DCOT** a été mesuré à partir du moment où les semis ont été placés sous la lumière. La LGFT6, LRFT6 et SFT6 ont été mesurées après six jours de germination.

Cette méthodologie permet d'évaluer la variabilité morphologique des accessions de **M.ciliaris**, fournissant des informations essentielles pour la sélection et l'amélioration de cette espèce.

## **2.2. Analyse moléculaire**

Dans cette analyse nous avons déterminé la diversité génétique des 16 accessions de l'espèce *M. Ciliaris*.

### **2.2.1. Préparation des échantillons**

Les graines matures de chaque individu ont été extraites des gousses, puis soumises à une scarification suivie d'une stérilisation à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 3 % (v/v). Elles ont ensuite été imbibées pendant une nuit. Les graines ainsi stérilisées ont été

mises à germer dans l'obscurité pendant deux jours, dans des boîtes de Pétri contenant un milieu d'eau agar à 1 % (w/v), à température ambiante. Par la suite, elles ont été exposées à la lumière du jour pendant 10 jours. Les jeunes feuilles obtenues (0,3 g par échantillon) ont été broyées en poudre très fine à l'aide d'azote liquide, puis conservées à -20 °C en vue de l'extraction de l'ADN.

### **2.2.2. Analyse SSR**

L'ADN génomique total a été isolé selon le protocole au bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB) décrit par Doyle et Doyle (1990).

La qualité de l'ADN extrait a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % (Annexe 3). La concentration de l'ADN a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), puis les échantillons ont été dilués à une concentration finale de 50 ng/μl pour les réactions de PCR. Cinq paires d'amorces SSR ont été initialement testées. Sur la base des résultats préliminaires, deux paires ont été sélectionnées en raison de la qualité d'amplification des fragments obtenus.

**Tableau 3.** Séquence et groupe de liaison de cinq amorces de microsatellites testées.

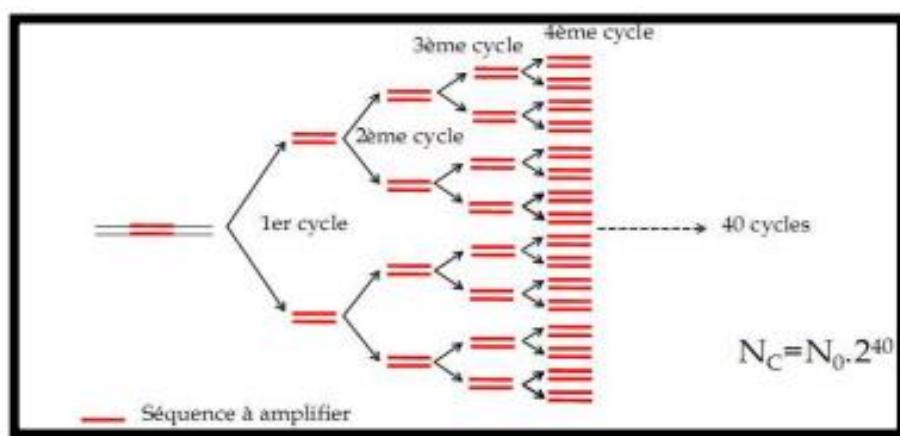
Primer	linkage group	motif	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
AFctt1*	4	(CTT)9(CAA)3	CCCATCAACATTTCA	TTGTGGATTGGAACGAGT
AFctt11	7	(CT) <sub>12</sub>	GGACAGAGCAAAAGAAT	TTGTGTCAAAGAACAGGAA
AFctt32*	3	(CT) <sub>14</sub>	TTTTGTCCCACCTTAG	TTGGTTAGATTCAAAGGGTTAC
AFca1	4	(CT)4(CA) <sub>10</sub>	CGTATCAATATCGGGCAG	TGTTATCAGAGAGAGAAAGCG
AFca11	6	<u>(CA)11</u>	CTTGAGGGAA <u>CTATTGTTGAGT</u>	AACGTTCCAAA <u>ACATACTT</u>

### **2.2.3. Amplification *in vitro* de l'ADN par PCR**

#### **a) Principe**

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne), mise au point en 1985 par Kary Mullis, est une technique permettant d'amplifier *in vitro* un fragment spécifique d'ADN double brin. Cette amplification cible une région située entre deux séquences connues, grâce à l'action d'une

enzyme, la Taq polymérase, issue de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*. Le processus repose sur l'utilisation de deux amorces oligonucléotidiques, complémentaires des extrémités 3' de chacun des deux brins d'ADN. L'une des amorces se fixe sur le brin sens, l'autre sur le brin antisens, encadrant ainsi la séquence à multiplier. Cette méthode permet d'obtenir des millions de copies du fragment ciblé.

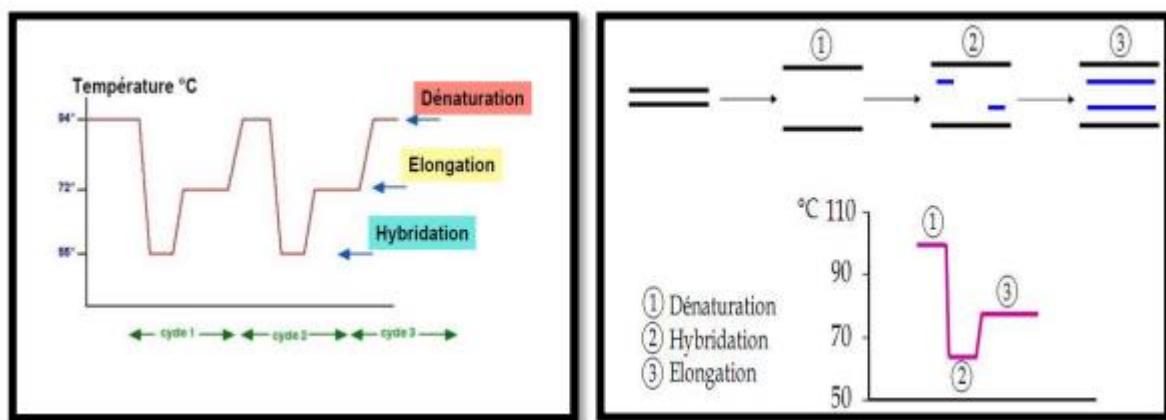


**Figure 5 :** La PCR, une amplification exponentielle (Corinne.S, 2012)

Cette amplification comprend 03 phases :

1. La première étape consiste en une phase de dénaturation de l'ADN double brin, réalisée à 95 °C. Cette température élevée permet de séparer les deux brins complémentaires, les transformant en brins simples qui serviront ensuite de matrices pour la synthèse de nouveaux brins d'ADN.
2. La phase d'hybridation, qui dure généralement entre 2 et 60 secondes à une température comprise entre 56 et 64 °C, permet aux amorces sens et antisens de se fixer spécifiquement aux brins simples d'ADN. Cette température est choisie de manière à favoriser thermodynamiquement l'appariement des amorces avec leurs séquences complémentaires. Présentes en large excès, les amorces s'hybrident rapidement dès qu'elles rencontrent la région cible correspondante.
3. La phase d'elongation se déroule à 72 °C et est assurée par la Taq polymérase, une ADN polymérase thermostable. Cette enzyme prolonge les amorces en synthétisant un nouveau brin d'ADN complémentaire dans le sens 5' vers 3'. Elle incorpore pour cela des désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dTTP) en suivant la séquence du brin matrice.

La PCR débute par une **étape de dénaturation initiale**, généralement effectuée à 95 °C pendant 10 à 15 minutes. Cette étape permet de séparer les brins d'ADN double brin, de dissocier les structures secondaires, d'homogénéiser le mélange réactionnel grâce à l'agitation thermique, d'activer les polymérases à démarrage à chaud (« *Hot Start* »), et de dénaturer d'éventuelles enzymes résiduelles comme la transcriptase inverse ou l'uracil-N-glycosylase.



**Figure 6 : étapes de PCR (Corinne.S, 2012)**

### b) Condition d'amplification

L'amplification a été réalisée dans un volume final de 20 µl. Le mélange réactionnel comprenait :

- 3 µl d'ADN génomique (concentration : 50 ng/µl),
- 2,4 µl d'un mélange de dNTPs (2,5 mM pour chacun des quatre nucléotides),
- 3 µl de tampon de réaction 10x,
- 1,2 µl de solution de MgCl<sub>2</sub> (25 mM),
- 1,8 µl de chaque amorce (amorce sens et antisens, à 10 µM),
- 0,3 µl d'ADN polymérase Taq (Thermo Scientific, 2,5 U).

La réaction PCR a été effectuée selon le programme thermique suivant :

- une dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes
- suivie de 35 cycles comprenant :

Une dénaturation à 94 °C pendant 45 secondes, une hybridation à 55 °C pendant 45 secondes, une élongation à 72 °C pendant 1 minute.

- enfin une élongation finale à 72 °C pendant 10 minutes.

**c) Test d'amplification**

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide non dénaturant à 8 % (10 µl par puits), préparé avec un rapport acrylamide/bis-acrylamide de 29:1, en utilisant un tampon TBE 0,5X.

Un marqueur de taille (DNA Ladder) a également été chargé sur le gel afin de permettre l'estimation de la taille des fragments d'ADN amplifiés.

L'électrophorèse a été réalisée à une tension constante de 175 V pendant environ 2 h 30 min à 4 °C, puis le gel a été coloré dans une solution de bromure d'éthidium pendant 5 minutes pour révéler les fragments d'ADN.

**2.3. Analyse statistique**

Les caractères morphologiques des 20 accessions ont été analysés à l'aide d'une analyse en composantes principales (ACP). La moyenne, l'écart type (s.d.) et le coefficient de variation (CV) ont également été calculés pour chacun de ces caractères.

La corrélation entre la variabilité morphologique et le bioclimat a été examinée par une autre ACP comprenant les paramètres écologiques les plus importants (Alt., Pm, Tm, TM et Q2).

Les profils électrophorétiques ont été comparés en analysant la mobilité des bandes observées. L'ensemble des analyses a conduit à l'élaboration d'une matrice de similarité par paires, permettant le calcul des distances génétiques à l'aide de l'indice de Jaccard (Jaccard, 1908). À partir de ces distances, une classification hiérarchique a été réalisée selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), en utilisant le logiciel XLSTAT, version 2016.02.28451 - Début : 05/05/2025 .

*Résultats*

*Et*

*Discussion*

## **Résultats et Discussion**

Notre étude porte sur l'analyse de la diversité génétique de 20 accessions de l'espèce *M.ciliaris*, en utilisant des marqueurs morphologiques (caractéristiques biométriques) et moléculaires (microsatellites). Les approches employées incluent des méthodes moléculaires basées sur l'amplification in vitro de fragments spécifiques d'ADN par la technique de PCR, ainsi que la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

### **1. Analyse de la diversité morphologique**

Une analyse en composantes principales a été réalisée afin de comparer les caractéristiques biométriques des 20 accessions. Une seconde ACP a permis d'examiner la corrélation entre la variabilité morphologique et les conditions bioclimatiques, en tenant compte des principaux paramètres écologiques (Alt., Pm, Tm, TM et Q2). Les résultats de cette étude ont révélé une relative divergence des caractéristiques biométriques des 16 accessions, influencées par les facteurs environnementaux et climatiques, tout en identifiant les critères morphologiques les plus discriminants (**Tableau 4**).

**Tableau 4.** Données descriptives des caractères morphologiques et des paramètres écologiques des 16 populations de *M. ciliaris*

N	Accessions	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LFL	BFL	AFL	Alt	Pm	Tm	TM	Q2
1	<b>Mc1</b>	11,23		5,09	8	4,27	2,45	10,77	2,12	3	8,22	4,94	40,61	757	568	2,5	31,3	67,65
2	<b>Mc2</b>	11,75	13,95	6,01	5	4,51	2,67	12,13	2,02	3	10,80	6,36	68,69	831	742	4,4	31,1	95,32
3	<b>Mc3</b>	10,77	13,20	6,60	5	4,46	2,46	13,88	2,10	4	14,75	6,41	94,55	429	704	3,2	31,4	85,63
4	<b>Mc5</b>	11,45	12,61	6,40	9	4,81	2,66	12,69	1,98	3	9,27	6,17	57,20	2584	624	3,3	32	74,58
5	<b>Mc6</b>	11,92	14,04	5,79	9	4,52	2,70	14,27	2,46	4	10,43	4,99	52,05	465	450	4,8	29,7	61,99
6	<b>Mc7</b>	13,05	14,83	7,41	9	4,69	2,77	11,79	1,59	1	5,24	2,72	14,25	144	711	5,9	31,9	93,8
7	<b>Mc9</b>	12,99	15,53	7,24	7	4,35	2,69	15,64	2,16	4	8,78	4,07	35,73	3	670	7,6	29,8	103,52
8	<b>Mc10</b>	13,18	12,57	7,05	6	4,46	2,54	11,05	1,57	2	7,91	4,95	39,15	70	791	7	30,9	113,52
9	<b>Mc11</b>	12,91	11,28	6,62	8	4,47	2,61	14,57	2,20	4	9,16	3,96	36,27	396	593	6	33,5	73,96
10	<b>Mc12</b>	13,28	12,17	5,50	8	4,77	2,81	12,89	2,34	4	13,36	6,80	90,85	257	593	6	33,5	73,96
11	<b>Mc13</b>	12,77	12,82	7,90	6	4,96	2,74	13,21	1,67	3	11,22	5,85	65,64	382	593	6	33,5	73,96
12	<b>Mc14</b>	12,08	11,96	7,89	8	4,08	2,33	12,72	1,61	3	9,81	5,87	57,58	58	348	6,8	31,1	49,12
13	<b>Mc16</b>	6,89	10,22	1,95	5	3,71	2,37	9,68	4,96	3	7,23	5,15	37,23	281	368	7,5	29	58,71
14	<b>Mc17</b>	10,82	11,45	5,16	7	4,57	2,43	10,85	2,10	4	9,30	5,23	48,64	385	736	2,5	30,6	89,84
15	<b>Mc19</b>	10,87	10,77	4,98	6	4,24	2,46	10,79	2,17	2	10,43	4,02	41,93	798	564	1,9	32,1	64,06
16	<b>Mc20</b>	11,72	14,60	4,79	6	5,37	2,97	12,78	2,67	2	11,29	5,47	61,76	207	659	6,2	31,3	90,05

## **Résultats et Discussion**

D'après les résultats obtenus (tableau ci-dessus), la **surface de la première feuille (AFL)** s'est révélée être la caractéristique la plus variable parmi les 16 accessions de *M. ciliaris*, avec une moyenne de **52,63 mm<sup>2</sup>** et un **coefficient de variation de 39,52 %**, indiquant une forte hétérogénéité. Les valeurs extrêmes allaient de **14,25 mm<sup>2</sup>** (Mc7) à **94,55 mm<sup>2</sup>** (Mc3), ce qui traduit une diversité phénotypique importante au niveau de cette caractéristique.

En second lieu, la **longueur de la première feuille (LFL)** a également montré une variabilité marquée avec une moyenne de **9,83 mm**, un écart-type de **2,28 mm** et un **CV de 23,30 %**. Les valeurs les plus élevées ont été enregistrées chez Mc3 (14,75 mm) et Mc12 (13,36 mm), tandis que la plus faible a été notée chez Mc7 (5,24 mm), ce qui pourrait être en lien avec les conditions agro climatiques des zones d'origine.

Le **poids de 1000 graines (WTP)** présente aussi une variation significative avec une moyenne de **6,02 g**, un écart-type de **1,49 g**, et un **CV de 24,78 %**. La valeur maximale (7,90 g) a été observée chez Mc13 et Mc14, alors que la valeur minimale (1,95 g) a été enregistrée chez Mc16, montrant une différence nette dans le potentiel de production de semences entre les accessions.

Le **nombre de graines par gousse (SP)** varie de **5 à 9**, avec une moyenne de **7 graines** et un **CV de 21,58 %**. Les accessions Mc5, Mc6 et Mc7 ont montré les valeurs les plus élevées (9 graines), indiquant une bonne productivité, tandis que Mc2, Mc3, Mc16 affichent des valeurs moindres (5 graines).

Concernant la **longueur (LP)** et la **largeur (WP)** des gousses, les moyennes respectives sont de **11,73 mm** et **12,79 mm**, avec des variations modérées (CV respectifs de 13,34 % et 11,74 %). Les plus longues gousses ont été observées chez Mc12 (13,28 mm), tandis que les plus larges sont notées chez Mc9 (15,53 mm). Ces différences peuvent être liées à des adaptations écologiques spécifiques.

Le **rapport largeur/longueur (RW)** présente une forte variabilité avec un CV de **35,51 %**, traduisant une grande diversité morphologique des gousses. La valeur maximale (4,96) est notée chez Mc16, tandis que la valeur minimale (1,57) est enregistrée chez Mc10.

La **date d'émergence des cotylédons (DCOT)** varie de 1 à 4 jours, avec une moyenne de 3 jours, et un **CV de 30,32 %**. Cette variation peut être attribuée à des différences génétiques affectant la vitesse de germination.

## **Résultats et Discussion**

Les autres caractères mesurés, comme la **longueur (LS)** et la **largeur (WS)** des graines, ainsi que le **temps de maturité (Tm et TM)**, montrent des coefficients de variation plus faibles (entre 6 % et 13 %), ce qui indique une certaine stabilité entre les accessions pour ces traits.

**Tableau 5.** Moyenne, écart type et coefficient de variation des 12 traits analysés pour les 16 accessions de *M.ciliaris*

Variable	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type	CV (%)
<b>LP (mm)</b>	6,89	13,28	11,73	1,56	13,34
<b>WP (mm)</b>	10,22	15,53	12,79	1,50	11,74
<b>WTP (g)</b>	1,95	7,90	6,02	1,49	24,78
<b>SP</b>	5	9	7	1,49	21,58
<b>LS (mm)</b>	3,71	5,37	4,51	0,37	8,33
<b>WS (mm)</b>	2,33	2,97	2,60	0,17	6,81
<b>WTS (g)</b>	9,68	15,64	12,48	1,61	12,97
<b>RW</b>	1,57	4,96	2,23	0,79	35,51
<b>DCOT (Jours)</b>	1	4	3	0,92	30,32
<b>LFL (mm)</b>	5,24	14,75	9,83	2,28	23,30
<b>BFL (mm)</b>	2,72	6,80	5,19	1,08	21
<b>AFL (mm2)</b>	14,25	94,55	52,63	20,80	39,52

### **1.1. Analyse en composantes principales des caractères biométriques (ACP)**

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur douze caractères quantitatifs. L’interprétation des résultats révèle que la majorité de l’information est capturée par les deux premiers axes factoriels. Le plan défini par F1 et F2 concentre à lui seul 63,93 % de la variance totale, répartie entre 36,12 % pour la première composante (F1) et 27,81 % pour la deuxième (F2).

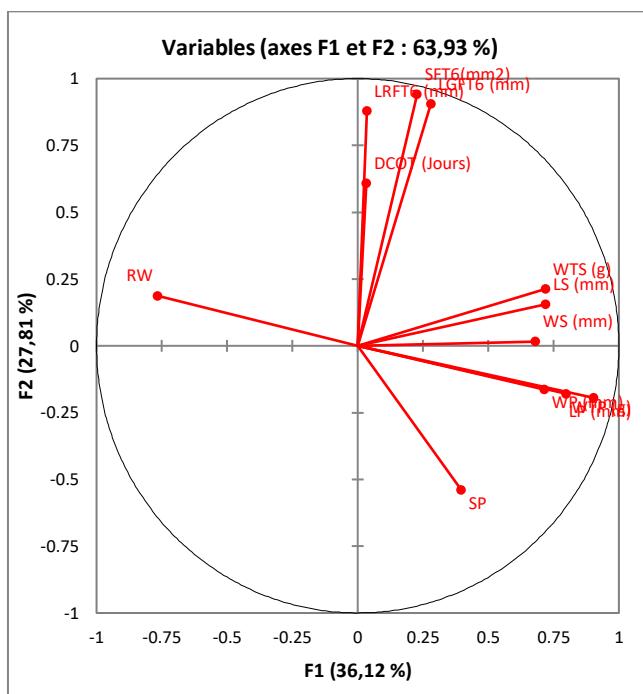
Les projections des variables sur ce plan montrent que plusieurs traits sont fortement et positivement corrélés à F1. Il s’agit notamment de la longueur (LP) et la largeur (WP) des gousses, du poids de 30 gousses (WTP), du poids de 1000 graines (WTS), de la longueur (LS) et de la largeur (WS) des graines. Ces variables participent significativement à la formation de

## Résultats et Discussion

l'axe F1. En revanche, le caractère RW (rapport poids des graines / poids des gousses) y est négativement corrélé.

La composante F2 est principalement définie positivement par la largeur (LRFT6), la longueur (LGFT6) et surface (SFT6) de la première feuille, tandis que la date d'émergence des cotylédons (DCOT) y est fortement et positivement corrélée, contribuant ainsi fortement à la structuration de cet axe. Le caractère SP (nombre de graines par gousse) est, quant à lui, modérément corrélé négativement à F2.

Cette organisation des variables sur les deux premiers axes met en évidence des regroupements de traits morphologiques cohérents, facilitant l'interprétation de la diversité phénotypique observée.



**Figure 7.** Analyse en composantes principales de douze caractéristiques morphologiques.

### **1.2. L'analyse des corrélations entre les caractères quantitatifs**

L'analyse de la matrice de corrélation a mis en évidence des liaisons significatives entre plusieurs caractères quantitatifs étudiés (Tableau 6). Une forte corrélation négative a été observée pour le caractère RW, qui est inversement corrélé à la majorité des autres variables, notamment au **poids de 30 gousses (WTP)** ( $r = -0,875$ ), à la **longueur des gousses (LP)** ( $r = -$

## **Résultats et Discussion**

0,824) et au **nombre de graines par gousse (SP)** ( $r = -0,407$ ). Cela souligne le comportement distinct de ce caractère dans la structuration phénotypique des individus.

La **longueur des gousses (LP)** montre une forte corrélation positive avec le **poids de 30 gousses (WTP)** ( $r = 0,814$ ), indiquant que les gousses plus longues tendent à être plus lourdes. Elle est aussi modérément corrélée avec la **longueur (LS)** ( $r = 0,535$ ) et la **largeur (WS)** ( $r = 0,530$ ) des graines.

La **largeur des gousses (WP)** est fortement corrélée à la **largeur des graines (WS)** ( $r = 0,650$ ) et modérément à la **longueur des graines (LS)** ( $r = 0,498$ ). Ces résultats montrent une cohérence morphologique entre les dimensions des gousses et celles des graines.

En ce qui concerne la biomasse, le **poids de 1000 graines (WTS)** est corrélé de manière significative avec plusieurs traits : le **poids de 30 gousses (WTP)** ( $r = 0,567$ ), la **largeur des gousses (WP)** ( $r = 0,542$ ), ainsi que la **longueur (LGFT6)** ( $r = 0,386$ ) et la **surface (SFT6)** ( $r = 0,254$ ) de la première feuille.

Les caractères liés aux feuilles, notamment **LGFT6**, **LRFT6** et **SFT6**, présentent entre eux des corrélations très fortes, en particulier entre **SFT6 et LGFT6** ( $r = 0,939$ ), ainsi qu'entre **SFT6 et LRFT6** ( $r = 0,893$ ), ce qui indique une cohérence interne dans la morphologie foliaire.

Enfin, la **date d'émergence des cotylédons (DCOT)** est positivement corrélée à la **largeur de la première feuille (LRFT6)** ( $r = 0,422$ ), à **LGFT6** ( $r = 0,497$ ), et à **SFT6** ( $r = 0,463$ ), suggérant que les plantes émergentes plus tardivement tendent à développer des feuilles plus grandes.

La matrice de corrélation révèle des relations significatives entre les différentes variables morphologiques et biométriques étudiées. La **longueur des gousses (LP)** est fortement corrélée positivement avec la **largeur des gousses (WP)** ( $r=0,514$ ), le **poids de 30 gousses (WTP)** ( $r=0,814$ ), ainsi que les dimensions des graines, notamment leur longueur (LS) et largeur (WS) ( $r=0,535$  et  $0,530$  respectivement). En revanche, LP présente une **corrélation négative marquée avec RW** ( $r=-0,824$ ), indiquant une relation inverse entre ces deux paramètres.

De plus, le **poids d'un millier de graines (WTS)** est positivement corrélé avec plusieurs paramètres, notamment WP ( $r=0,542$ ), LS ( $r=0,323$ ) et WS ( $r=0,437$ ), ce qui suggère que des graines plus volumineuses sont généralement plus lourdes. À l'inverse, RW présente des

## Résultats et Discussion

**corrélations négatives significatives avec WP ( $r=-0,378$ ), WTP ( $r=-0,875$ ) et SP ( $r=-0,407$ ), soulignant un effet contrasté sur la production de graines et leur poids.**

Concernant l'**aire de la première feuille (SFT6)**, elle est fortement corrélée avec **la longueur (LGFT6) et la largeur (LRFT6) de cette feuille** ( $r=0,939$  et  $r=0,893$  respectivement), ce qui montre une forte interdépendance entre ces dimensions. La **date d'émergence des cotylédons (DCOT)** est faiblement corrélée avec la majorité des paramètres, bien qu'une **corrélation positive modérée avec WTS ( $r=0,506$ )** ait été observée.

Ces résultats mettent en évidence des relations complexes entre les caractères morphologiques et biométriques, facilitant ainsi l'identification des traits les plus influents dans l'analyse de la diversité génétique des accessions étudiées

**Tableau 6.** Matrice de corrélations entre les différents caractères morphologiques des 16 accessions étudiés en se basant sur les données des morphologique.

Variable	LP (mm)	WP (mm)	WTP (g)	SP	LS (mm)	WS (mm)	WTS (g)	RW	DCOT (Jours)	LGFT6 (mm)	LRFT6 (mm)	SFT6 (mm <sup>2</sup> )
LP (mm)	1											
WP (mm)	0,514	1										
WTP (g)	0,814	0,454	1									
SP	0,477	0,224	0,382	1								
LS (mm)	0,535	0,498	0,308	0,078	1							
rWS (mm)	0,530	0,650	0,190	0,143	0,839	1						
WTS (g)	0,558	0,542	0,567	0,238	0,323	0,437	1					
RW	-	-	-	-	-	-	-	-	1			
	0,824	0,378	0,875	0,407	0,414	0,170	0,319					
DCOT	-	-	-	-	-	-	0,506	0,141	1			
(Jours)	0,041	0,130	0,036	0,044	0,159	0,167						
LGFT6 (mm)	0,091	-	-	-	0,321	0,161	0,386	-	0,497	1		
		0,000	0,065	0,387				0,105				
LRFT6 (mm)	-	-	-	-	0,181	-	0,035	0,051	0,422	0,723	1	
	0,126	0,137	0,072	0,364		0,006						
SFT6 (mm <sup>2</sup> )	0,032	-	-	-	0,306	0,135	0,254	-	0,463	0,939	0,893	1
		0,013	0,042	0,377				0,066				

### 1.3. Corrélation entre les caractéristiques morphologiques et les paramètres écologiques

## **Résultats et Discussion**

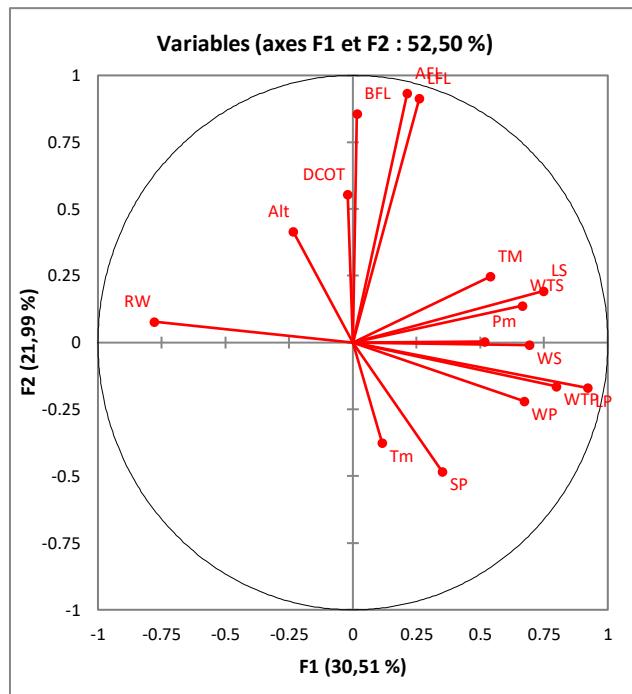
Dans le but d'évaluer les relations entre les caractères morphologiques étudiés et les conditions bioclimatiques, une **nouvelle analyse en composantes principales (ACP)** a été réalisée, intégrant à la fois les variables morphométriques et cinq paramètres écologiques : l'altitude (Alt), les précipitations moyennes (Pm), la température moyenne annuelle (Tm), la température maximale (TM) et le deuxième trimestre de l'indice d'aridité (Q2). Un graphique bidimensionnel (Figure 8) a été généré à partir des deux premiers axes principaux, qui expliquent ensemble **52,50 % de la variance totale**, répartie entre **30,51 % pour le premier axe et 21,99 % pour le deuxième**.

Les projections des variables sur ce plan montrent que plusieurs traits sont fortement et positivement corrélés à F1. Il s'agit notamment de la longueur (LP) et la largeur (WP) des gousses, du poids de 30 gousses (WTP), du poids de 1000 graines (WTS), de la longueur (LS) et de la largeur (WS) des graines et de la TM et Pm . Ces variables participent significativement à la formation de l'axe F1. En revanche, le caractère RW (rapport poids des graines / poids des gousses) y est négativement corrélé.

La composante F2 est principalement définie positivement par la largeur (LRFT6), la longueur (LGFT6) et surface (SFT6) de la première feuille, . En revanche, SP et Tm ont négativement corrélé.

tandis que la date d'émergence des cotylédons (DCOT) et Alt y ont une correlation modere.

Cette organisation des variables sur les deux premiers axes met en évidence des regroupements de traits morphologiques cohérents, facilitant l'interprétation de la diversité phénotypique observée.



**Figure 8.** Analyse en composantes principales des caractères biométriques et leur relation avec les paramètres écologiques.

#### 1.4. L'analyse des corrélations entre les caractères morphologiques et les cinq paramètres écologiques

L'analyse de la matrice de corrélation révèle des liens importants entre les caractères morphologiques de *M.ciliaris*, ainsi qu'entre ces caractères et les facteurs écologiques du milieu d'origine des accessions (tableau 7).

En premier lieu, on observe une **forte corrélation positive** entre la **longueur de la plantule (LP)** et le **poids total de la plantule (WTP)** avec  $r=0,814$ , ce qui signifie que les plantules les plus longues sont aussi celles qui accumulent le plus de biomasse. De même, la **largeur de la plantule (WP)** est fortement liée au **poids sec (WS)** ( $r=0,650$ ), confirmant une cohérence entre la croissance en surface et la matière sèche produite. Ces relations traduisent une dynamique de croissance homogène et équilibrée chez les accessions les plus vigoureuses.

En parallèle, une **très forte corrélation** est également notée entre la **longueur (LS)** et la **largeur (WS)** des feuilles cotylédonaires ( $r=0,839$ ), ce qui indique que ces deux dimensions évoluent conjointement. Le **poids total des feuilles (WTS)** est modérément corrélé à la

## **Résultats et Discussion**

longueur et la largeur foliaire ( $r=0,323$  avec LS et  $r=0,437$  avec WS), mais aussi à WTP ( $r=0,567$ ), suggérant que la masse foliaire contribue significativement à la biomasse totale.

Le rapport racine/poids total (RW) présente quant à lui des **corrélations négatives très marquées** avec plusieurs caractères morphologiques, en particulier avec LP ( $r=-0,824$ ) et WTP ( $r=-0,875$ ). Cela suggère que les accessions investissant davantage dans le système racinaire le font souvent au détriment du développement aérien, ce qui peut représenter une stratégie adaptative face à des contraintes environnementales, telles qu'un sol pauvre ou sec.

Concernant les **caractères foliaires mesurés à la sixième semaine (LGFT6, LRFT6, SFT6)**, une **corrélation extrêmement forte** est observée entre la **longueur**, la **largeur** et la **surface de la feuille** (par exemple,  $r=0,939$  entre LGFT6 et SFT6, et  $r=0,893r$  entre LRFT6 et SFT6). Cela indique que la surface foliaire est très étroitement déterminée par ces deux dimensions, confirmant la stabilité du développement foliaire à ce stade de croissance.

La **dimension des cotylédons (DCOT)** est positivement corrélée à la surface foliaire à T6 ( $r=0,463$ ) ainsi qu'à LGFT6 et LRFT6 ( $r=0,497$  et  $r=0,422$  respectivement), ce qui suggère que la vigueur initiale de la plantule influence partiellement le développement végétatif ultérieur.

Du point de vue **écologique**, l'**altitude (Alt)** présente une **corrélation négative modérée** avec la majorité des caractères morphologiques, notamment avec WTP ( $r=-0,295$ ), LP ( $r=-0,273$ ) et WTS ( $r=-0,269$ ). Cela montre que les accessions issues de régions d'altitude élevée tendent à être moins développées, ce qui pourrait être dû aux températures plus basses, à une photopériode différente ou à une pression de sélection plus forte. D'ailleurs, l'altitude est **fortement corrélée négativement** avec la **température moyenne (Tm)** ( $r=-0,797$ ), ce qui confirme l'effet environnemental indirect de l'altitude sur la croissance.

En ce qui concerne les **précipitations moyennes (Pm)**, on observe des **corrélations modérées et positives** avec plusieurs caractères morphologiques, notamment LS ( $r=0,501$ ) et LP ( $r=0,434$ ), ce qui indique que les accessions originaires de régions plus humides présentent un meilleur développement végétatif, particulièrement en ce qui concerne les dimensions foliaires. Une corrélation négative est par contre observée entre Pm et RW ( $r=-0,488r = -0,488r=-0,488$ ), suggérant que les plantes issues de zones plus sèches investissent davantage dans leur système racinaire.

## Résultats et Discussion

Enfin, la **température maximale (TM)** montre une **corrélation positive modérée** avec LP ( $r=0,544$ ) et LS ( $r=0,491$ ), laissant penser que des températures plus élevées favorisent une meilleure croissance, au moins pour certains caractères morphologiques. Toutefois, la température moyenne (Tm) ne semble pas influencer de manière significative la majorité des traits morphologiques, à l'exception d'une légère corrélation positive avec RW ( $r=0,231$ ).

**Tableau 7.** Matrice de corrélation entre les différents caractères morphologiques et les cinq paramètres écologiques.

Variable	LP	WP	WTP	SP	LS	WS	WTS	RW	DCOT	LGFT6	LRFT6	SFT6	Alt	Pm	Tm	TM
LP	1															
WP	0,514	1														
WTP	0,814	0,454	1													
SP	0,477	0,224	0,382	1												
LS	0,535	0,498	0,308	0,078	1											
WS	0,530	0,650	0,190	0,143	0,839	1										
WTS	0,558	0,542	0,567	0,238	0,323	0,437	1									
RW	-0,824	-0,378	-0,875	-0,407	-0,414	-0,170	-0,319	1								
DCOT	-0,041	-0,130	-0,036	-0,044	-0,159	-0,167	0,506	0,141	1							
LGFT6	0,091	0,000	0,065	-0,387	0,321	0,161	0,386	-0,105	0,497	1						
LRFT6	-0,126	-0,137	-0,072	-0,364	0,181	-0,006	0,035	0,051	0,422	0,723	1					
SFT6	0,032	-0,013	0,042	-0,377	0,306	0,135	0,254	-0,066	0,463	0,939	0,893	1				
Alt	-0,273	-0,246	-0,295	-0,119	-0,048	-0,152	-0,269	0,006	0,053	0,212	0,184	0,174	1			
Pm	0,434	0,416	0,304	-0,179	0,501	0,358	0,058	-0,488	-0,166	0,050	-0,071	0,041	0,036	1		
Tm	0,180	0,212	0,146	-0,035	-0,055	0,262	0,267	0,231	-0,072	-0,251	-0,112	-0,184	-0,797	-0,208	1	
TM	0,544	-0,144	0,414	0,163	0,491	0,340	0,191	-0,486	-0,055	0,322	0,114	0,284	0,166	0,204	-0,146	1

### **1.5. Analyse des distances génétiques et des caractéristiques écogéographiques des accessions de *M. ciliaris***

Pour évaluer la proximité ou la divergence entre les accessions de *M. ciliaris*, une analyse des distances génétiques a été réalisée à partir des profils moléculaires obtenus, considérés deux à deux. Ces distances permettent d'estimer le degré de ressemblance ou de dissemblance entre les accessions sur la base des bandes amplifiées. Les résultats ont été synthétisés sous forme d'une matrice de distance, exprimée en unités arbitraires (ex. : base pair ou autre unité de migration), reflétant la différence moléculaire entre chaque paire.

Les distances observées varient considérablement, allant de  $d=3,9$  entre Mc1 (Mila, Oued Athmenia) et Mc19 (Guelma) à  $d=81,2$  entre Mc3 (Constantine, Beni Hemiden) et Mc7 (Bouira, Akhdaria). Cette amplitude traduit une diversité génétique importante au sein des 16 accessions étudiées, avec une valeur moyenne estimée autour de 26 unités.

## **Résultats et Discussion**

Certains couples d'accessions se distinguent par leur grande similarité génétique, traduite par des distances très faibles, comme entre Mc1 et Mc19 (3,9), Mc1 et Mc10 (3,9), ou encore Mc10 et Mc19 (5,3). Il est intéressant de noter que malgré la distance géographique considérable entre Mila (Est) et Guelma, ou encore Blida, ces accessions partagent des profils moléculaires très proches. Cela peut s'expliquer soit par une origine génétique commune, soit par des conditions écologiques analogues favorisant une pression de sélection similaire (ex. : précipitations moyennes annuelles entre 568 et 564 mm, altitudes comprises entre 70 et 798 m).

D'un autre côté, des accessions telles que Mc3 (Constantine, Beni Hemiden) et Mc7 (Bouira, Akhdaria) présentent les plus grandes distances génétiques (81,2), révélant une divergence importante entre leurs profils. Cette dissimilarité peut être attribuée aux différences écogéographiques significatives entre leurs sites d'origine, notamment l'altitude (429 m pour Mc3 contre 144 m pour Mc7) et les paramètres climatiques (précipitations, température maximale). De même, les distances élevées observées entre Mc12 (Aïn Defla 2) et Mc7 (77,3), ou entre Mc12 et Mc3 (5,8), confirment cette tendance.

Un ensemble de groupes homogènes peut toutefois être mis en évidence. Par exemple, Mc5 (Constantine, Chaabet Ersas) présente une proximité remarquable avec Mc6 (Sidi Bel Abbès) avec une distance de 5,9, ainsi qu'avec Mc14 (Relizane) avec une distance très faible de 2,1. Ce groupe regroupe des accessions de zones semi-arides à subhumides, aux altitudes modérées (entre 58 et 584 m), indiquant une possible adaptation similaire.

Les accessions Mc2 (Mila, Bab Trouche), Mc5, Mc13 (Aïn Defla 3) et Mc20 (Béjaïa, Akbou) présentent également des valeurs de distance modérées, allant de 4,1 à 7,3 unités. Ces résultats suggèrent un niveau intermédiaire de divergence, avec autant de ressemblances que de différences moléculaires, probablement influencées par la variabilité climatique et géographique de leurs régions d'origine.

En résumé, cette analyse montre que, bien que certaines accessions soient issues de régions éloignées sur le plan géographique ou écologique, elles peuvent présenter des profils génétiques très similaires, et inversement. Cela reflète la complexité de la structuration génétique de *M.ciliaris* en Algérie, influencée à la fois par l'histoire évolutive des populations et par les facteurs environnementaux locaux.

## Résultats et Discussion

**Tableau 8.** Distances génétiques obtenues entre les 16 accessions de *M. ciliaris* en se basant sur les données morphologiques.

Mc1	Mc2	Mc3	Mc5	Mc6	Mc7	Mc9	Mc10	Mc11	Mc12	Mc13	Mc14	Mc16	Mc17	Mc19	Mc20	
Mc1	0	28,441	54,580	16,855	12,344	26,998	8,102	3,911	6,592	50,644	25,666	17,464	8,251	8,392	3,901	21,751
Mc2		0	26,282	12,165	17,203	55,065	33,439	29,840	32,869	22,601	4,151	11,913	32,762	20,440	27,158	7,334
Mc3			0	38,009	42,966	81,212	59,339	56,016	58,744	5,881	29,281	37,577	58,446	46,444	53,085	33,194
Mc5				0	5,975	43,430	22,103	18,530	21,267	34,002	9,412	2,118	22,027	9,268	15,977	6,546
Mc6					0	38,488	16,699	14,149	16,182	39,063	14,307	6,720	18,147	6,095	11,727	10,615
Mc7						0	22,464	25,500	23,130	77,290	52,056	43,867	25,880	35,271	28,869	48,234
Mc9							0	7,021	4,486	55,572	30,354	22,511	12,295	14,742	10,097	26,650
Mc10								0	5,685	52,143	26,835	18,863	9,595	10,351	5,327	23,222
Mc11									0	54,856	29,689	21,597	10,364	13,264	7,801	26,159
Mc12										0	25,556	33,613	54,777	42,575	49,276	29,491
Mc13											0	8,738	30,428	17,725	24,302	5,615
Mc14												0	22,818	9,888	16,413	6,911
Mc16													0	13,302	8,485	26,238
Mc17														0	7,245	14,033
Mc19															0	20,435
Mc20																0

### **1.6. Classification ascendante hiérarchique (CAH) en se basant sur les données morphologiques.**

Classification CAH est une méthode statistique utilisée pour regrouper des objets ou autres dans des groupes homogènes sur la base de leur similarité.

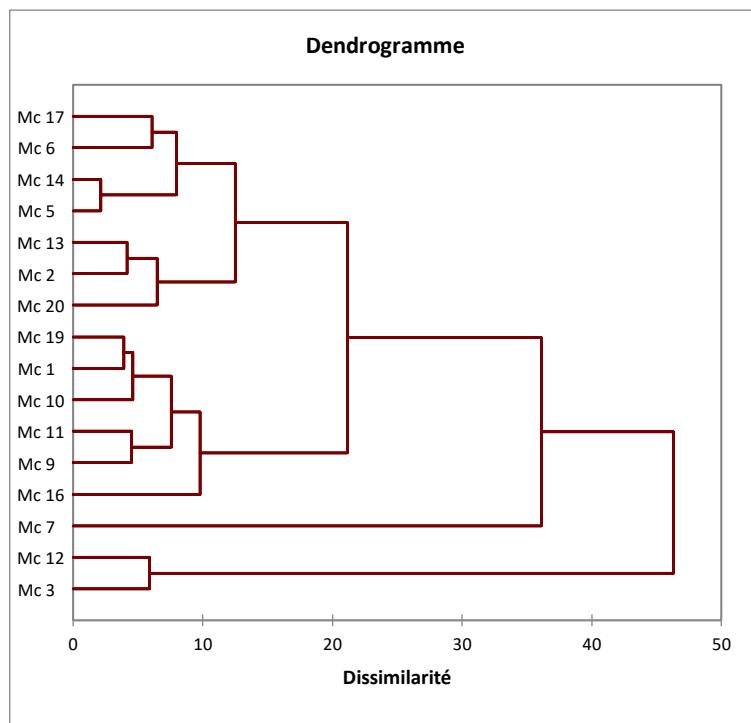
Les regroupements hiérarchiques visibles sur le dendrogramme révèlent la formation de 4 groupes principaux.

Le premier cluster ( $d=12.50$ ) regroupe sept accession (MC17, MC6, MC14, MC5, MC13, MC2, MC20) (Medea, Sidi Belabbes, Relizane, Constantine, Ain Defla, Mila, Béjaia), avec gamme des étages bioclimatique varient de subhumide au humide au hyper humide.

Le deuxième cluster comprenne six accession à un degré de distance ( $d=9.79$ ) (Guelma, Mila, Blida, Ain Defla, Alger, Mascara), avec une large gamme des étages bioclimatique qui varie de au hyper\_ humide au humide au subhumide au semi sec.

Le troisième cluster est constitué deux accession (MC7, MC12) appartenant à des régions de nord-ouest de Algérie (Bouira, Ain Defla) avec un climat humide.

L'accession MC3 qui est collectée dans une région subhumide Constantine, forme le quatrième groupe qui est considéré indépendant des autres avec le degré le plus élevé de distance génétique ( $d=46.30$ ).



**Figure 9.** Classification hiérarchique en UPGMA des 16 accessions de *M. Ciliaris* basée sur les données morphologiques: le premier groupe, le deuxième groupe, le troisième groupe, le quatrième groupe.

## 2. Analyse de la diversité moléculaire

L'analyse des profils électrophorétiques des produits PCR a été réalisée par une observation visuelle des pistes obtenues après électrophorèse. Les positions relatives des bandes ont été évaluées à l'œil nu, puis traduites en une matrice binaire, indiquant la présence (1) ou l'absence (0) d'une bande. Les bandes présentant une même mobilité ont été considérées comme représentant le même fragment d'ADN, indépendamment de leur intensité.

À partir de ces données, une matrice de similarité a été calculée en utilisant l'indice de Jaccard selon la méthode de « Simple Matching ». Un dendrogramme illustrant les relations entre les accessions a ensuite été généré à l'aide de la méthode de groupement hiérarchique UPGMA. Par ailleurs, des matrices de distances génétiques entre les différentes accessions ont également été établies.

### 2.1. Mobilité et fréquence des amplifiants

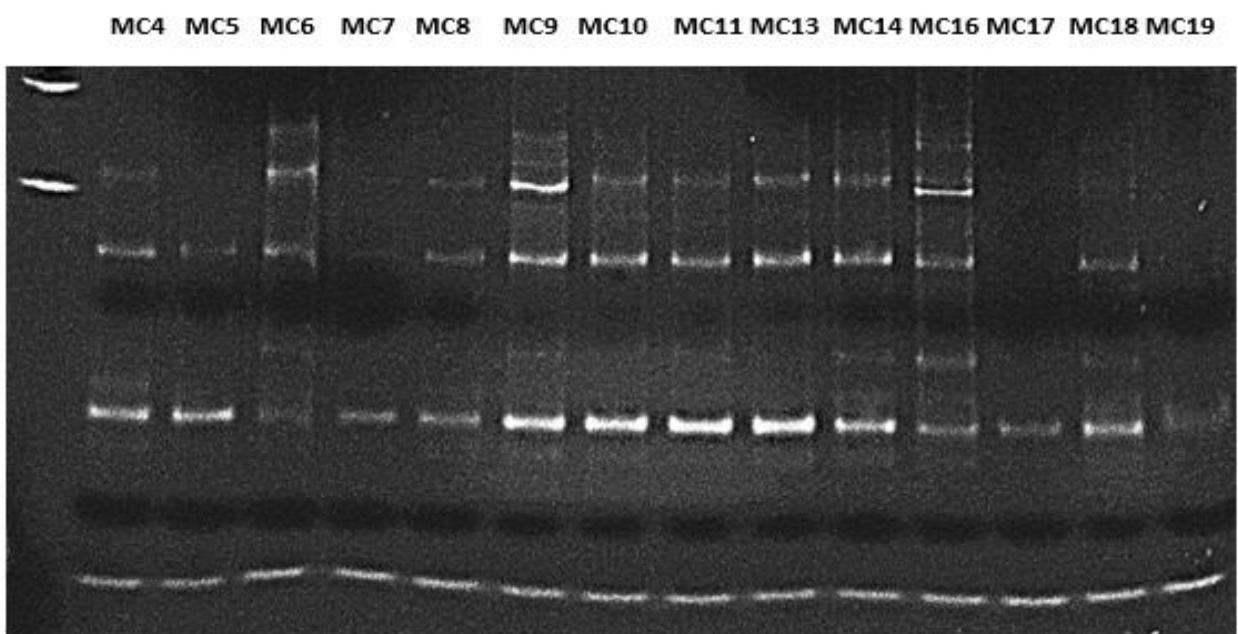
La lecture des diagrammes électrophorétiques consiste à mesurer la mobilité (en centimètres) de chaque bande en déterminant la distance parcourue par celle-ci dans le gel de séparation. Cette mobilité correspond à la distance entre le point d'application de l'échantillon

## **Résultats et Discussion**

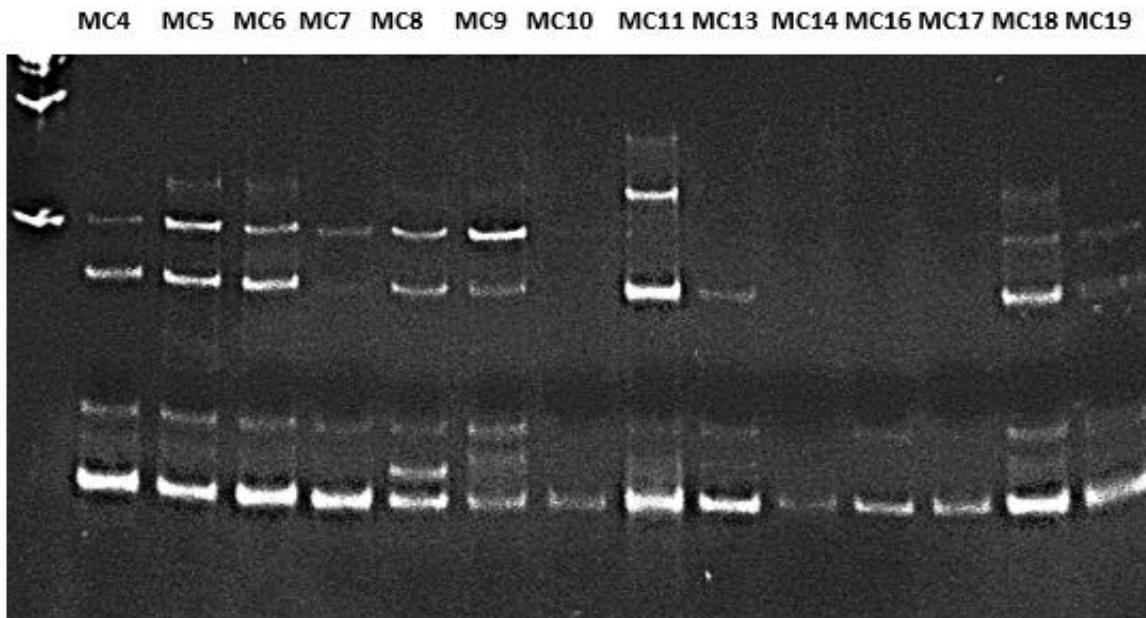
et la position finale de la bande dans le gel. Afin de corriger les variations éventuelles de mobilité d'un gel à l'autre ; A cet effet, nous avons utilisé une accession de référence comme point de repère afin de corriger les variations de mobilité observées entre les différents gels.

Sur la base de la mobilité électrophorétique et des données génétiques, les bandes lentes sont associées à des fragments de poids moléculaire élevé, tandis que les bandes intermédiaires et rapides reflètent des fragments de poids moléculaire plus faible.

Les résultats obtenus après la migration des ADN amplifiés ont révélé des électrophorégrammes présentant des intensités variables, selon les microsatellites analysés. Les bandes sont bien séparées, avec une excellente résolution, mettant en évidence un polymorphisme entre les différentes accessions.



**Figure 10.** Profil électrophorétique des bandes SSR de l'espèce *M. ciliaris* révélés par l'amorce AFctt1



**Figure 11.** Profil électrophorétique des bandes SSR de l'espèce *M. ciliaris* révélés par l'amorce AFct32

❖ **Amorce AFctt1**

Chez les 14 accessions de cette espèce, neuf bandes distinctes ont été détectées, présentant des mobilités comprises entre 0,28 cm et 5,43 cm. Le tableau 7 en illustre les fréquences.

L'analyse du tableau met en évidence une grande variabilité des fréquences entre les accessions de *M. ciliaris*. Parmi les neuf bandes détectées, seules deux (B6 et B9) sont monomorphes, étant présentes dans l'ensemble des accessions. La bande B4 présente une fréquence légèrement inférieure à 0,86, ayant été absente chez seulement deux accessions.

Des fréquences intermédiaires, comprises entre 0,50 et 0,43, ont été enregistrées pour trois bandes : B1, B7 et B8. À titre d'exemple, les bandes B7 et B8 ont été détectées chez six accessions chacune, avec une fréquence de 0,43. Les bandes restantes, telles que B2 et B5, sont partagées entre seulement deux ou trois accessions, affichant ainsi de faibles fréquences, variant de 0,21 à 0,14.

La fréquence la plus faible (0,04) a été observée pour la bande B3, spécifique à l'espèce *M. ciliaris*. Cette bande, amplifiée avec l'amorce AFctt1, n'a été détectée que dans une seule accession, ce qui lui confère un caractère polymorphe. Elle distingue particulièrement l'accession MC9, originaire de la région d'Alger.

❖ **Amorce AFct32**

Les diagrammes électrophorétiques obtenus avec l'amorce Afct32 ont révélé la présence de huit bandes réparties sur l'ensemble du gel, numérotées de la plus lente à la plus rapide, avec des mobilités comprises entre 0,32 cm et 5,64 cm. Les fréquences d'apparition de ces bandes dans les 14 accessions de l'espèce *M. ciliaris* sont présentées dans le tableau 8.

## **Résultats et Discussion**

Deux bandes (B14, B17), ont été identifiées comme monomorphes, car elles sont présentes dans l'ensemble des accessions avec une fréquence de 100 %. Quatre autres bandes (B12, B11, B15 et B13) présentent des fréquences moyennes comprises entre 0,57 et 0,71, indiquant qu'elles sont partagées par 8 à 10 accessions. Enfin, les fréquences les plus faibles (0,07) ont été observées pour les bandes B10 et B16, chacune étant détectée dans une seule accession uniquement.

## Résultats et Discussion

**Tableau 9.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences pour l'amorce AFctt1 des 14 accessions de *M.ciliaris*

Bandes	Mc4	Mc5	Mc6	Mc7	Mc8	Mc9	Mc10	Mc11	Mc13	Mc14	Mc16	Mc17	Mc18	Mc19	somme	fréquence
1	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	7	0,50
2	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	3	0,21							
3	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	1	0,07							
4	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	12	0,86
5	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	2	0,14
6	<b>1</b>	14	1,00													
7	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	6	0,43
8	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	6	0,43
9	<b>1</b>	14	1,00													

**Tableau 10.** Matrice présence/absence, mobilités et fréquences pour l'amorce AFct32 des 14 accessions de *M. ciliaris*

Bandes	Mc4	Mc5	Mc6	Mc7	Mc8	Mc9	Mc10	Mc11	Mc13	Mc14	Mc16	Mc17	Mc18	Mc19	somme	fréquence
10	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	1	0,07						
11	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	9	0,64
12	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	8	0,57
13	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	10	0,71
14	<b>1</b>	14	1,00													
15	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	9	0,64
16	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	1	0,07								
17	<b>1</b>	14	1,00													

## **2.2. Analyse génétique**

Dans le cadre de l'évaluation du polymorphisme génétique chez 14 accessions de *M. ciliaris*, cinq marqueurs SSR ont été testés. Parmi ceux-ci, trois n'ont donné aucun produit d'amplification. Seuls deux marqueurs, AFctt1 et AFct32, se sont révélés amplifiables, générant au total 17 fragments de tailles comprises entre 13 et 154 pb. Le marqueur AFctt1 a permis de détecter 9 bandes, tandis qu'AFct32 en a produit 8, dont les tailles varient de 11 à 154 pb (tableau 9).

**Tableau 11.** Nombre total des bandes amplifiées et polymorphisme dans les 14 accessions pour chaque marqueur SSR.

Locus	Nombre de bandes amplifiées	Moyenne de nombre des bandes	Taille de la bande (pb)	Nombre de bandes polymorphiques	Quantité de polymorphisme (%)
AFctt1	9	4.64 (3-7)	13-154	7	77.77
AFct32	8	4.71 (2-6)	11-154	6	75

Les deux amores ont donné 17 fragments d'ADN amplifiés avec 13 bandes SSR polymorphes pour les 14 accessions.

Le nombre de bandes polymorphes varie entre 6 et 7, avec un pourcentage de polymorphisme de 75,00 % pour le marqueur AFct32 et de 77,77 % pour AFctt1.

## **2.2. Analyse des relations génétiques entre accessions de *M. ciliaris* à partir d'une matrice de similarité (indice de Jaccard)**

Afin de mieux comprendre le degré de proximité ou de divergence génétique entre les différentes accessions de *M. ciliaris*, une matrice de similarité a été établi en utilisant l'indice de Jaccard. Ce coefficient permet d'évaluer la similarité des profils moléculaires obtenus via les marqueurs SSR, et par conséquent, de quantifier les relations génétiques entre les accessions deux à deux. Les résultats ont révélé des valeurs de similarité comprises entre **0,308 et 1,000**, reflétant ainsi un niveau de polymorphisme variable entre les échantillons analysés.

Les plus fortes similarités (valeur = 1,000) ont été enregistrées entre certains couples d'accessions, notamment **Mc5/Mc7**, **Mc5/Mc19** et **Mc7/Mc19**, indiquant une identité ou une

## **Résultats et Discussion**

très grande proximité génétique. Ces accessions pourraient provenir de zones géographiques similaires ou avoir subi des conditions environnementales comparables ayant conduit à un profil génétique quasi identique. D'autres accessions comme **Mc4** ont également montré une forte similarité avec **Mc5** et **Mc7** (valeurs = 0,900), suggérant leur appartenance à un même groupe génétique ou leur proximité évolutive.

En revanche, des similarités plus faibles ont été observées, comme entre **Mc9** et **Mc17** (valeur = 0,308), traduisant une divergence génétique importante. Cette variation peut être expliquée par l'origine géographique distincte des accessions, ainsi que par les conditions écologiques hétérogènes de leurs sites de prélèvement.

Globalement, la moyenne des similarités indique l'existence de **groupes d'accessions proches génétiquement**, aux côtés d'accessions plus divergentes. Cette diversité génétique représente une richesse précieuse pour les programmes de sélection variétale et de conservation des ressources phylogénétiques. L'exploitation de cette variabilité pourrait permettre l'identification de génotypes adaptés à différentes contraintes environnementales.

Afin de mieux évaluer le degré de ressemblance génétique entre les accessions de *M.ciliaris*, une matrice de similarité a été établie en utilisant un coefficient de similarité compris entre 0 et 1. Les valeurs proches de 1 traduisent une forte similarité, tandis que celles proches de 0 indiquent une divergence génétique importante. Les résultats montrent des similarités allant de 0,308 à 1,000. Certaines paires d'accessions, telles que Mc5/Mc7, Mc5/Mc19 et Mc7/Mc19, présentent une similarité parfaite (1,000), traduisant une identité génétique complète ou quasi complète. Ces accessions sont très probablement issues d'une même origine géographique ou soumises à des pressions environnementales similaires. De même, Mc4 montre une forte similarité avec Mc5 et Mc7 (0,900), ce qui suggère qu'elles appartiennent à un même groupe génétiquement homogène.

À l'inverse, des niveaux de similarité plus faibles ont été observés, notamment entre Mc9 et Mc17 (0,308), indiquant une divergence génétique marquée. Ces variations pourraient s'expliquer par des origines écogéographiques différentes ou des adaptations spécifiques à des environnements contrastés. D'autres accessions comme Mc6, Mc11 et Mc13 affichent des similarités intermédiaires avec plusieurs autres échantillons (entre 0,700 et 0,769), traduisant une proximité génétique partielle, mais avec des différences notables.

Ces résultats permettent de dégager des groupes d'accessions génétiquement proches, pouvant servir de base pour la conservation de ressources génétiques ou les programmes de

## Résultats et Discussion

sélection. Par ailleurs, les accessions les plus divergentes représentent un intérêt particulier pour l'introduction de variabilité génétique dans les croisements. L'ensemble des données met ainsi en évidence un polymorphisme génétique significatif au sein des accessions analysées, reflet de leur diversité géographique et écologique.

**Tableau 12.** Distances génétiques obtenues entre les 14 accessions de *M. ciliaris* en se basant sur les données moléculaires.

	Mc4	Mc5	Mc6	Mc7	Mc8	Mc9	Mc10	Mc11	Mc13	Mc14	Mc16	Mc17	Mc18	Mc19
Mc4	1	0,900	0,750	0,900	0,818	0,571	0,455	0,692	0,636	0,462	0,357	0,500	0,833	0,900
Mc5		1	0,818	1,000	0,727	0,615	0,500	0,615	0,700	0,385	0,286	0,556	0,750	1,000
Mc6			1	0,818	0,615	0,769	0,545	0,769	0,727	0,538	0,429	0,455	0,769	0,818
Mc7				1	0,727	0,615	0,500	0,615	0,700	0,865	0,286	0,556	0,750	1,000
Mc8					1	0,467	0,455	0,571	0,500	0,462	0,357	0,500	0,692	0,727
Mc9						1	0,385	0,600	0,538	0,400	0,500	0,308	0,600	0,615
Mc10							1	0,500	0,750	0,667	0,500	0,833	0,385	0,500
Mc11								1	0,667	0,615	0,500	0,417	0,714	0,615
Mc13									1	0,545	0,417	0,625	0,538	0,700
Mc14										1	0,800	0,556	0,615	0,385
Mc16											1	0,400	0,500	0,286
Mc17												1	0,417	0,556
Mc18													1	0,750
Mc19														1

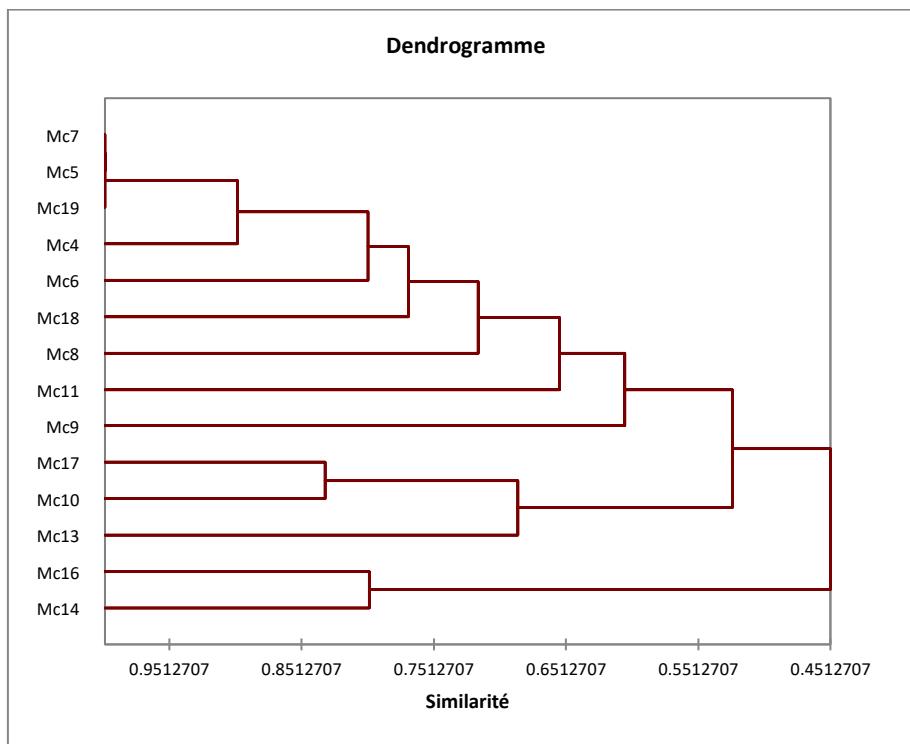
### **2.3. Classification ascendante hiérarchique (CAH)**

Le dendrogramme est construit à partir des distances génétiques ou des bandes issues du profil électrophorétique obtenu pour les marqueurs SSR analysés. Les regroupements hiérarchiques visibles sur le dendrogramme révèlent la formation de trois groupes principaux.

Le premier cluster ( $d=0.60$ ) regroupe neuf accession ( MC7, MC5, MC19, MC4, MC6, MC18, MC8 , MC11, MC9) ( Bouira , Constantine , Guelma , Sidi Belabbes , Tissemsilt , Alger , Ain Defla ) , avec gamme des étages bioclimatique varient de subhumide au humide.

Le deuxième cluster comprenne trois accession à un degré de distance ( $d=0.68$ ) (Medea, Mascara, Ain Defla, Blida), avec une large gamme des étages bioclimatique qui varie de au hyper\_ humide au humide au subhumide au semi sec.

Le troisième cluster est constitué deux accession (MC16, MC14) appartenant à des régions de nord-ouest de Algérie (Mascara, Relizane) avec un climat semi sec.



**Figure 10.** Classification hiérarchique en UPGMA des 16 accessions de *M. Ciliaris* basée sur le polymorphisme des SSR : le premier groupe, le deuxième groupe, le troisième

groupe.

### **3. Discussion**

Cette étude vise à évaluer la diversité génétique au sein des populations de l'espèce *M. ciliaris*. Pour ce faire, 20 accessions collectées à travers un large éventail de zones climatiques du nord de l'Algérie ont été analysées à l'aide de marqueurs SSR et de caractères morphologiques.

Nos résultats ont révélé une variabilité morphologique significative aussi bien au sein des populations qu'entre elles, concernant les caractères des gousses, des graines et des plantules. Par ailleurs, les taxonomistes s'accordent à considérer les caractéristiques des fruits (gousses et graines) comme des critères essentiels pour différencier les espèces du genre *Medicago* L. (Heyn, 1963; Lesins et Lesins, 1979; Quézel et Santa, 1962; Small et Jomphe, 1989). Cette diversité morphologique marquée concorde avec les conclusions de nombreuses études portant sur la variabilité génétique des collections de matériel génétique de *Medicago* L. (Al-Faifi et al., 2013; Bonnin et al., 1996; Bullita et al., 1994; Cherifi et al., 1993; El Hansali et al., 2007; Radwan et al., 1980; Tucak et al., 2008; Zivković et al., 2012).

Plusieurs études ont mis en évidence que *M. ciliaris* présente, elle aussi, une grande diversité morphologique et phénologique. Cette variabilité est particulièrement marquée entre les populations naturelles issues de différentes régions écogéographiques. En ce sens, des travaux menés sur des accessions algériennes ont révélé une variabilité morphologique hautement significative, traduisant un fort polymorphisme au sein même des populations et également entre-elle. Cette diversité s'explique notamment par l'adaptation de l'espèce aux conditions climatiques contrastées des zones d'origine, qu'elles soient côtières, semi-arides ou montagneuses. Ces résultats confirment que *M. ciliaris*, constitue un matériel génétique d'intérêt pour les programmes d'amélioration des légumineuses fourragères adaptées aux environnements méditerranéens.

*M. ciliaris*, à l'instar des autres espèces annuelles du genre *Medicago*, produit une quantité importante de gousses indéhiscentes renfermant des graines dures, favorisant ainsi la pérennité de l'espèce dans des environnements méditerranéens. Cette caractéristique, rapportée par Abdelkefi et Marakchi (2000) pour les espèces annuelles de *Medicago*, s'observe également chez *M. ciliaris*. Par ailleurs, bien que la quantité de gousses puisse varier selon les conditions

## **Résultats et Discussion**

environnementales, *M. ciliaris* se distingue par une bonne capacité de production de graines, comparable à celle d'autres luzernes annuelles étudiées par Loi et al. (2000).

En revanche, les populations précoces, bien que présentant un développement végétatif moins prononcé, produisent des gousses et des graines généralement plus lourdes, ce qui peut constituer un avantage pour la reproduction et la survie des semences. Cette dualité reflète des stratégies adaptatives distinctes, influencées par les conditions environnementales locales.

Ainsi, pour *M.ciliaris*, il est essentiel de poursuivre les recherches afin de mieux comprendre l'impact du moment de la floraison sur ses performances agronomiques, notamment dans les régions méditerranéennes où les contraintes climatiques varient fortement (Chebouti et al., (2006) Laouar et Abdelguerfi (1999)).

Chez *M.ciliaris*, les relations entre les caractères biométriques et les facteurs environnementaux apparaissent parfois contrastées, comme l'ont révélé certaines analyses multi variées, notamment l'Analyse en Composantes Principales (ACP). La variabilité observée, à la fois entre les populations et au sein de chacun, peut être attribuée à la large répartition géographique de l'espèce et à l'hétérogénéité écologique des habitats d'origine.

Plusieurs travaux antérieurs (Laouar et Abdelguerfi, 1999 ; Al-Faifi et al., 2013 ; Zivković et al., 2012) ont mis en évidence une corrélation positive entre les traits morphologiques et les facteurs climatiques chez différentes espèces du genre *Medicago*, y compris *M. ciliaris*. Ces résultats confirment que les conditions environnementales — telles que la température, la pluviométrie ou l'altitude — influencent significativement l'expression phénotypique de cette espèce, traduisant ainsi une forte capacité d'adaptation aux variations du milieu.

Des recherches menées par Laouar et Abdelguerfi (1999) ont examiné la relation entre les caractères biologiques et les facteurs du milieu pour les espèces *M.ciliaris* et *M. intertexta*. Ils ont observé que les populations de *M.ciliaris* présentent une variabilité significative en fonction des conditions écologiques, notamment la pluviométrie, la température et l'altitude. Cette variabilité se manifeste par des différences dans les caractères phénologiques et morphologiques, tels que le début de la floraison et la hauteur des plantes. Les analyses statistiques, telles que les matrices de corrélation et les régressions linéaires, ont révélé des relations entre ces traits et les facteurs climatiques, soulignant l'impact de l'environnement sur la diversité de cette espèce. Ces résultats suggèrent que, les conditions bioclimatiques influencent les caractéristiques phénotypiques de *M. ciliaris*.

## **Résultats et Discussion**

De plus, une étude menée en Tunisie (Cherifi K, 1993) a montré que les populations de *M. ciliaris* présentent une diversité phénotypique et génétique significative, avec des variations dans les traits morphologiques entre les populations, en fonction de leur origine géographique. Cette diversité est influencée par les conditions bioclimatiques locales, telles que la pluviométrie et la température, ce qui reflète l'adaptabilité de l'espèce à différents environnements. Ces observations renforcent l'idée que les facteurs bioclimatiques, tels que les précipitations estivales et la latitude, jouent un rôle important dans la détermination des traits phénotypiques de *M. ciliaris*.

Ainsi, bien que les corrélations spécifiques puissent varier, les tendances générales observées chez *M. ciliaris*, indiquant que les conditions bioclimatiques influencent de manière significative les caractéristiques morphologiques et phénologiques de cette espèce.

Les travaux de Laouar et Abdelguerfi (1999) ont mis en évidence une importante variabilité intra-populationnelle chez *Medicago ciliaris*, influencée par des paramètres écologiques tels que la pluviométrie, la température et l'altitude. Cette diversité se manifeste notamment par des différences phénologiques (comme la précocité de floraison) et morphologiques (telles que la hauteur des plantes). Des analyses statistiques, comprenant des matrices de corrélation et des régressions linéaires, ont montré que ces caractères sont étroitement liés aux conditions climatiques, confirmant ainsi l'effet significatif de l'environnement sur l'expression phénotypique de l'espèce.

En outre, une étude réalisée en Tunisie a confirmé l'existence d'une diversité phénotypique et génétique marquée chez *M. ciliaris*, avec des variations morphologiques nettes entre les populations selon leur origine géographique. Cette diversité est fortement conditionnée par les caractéristiques bioclimatiques locales (notamment la température et la pluviométrie), ce qui témoigne d'une forte capacité d'adaptation de l'espèce à des environnements variés. Ces observations appuient l'idée que des facteurs tels que les précipitations estivales et la latitude jouent un rôle déterminant dans l'expression des caractères phénotypiques.

Ainsi, bien que les corrélations spécifiques puissent différer selon l'environnement, les tendances générales chez *M. ciliaris* soulignent l'influence majeure des conditions bioclimatiques sur ses traits morphologiques et phénologiques.

Badri et al. (2007) ont également mis en évidence des corrélations entre les caractères quantitatifs des plantes et les facteurs écogéographiques des sites d'origine.

## **Résultats et Discussion**

L'étude du polymorphisme morphologique est fréquemment complétée par l'analyse du polymorphisme iso enzymatique ou moléculaire (Ballve et al., 1997 ; Moore, 2001). Les marqueurs microsatellites, en raison de leur taux de mutation élevé, sont particulièrement efficaces pour détecter un niveau important de polymorphisme, notamment à l'échelle interspécifique. Ils permettent de sélectionner des caractères d'intérêt en fonction du génotype, ce qui constitue un atout pour accélérer et optimiser les programmes de sélection végétale. Par ailleurs, les marqueurs possédant un grand nombre d'allèles fournissent des informations précieuses pour les études de structure génétique des populations (Ronfort et al., 2006).

Sous des conditions optimales d'amplification de l'ADN, la technique des marqueurs microsatellites (SSR) permet d'obtenir rapidement une grande quantité de produits fiables, riches en informations, avec des profils à la fois reproductibles et fortement polymorphes (Prevost et Wilkinson, 1999 ; Haouari et Ferchichi, 2004).

Toutes les accessions examinées ont révélé un polymorphisme intraspécifique notable à partir des deux marqueurs SSR utilisés. Cela est cohérent avec le fait que les espèces annuelles du genre *Medicago* sont autogames, un mode de reproduction qui réduit le flux génétique et, par conséquent, favorise une différenciation locale accrue entre les populations (Charlesworth, 2003).

L'analyse de la diversité génétique de *Medicago ciliaris* à l'aide de marqueurs microsatellites (SSR) a permis de mettre en évidence une importante variabilité génétique entre les 14 accessions étudiées. Deux amores, AFctt1 et AFctt32, ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des profils d'amplification nets et polymorphes, ce qui reflète leur puissance discriminante (Doyle et Doyle, 1990). La séparation des produits de PCR sur gel de polyacrylamide a révélé des bandes spécifiques à chaque génotype, témoignant d'un polymorphisme allélique significatif, caractéristique essentielle pour différencier les génotypes dans les études de diversité (Langridge et al., 2001 ; Khadari et al., 2003).

Le taux de polymorphisme observé dans cette étude est élevé, ce qui confirme la richesse du patrimoine génétique de *M. ciliaris* et la pertinence des SSR comme marqueurs de choix pour l'évaluation de la diversité intraspécifique (Budak et al., 2003). Ce résultat rejoint les travaux antérieurs menés sur d'autres espèces du genre *Medicago*, comme *M. truncatula* et *M. sativa*, où les SSR ont montré une grande efficacité dans la discrimination génétique (Smýkal et al., 2011 ; Branca et al., 2011).

## **Résultats et Discussion**

L'analyse des distances génétiques, calculées à partir de l'indice de Jaccard (Jaccard, 1908), et leur représentation par classification hiérarchique ascendante (UPGMA) ont permis d'identifier plusieurs groupes distincts. Cette structuration génétique reflète probablement l'influence de facteurs écogéographiques comme l'altitude, les températures moyennes saisonnières et la pluviométrie annuelle, éléments bien connus pour façonner la différenciation génétique dans les populations végétales (Medoukali, 2016 ; Gharred et al., 2022). Par ailleurs, la nature autogame de l'espèce favorise l'accumulation de mutations spécifiques à chaque population et augmente l'homozygotie, contribuant ainsi à la formation de groupes génétiques distincts (Lesins et Lesins, 1979 ; Abdelguerfi et al., 1988).

Ces résultats suggèrent que *M. ciliaris* possède une base génétique suffisamment large pour être exploitée dans des programmes de sélection destinés à l'adaptation aux conditions arides et semi-arides. La diversité génétique détectée constitue un atout majeur pour la sélection de génotypes résistants au stress hydrique, à la salinité ou aux sols pauvres (Abdous, 2021 ; Aloui, 2022). En outre, l'approche moléculaire utilisée dans cette étude confirme l'importance des techniques de génotypage moderne pour la conservation et la valorisation des ressources phylogénétiques locales dans un contexte de changement climatique.

Doyle J.J. & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13–15.

# **Conclusion et perspectives**

## **Conclusion et perspectives**

Ce travail de recherche visait à évaluer la diversité au sein de l'espèce *M. Ciliaris*, en utilisant des marqueurs morphologiques et moléculaires. L'étude a porté sur 20 échantillons collectés dans différentes conditions écogéographiques du nord de l'Algérie.

20 accessions de *M. ciliaris* ont été évaluées morphométriquement à l'aide d'un comparateur à cadran de précision (0,01 mm). Pour chaque accession, 12 caractères quantitatifs liés aux graines, aux gousses et aux cotylédons ont été analysés, notamment la longueur des gousses, la taille des graines, le poids pour 1 000 graines (WTS) ainsi que le rapport du poids des graines sur celui des gousses (RW). Cette étude a mis en évidence des variations significatives des paramètres biométriques, influencées par les conditions environnementales et climatiques. Elle a également permis d'identifier les critères morphologiques les plus discriminants entre les accessions.

Une diversification génétique notable a été observée entre les populations de *M. Ciliaris* échantillonées dans des contextes écogéographiques très variés, mettant en évidence l'influence des conditions environnementales sur la structuration génétique de l'espèce.

Les marqueurs moléculaires, en particulier les marqueurs SSR analysés par PCR, jouent un rôle essentiel dans l'évaluation de la diversité génétique de l'espèce *M. Ciliaris*. Ils permettent de détecter avec précision les variations génétiques entre les individus, facilitant ainsi l'étude de la structure génétique des populations et la gestion des ressources génétiques.

Identifier les différences observées sur les électrophorégrammes obtenus à l'aide des amores AFct32 et Afctt1 chez les différentes accessions analysées, Dix-sept bandes SSR ont été recensées à travers l'ensemble de la collection, présentant des mobilités et des fréquences très variables ; parmi elles, 13 se sont révélées polymorphes.

La caractérisation phylogénétique des différentes accessions, réalisée par une classification hiérarchique selon la méthode UPGMA, a révélé une corrélation entre le regroupement des accessions basé sur le polymorphisme des microsatellites et les facteurs climatiques ainsi que géographiques des régions d'origine de ces accessions.

D'autres approches et méthodes seraient nécessaires et complémentaires à cette étude afin d'approfondir les connaissances acquises et d'en élargir la portée :

- Mieux évaluer la diversité génétique observée et confirmer les résultats obtenus.
- L'intégration de marqueurs morphologiques et moléculaires supplémentaires permettrait une compréhension plus fine de la structuration génétique, ainsi que du rôle

## **Conclusion et perspectives**

des facteurs écologiques dans la différenciation de cette espèce algérienne. Cela pourrait également fournir des indications sur les modèles évolutifs associés aux accessions étudiées dans leurs contextes environnementaux.

- Approfondir les connaissances sur cette espèce en vue de sa valorisation dans divers domaines, tels que l'écologie, l'agriculture, l'industrie et la médecine.
- Mieux comprendre les mécanismes d'adaptation propres à ce groupe végétal.
- Étendre l'utilisation des microsatellites à d'autres genres et espèces, afin de contribuer à la préservation de la biodiversité et des ressources génétiques.
- Élargir les zones de collecte des échantillons à l'ensemble des régions où cette espèce est présente en Algérie, en veillant à recueillir de manière exhaustive des données environnementales pertinentes, telles que les paramètres climatiques et édaphiques.
- Essayer de corrélérer cette diversité morphologique et moléculaire avec d'autres marqueurs.

# **Références bibliographique**

## **Références bibliographiques**

- 1) Abdelguerfi A, Abdelguerfi-Berrikia R. (1988a). Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* L. en Algérie. II. Caractérisation des gousses et des graines de *M. orbicularis* (L) Bart. Relation avec les conditions du milieu d'origine. Annales de l'institut National Agronomique. El-Harrach., 12 (1) : 329-341.
- 2) Abdelguerfi A. et al. (1988). Étude de la variabilité morphologique et écologique chez *Medicago ciliaris* en Algérie. Institut National de la Recherche Agronomique d'Algérie.
- 3) Abdelguerfi, A., Chapot, J. Y., Conesa, A. P., & Roseau, R. (1988). Contribution a l'étude des espèces spontanées du genre *Medicago* L. en Algérie I. Répartition des espèces en fonction des facteurs du milieu. Annales de l'Institut national agronomique El Harrach, 12(1), 304–328.
- 4) Abdelkafi A, Marrakchi M. (1998). Les ressources phytogénétiques fourragères et pastorales : de l'érosion a la conservation. Opt Medit., 15-27
- 5) Abdous M. (2021). Étude de la tolérance au sel chez *Medicago ciliaris*. Université de Carthage.
- 6) Al-Faifi SA, Migdadi HM, Al-Doss A, Ammar MH, El-Harty EH, Khan MA, Muhammad JM, Alghamdi SS. (2013). Morphological and molecular genetic variability analyses of Saudi lucerne (*Medicago sativa* L.) landraces. Crop & Pasture Science 64:137-146
- 7) Aloui A. (2022). Amélioration des sols salins par les légumineuses fourragères. INAT Tunisie.
- 8) Andersson MS, Schultze-Kraft R, Peters M, Hincapie B, Lascano CE (2006) Morphological, agronomic and forage quality diversity of the *Flemingia macrophylla* world collection. Field Crops Research 96: 387-406
- 9) ANTHOLA A.(2003). La filière "Plantes Aromatiques et Médicinales", page 3
- 10) Aruoma O I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential.
- 11) Ballve R.M.L, Medina-Felho H.P, Braz J, Bordignon R. (1997). Identification of reciprocal hybrids in citrus by the broadness of the leaf petiole wing, Genet 20 (4).
- 12) Bonnin I, Huguet T, Ghérardi M, Prospéri JM, Olivieri I. (1996). High level of polymorphism and spatial structure in a selfing plant species *Medicago truncatula* Gaertn. using RAPDs markers. Am J Bot, 83 : 843-55
- 13) Bouzid, S., 2017. ETUDE DE L'EFFET DE L'INTERACTION DU MOLYBDENE AVEC L'AZOTE CHEZ LES FABACEES CULTIVEES EN MILIEU SALIN, thèse de Doctorat, Université de Constantine, 240P.

## Références bibliographiques

- 14) Branca A. et al. (2011). Whole-genome nucleotide diversity, recombination, and linkage disequilibrium in *Medicago truncatula*. PNAS, 108(42): E864–E870.
- 15) Budak H, Pedraza F, Cregan PB, Baenziger PS, Dweikat I. (2003). Development and utilization of SSRs to estimate the degree of genetic relationships in a collection of pearl millet germplasm. Crop Science 43:2284–2290.
- 16) Budak H. et al. (2003). Molecular characterization of Turkish wheat using AFLP and RAPD markers. Genome, 46(3): 469–475.
- 17) 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.
- 18) Cannon. S., 2008. Chapitre 3 : Legume comparative genetics
- 19) Charlesworth D. (2003). Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 358:1051-1570.
- 20) Cherifi K, Boussaid M, Marrakchi M. (1993). Diversité génétique de quelques populations naturelles de *Medicago ciliaris* (L) Krock et de *Medicago intertexta* (L) Mill. I. Analyse de la variabilité morphologique. [Genetic diversity of some natural populations of *Medicago ciliaris* (L.) Krock and *Medicago intertexta* (L.) Mill. I. Morphological variability analysis]. Agronomie 13:895-908
- 21) Chlack, P. M., 1998. Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotation: A review. Aust j. Res; 49, 303-316
- 22) 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.
- 23) Clarkson, N. M., & Russell, J. S. (1976). Effect of water stress on the phasic development of annual *Medicago* species. Australian Journal of Agricultural Research, 27(2), 227–234. <https://doi.org/10.1071/ar9760227>
- 24) Cronk Q., Ojeda I., Pennington R. T., 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. Curr Opin Plant Biol 9, 99-103.
- 25) Cronk QC (2001) Plant evolution and development in a post-genomic context. Nature Reviews Genetics 2: 607-619
- 26) Cui Z, Carter TE, Jr, Burton JW, Wells R (2001) Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. Crop Sciences 41: 1954-1967.
- 27) Dommergues Y., Duhoux E., et Diem H. G., 1999. Les arbres fixateurs d'azote, (Ed) CIRAD, ESPACE, FAO, IRD; Montpellier, Rome, Paris, pp499

## **Références bibliographiques**

- 28) Doyle J.J, Luckow M.A., 2003. The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900–10
- 29) Doyle J.J. & Doyle J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:13–15.
- 30) Doyle J.J., 1994. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: pp325–349.
- 31) El Aoufir A., 2001. Etude du flétrissement vasculaire du Pois chiche causé par le *Fusarium oxysporum* f.sp.ciceri. Evaluation de la fiabilité de l’analyse isoenzymatique et de la compatibilité végétative pour la caractérisation des races physiologiques. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec
- 32) Ernest S, Stephen RD, Deborah S, Erica J, Heidi LZ (1998) Multiple independent losses of the plastid rpoC1 intron in *Medicago* (Fabaceae) as inferred from phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Canadian Journal of Botany* 76(5): 791-803.
- 33) FAO. 2009. Production year book. Food and Agriculture Organization for the United Nations, Rome Italy.
- 34) Fryer, J. R. (1930). Cytological studies in *Medicago melilotus* and *trigonella*. *Canadian Journal of Research*, 3(1), 3–49.
- 35) Gharred T. et al. (2022). Effet du biochar sur la croissance de *Medicago ciliaris* en condition de stress hydrique. *African Journal of Agricultural Research*, 17(3): 201–210.
- 36) Gomez OJ, Blair MW, Frankow-Lindberg BE, Gullberg U (2004) Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *Crop Sciences* 44: 1412- 1418.
- 37) Gouyon PH. (1994). La biodiversité dans sa perspective historique, in Le courrier de l’environnement de l’INRA n°23, novembre 1994
- 38) Graham PH, Vance CP (2003) Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872–877.
- 39) Halmi S. (2010). Contribution à l’étude cytogénétique de quelques espèces du genre *Medicago* (L). Mémoire de magistère en biotechnologie végétales. Université Mentouri Constantine., 97p.
- 40) Handberg K, Stougaard J. (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2 :487-496.
- 41) Handberg K, Stougaard J. (1992). *Lotus japonicus*, an autogamous, diploid legume species for classical and molecular genetics. *The Plant Journal*, 2 :487-496.

## Références bibliographiques

- 42) Haouari A, Ferchichi A. (2004). Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique d'Artemisia Herba-Alba in Ferchichi A.et Ferchichi A. Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM. Cahiers Options Méditerranéennes, vol. 62 :115- 119.
- 43) Harry. M., 2001. Génétique moléculaire et évolutive. Editions Maloine., Paris.
- 44) Heyn CC (1963) The annual species of Medicago. Scripta Hierosolymitana. Publications of the Hebrew University, Jerusalem.
- 45) Heyn CC. (1963). The annual species of Medicago. Publication of Hebrew university. Jerusalen. 12: 145-154s.
- 46) Heyn, C. C. (1963). The annual species of Medicago. Magnes Press, Hebrew University.
- 47) Hireche Y (2006) Réponse de la luzerne (*Medicago sativa L*) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère, Batna
- 48) Jaccard P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44: 223–270.
- 49) Journet, E. P., Carreau, V., Gouzy, J., Thoquet, P., Rosenberg, C., Barker, D., ... & Gamas, P. (2001). La légumineuse modèle *Medicago truncatula*: approches génomiques et perspectives. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 8, 478-484.
- 50) Khadari B. et al. (2003). Molecular characterization of genetic diversity in olive (*Olea europaea*). *Theoretical and Applied Genetics*, 106(7): 1273–1282.
- 51) KHADARI B., HOCHU I., BOUZID L., ROGER J.P., KJELLERG F., 2003. The use of microsatellite markers for identification and genetic diversity evaluation of the fig collection in CBNMP. *Acta Hortic.*, (605) : 77386
- 52) Khalfallah, L., & Lachelah, R. (2020). Evaluation de la diversité génétique au sein de l'espèce *Trifolium angustifolium* par les marqueurs protéiques (Albumines et globulines). Mémoire de Master : Biochimie de la nutrition. Constantine, Université Frères Mentouri
- 53) Klein, H. D., Rippstein, G., Huguenin, J., Toutain, B., & Guerin, H. (2014). *Les cultures fourragères* (p. 264). éditions Quae.
- 54) Langridge P. et al. (2001). Application of molecular markers to plant breeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64(2–3): 207–220.
- 55) Langridge p., Lagudah ES., Holton TA., Appels R., Sharp PJ., Chlmers KH. (2001). Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Aust. J.Agric. Res.* 52, p.1043-1007.

## **Références bibliographiques**

- 56) Laouar M, Abdelguerfi A. (1999). Variabilité de la production des gousses et des grains chez quelques populations spontanées de *Medicago intertexta*. Options Méditerranéennes 39: 111- 117.
- 57) Laouar M, Abdelguerfi A. (1999). Variabilité de la production des gousses et des grains chez quelques populations spontanées de *Medicago intertexta*. Options Méditerranéennes 39: 111- 117.
- 58) Laouar M, Abdelguerfi A. (2003). Variabilité morphologique et phénologique chez deux taxa très proches. *Medicago ciliaris* et *Medicago intertexta*. INRAA. 263- 264.
- 59) Lesins K.A. & Lesins I. (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Junk Publishers.
- 60) Lesins KA, Lesins I. (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Dr. W. Junk bv Publishers, The Hague-Boston-London.
- 61) Lesins KA, Lesins I. (1979). Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study. Dr. W. Junk bv Publishers, The Hague-Boston-London.
- 62) Lewin B. (1992). Genes. Flammarionmédecine-sciences, Paris.
- 63) Lewis G P; Schrire B; Mackinder B; Lock M. 2005. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens Kew.
- 64) Loi A, Nutt BJ, McRobb R, Ewing MA. (2000). Potential new alternative annual pastyre legume for Australian Mediterranean farming system. Cahiers Options Méditerranéennes, vol. 45: 51-54.
- 65) Maposa .Y and Jideani V. (2017). The Role of Legumes in Human Nutrition. Improving Health through Adequate Food chapter. Edited by Maria Chavarri Hueda. In the book: Functional Foods
- 66) MARCHAND, L. L., 1999 Combined influence of genetic and dietary factors on colorectal cancer incidence in Japanese Americans. J Natl Cancer Inst Monogr: 101-105
- 67) Medoukali A. (2016). Évaluation de la diversité génétique chez *Medicago* spp. en Algérie. Université de Constantine 1.
- 68) Medoukali I, Bellil I, Khelifi D. (2015). Morphological and Isozyme Variation in Natural Populations of the Genus *Medicago* L. Prospected in Northern Algeria. Not. Bot. Hort. Agr. Cluj-Napoca. 43(1), 86-95.
- 69) Medoukali, i. (2016). Les genres *Medicago* L. et *Trifolium* L. en Algérie : Diversité morphologique, biochimique et moléculaire. Thése de Doctorat : Biochimie et Biotechnologies. Constantine, Université Frères Mentouri.

## Références bibliographiques

- 70) Mollier, A., 2014. La modélisation des relations sol-plante : l'exemple du phosphore. In S. Pellerin, F. Butler, C. Van La-them, et S. Recous (Éd.), *Fertilisation et Environnement: Enjeux et perspectives pour l'aide à la décision*, Paris, Quae, 202-216.
- 71) Moore G.A. (2001). Oranges and lemons : clues of the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends Genet.* 17(9) 536-540.
- 72) Moraes PLR, Nehme CJ, Alves MC, Teresa M, Derbyshire MT, Cavalheiro AJ (2007) Chemical composition of flavonoids and styrylpyrones and the genetic variability of isozymes in natural populations of *Cryptocarya mandiocana* Meisner (Lauraceae). *Biochemical systematics and Ecology* 35: 233-244.
- 73) Mylona P; Pawlowski K; Bisseling T; 1995. Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* 17,869-885.
- 74) Nègre R. (1959). Révision des *Medicago* d'Afrique du Nord. *Bull. Soc. Hist. Nat. De L'Afrique du Nord* 50,267-3 14.
- 75) Niyah njike G., Watcho P., Nguelefack T B., Kamanyi A. 2005. Hypoglycaemic activity of the leaves of *Bersamaengleriana* in rats. *Afr J Trad.* Vol. 2(3): 215-221p
- 76) Ollivier, L., & Foulley, J.-L. (2013). Mesure et évolution de la diversité génétique des plantes cultivées et des Animaux Domestiques. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture*, 99(2), pp. 31-41
- 77) Ozenda P., 1991. Flore et végétation du Sahara. Paris : 3ème édition CNRS. 279-280 p.
- 78) Parizeau ME. (1997). La biodiversité. Edition de boeck, Bruxelles
- 79) Piano, E., & Francis, C. (1992). The annual species of *Medicago* in the Mediterranean region, ecogeography and related aspects of plant introduction and breeding. *Proceedings of the Xth International Conference of the EUCARPIA Medicago spp Group*, 373–385.
- 80) Piano, E., Pusceddu, S., & Spanu, F. (1991). Observations on the distribution and ecology of annual medics and subterranean clovers in Sicily (Italy). In *PROC IVème cong int. terre de parcours*, Montpellier, 405–409.
- 81) Prat. D , Faivre Rampant. A , Prado. 2006 : « Analyse du Génome et Gestion des ressources génétique forestières ». INRA Edition. p456.
- 82) Prevost A, Wilkinson MJ. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* vol. 98: 107-112.
- 83) Prolea D (2002) Espèces et utilisations, des ressources en protéines à redécouvrir : les plantes fourragères prairiales – la luzerne. Institut du Végétal et de l'Institut de l'Élevage. GNIS, Paris. pp. 4-7.

## Références bibliographiques

- 84) Prosperi, JM, Olivviers I, Angevain M, Nausat P. (1993). Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétique des luzernes méditerranéennes. Le Courrier de l'environnement de l'INRA.P, 1-12.
- 85) Quézel, P. et Santa, S., 1962. Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales Tome I. Paris : Centre National de la Recherche Scientifique. 462-558 p.
- 86) Quiros CF, Bauchan GR. (1988). The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. In : Hanson AA, Barnes DK, Hill RR (eds) Alfalfa and Alfalfa Improvement. pp 93- 124.
- 87) Ronfort J, Bataillon T, Santoni S, Delalande M. (2006). Microsatellite diversity and broad scale geographic structure in a model legume : building a set of nested core collection for studying naturally occurring variation in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol.* 6, 28
- 88) Sakhraoui, N., Boussouak, R., Metallaoui, S., Chefrou, A., & Hadef, A. (2020). La flore endémique du Nord-Est algérien face à la menace des espèces envahissantes. BOUKRI, M., FARSI, M. N., MEBARKI, A., NAILI, M., Belazougui, M. O. H. A. M. E. D., Amellal, O. M. A. R., & Guessoum, N. B. (2017). Seismic vulnerability appraisal according to the Algerian building context. *WIT Transactions on the Built Environment*, 172, 109-17.
- 89) Schlarbaum, S. E., Small, E., & Johnson, L. B. (1984). Karyotypic evolution, morphological variability and phylogeny in *Medicago* sect. Intertextae. *Plant Systematics and Evolution*, 145(3), 203–222. <https://doi.org/10.1007/BF00983949>
- 90) Schneider A ; Huyghe C. 2015. Les légumineuses pour des systèmes agricoles et alimentaires durables .Editions Quae. P.512
- 91) Simon J.P., 2005. Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les legumineuses. Préparés pour Lewis G.P., Schrire B.D., Mackinder B.A., Lock J.M., 2003. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK. Département de Sciences biologiques. Université de Montréal
- 92) Simon, J. P., & Simon, A. (1965). Relationship in annual species of *Medicago*. I. Number and morphology of chromosomes. *Australian Journal of Agricultural Research*, 16(1), 13–50. <https://doi.org/10.1071/ar9650013>
- 93) Small E, Jomphe M. (1989). A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 67:3260-3294
- 94) Small E, Jomphe M. (1989). A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canadian Journal of Botany* 67:3260-3294.

## **Références bibliographiques**

- 95) Small, E. (2011). Alfalfa and Relatives: Evolution and Classification of *Medicago*. NRC Research Press.
- 96) Smýkal P. et al. (2011). Genetic diversity of legumes assessed by molecular markers. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 30(5): 429–447.
- 97) Tučak M, Popović S, Čupić T, Grljušić S, Bolarić S, Kozumplik V. (2008). Genetic diversity of alfalfa (*Medicago* spp.) estimated by molecular markers and morphological characteristics. *Periodicum Biologorum* 110:243-249.
- 98) Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M. et Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160: 1–40p.
- 99) Vienne. (1998). Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales. INRA, Paris.
- 100) Wang H F., Yih K H., and Huang K F. 2010. Comparative study of the antioxidant activity of forty-five commonly used essential oils and their potentialactive components. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 18, №1, pp. 24-33p
- 101) Yahiaoui, S. (Institut N. de la R. A., & Abdelguerfi, A. (1999). Growth and phenology of some *Medicago ciliaris* populations: Interaction with the site of origin. *Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM)*. 9. Meeting of the Mediterranean Sub-Network of the FAO-CIHEAM Inter-Regional Cooperative Research and Development Network on Pastures and Fodder Crops, Badajoz (Spain), 26-29 Nov 1997.<https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QC1999000056>
- 102) Zhu, H., Briceno, G., Dovel, R., Hayes, P. M., Liu, B. H., Liu, C. T., & Ullrich, S. E. (1999). Molecular breeding for grain yield in barley: an evaluation of QTL effects in a spring barley cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 772-779.
- 103) Zivković B, Radović J, Sokolović D, Xiler B, Banjanac T, Strbanović R. (2012). Assessment of genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa* L.) genotypes by morphometry, seed storage proteins and RAPD analysis. *Industrial Crops and Products* 40 :285-291.
- 104) Zoghlami, A., Hassen, H., Seklani, H., Robertson, L., & Salkini, A. K. (1996). Distribution des luzernes annuelles en Tunisie centrale en fonction des facteurs edaphiques et climatiques [Microforme]. *Fourrages*, 145, 5–16.

# **Annexes**

**ANNEXE 1. Protocole de germination**

- Mettre les grains dans 5 volumes de l'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), concentré pendant 8 min avec une agitation intermittente.
- Mettre les grains dans 5 volumes de 5% de sodium hypochlorite pendant 3 min
- Décanter l'eau de javel sous des conditions stériles (haute à flux laminaire).
- Rincer les grains par de l'eau distillée stérile 6 à 8 fois.
- incuber les graines pendant 1 heure dans le dernier rinçage.
- une fois gonflée, elles sont déplacé sur du milieu agar (7g/l) (6.7% d'agar) et incuber à 4°C pendant 3jours, puis à 14°C pendant 24 heures à l'abri de la lumière.

## ANNEXE 2. Extraction de l'ADN

D'après la méthode de Doyle et Doyle 1990.

- Préchauffer le tampon **CTAB 2X additionné de Beta-mercaptopropanoïde** dans un bain marie à 65 °C.
- Broyer le matériel végétal (environ 150 mg) dans un mortier avec l'azote liquide (manipuler avec les gants)
- A l'aide de spatule, transférer le broyat dans un tube à vis (mettez les tubes contenant le broyat dans l'azote liquide, bien fermer les tubes)
- Ajouter **900 µL** de tampon **CTAB 2X additionné de Beta-mercaptopropanoïde** préchauffé à 65 °C.
- Homogénéiser au vortex et incuber 60 min dans un bain marie à 65 °C avec agitation. - Centrifuger 15 min à 10 000 rpm à 4 °C.
- Récupérer le surnageant ( $\approx$  800 µL) dans un nouveau tube d'eppendorf de 2 mL (stocker le culot à 4 °C à l'abri de la lumière).
- Ajouter 800 µL (1vol) **chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1)**
- Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites).
- Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C.
- Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'eppendorf. (Éviter de prendre la couche blanche au milieu).

### Pour un meilleur résultat, répéter cette dernière étape :

- Ajouter 800 µL (1vol) chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1). Agiter pendant 45 min à vitesse lente (100 à 150 rpm) sur une table d'agitation (faire attention aux fuites). Centrifuger 15 min à 10000 rpm à 4°C. Récupérer la phase aqueuse supérieure à l'aide de micropipette P1000 et la mettre dans un nouveau tube d'eppendorf.
- Ajouter 3 à 5 µl de **RNase A (10 mg/ml)**, agiter par inversion et incuber 30 min à 37 °C.
- Ajouter 540 µl (2/3 Vol) **d'Isopropanol froid (-20°C)**
- Inverser les tubes doucement jusqu'à l'apparition d'une pelote blanche. - Laisser précipiter à -20 °C pendant 5 à 10 min. - Centrifuger 10 min à 10000 rpm à 4 °C.
- Eliminer le surnageant très délicatement (à l'aide de micropipette) - Ajouter 500 µl de **Solution de lavage 1**.
- Incuber pendant 15 min à température ambiante.
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Eliminer le surnageant et ajouter 500 µl de **solution de lavage 2**.
- Ne pas incuber plus de 5 min
- Centrifuger 5 min à 10000 rpm à 4 °C
- Eliminer le surnageant et sécher l'ADN à l'air libre pendant 10 à 20 min. - Suspendre le culot d'ADN dans 100 µl de **TE 0.1X**
- Stocker l'ADN pendant une nuit à 4 °C avant dosage.

### Solutions et tampons

#### Tampon CTAB 2X (pH 8) (Stocker à température ambiante)

- CTAB	20	g	2 % (p/v)
- Tris de base	12.11	g	100 mM
- Na <sub>2</sub> EDTA	7.44	g	20 mM
- NaCl	81.8	g	1.4 M
- PVP 40	10	g	1 % (p/v)
- H <sub>2</sub> O up	Qsp 1	L	

- Commencer par dissoudre le CTAB à la chaleur (50°C) dans 800 ml d'eau up, puis ajouter dans l'ordre les autres produits.
- Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl 1 M, puis compléter le volume à 1 litre. - Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120°C.

#### Chloroforme/Alcool isoamylique (24 :1)

Pour 25 ml : Ajouter 24 ml Chloroforme + 1 ml Alcool isoamylique

#### Tampon de dissolution d'ARNase

- Tris	0,12	g	10 mM
- NaCl	0,88	g	15 mM
- H <sub>2</sub> O up	Qsp 1	L	

- Mettre sous agitation dans 900 ml d'eau up.
- Ajuster le pH à 7.5 par addition d'HCl puis compléter au volume final avec l'eau ultra pure.
- Aliquoter en bouteilles et stériliser 20 min à 120°C. - Stocker à température du laboratoire.

#### RNAse A (10 mg/ml)

- Dissoudre 100 mg de RNAse A dans 10 ml de ce tampon de dissolution.
- Aliquoter en tubes vissables de 2 ml
- Traiter 15 min à 100 °C au bain marie - Laisser refroidir à température du laboratoire - Stocker au congélateur à -20 °C.

#### Solution Lavage 1

- Acétate de 1.6 g 200 mM

#### Sodium

- Eau distillée 24 mL
- Dissoudre l'acétate de sodium avant d'ajouter l'éthanol
- Ethanol 100 % Qsp 100 mL

**TE 1X (pH 8)**

- Tris de base      0.12      g      10 mM
- Na<sub>2</sub> EDTA      0.04      g      1 mM
- H<sub>2</sub>O up      Qsp 100      ml
- Ajouter de l'H<sub>2</sub>O up jusqu'à 90 % du volume

- Ajuster le pH à 8.0 avec l'HCl fumant. - Compléter le volume.
- Stériliser 15-20 minutes à l'autoclave à 120 °C. Stocker à température ambiante.

Les concentrations mentionnées correspondent aux concentrations finales.

Remplir une fiche solution en notant toutes les informations disponibles. Noter date, nom du produit et numéro du lot de la solution sur le flacon.

**ANNEXE 3. CONTROLE DE QUALITE « Electrophorèse sur gel d'agarose »**

- Préparer un gel d'agarose 0.8% dans du **TBE 1X**
- Déposer 5 µL (soit 500 ng) de chaque échantillon
- Faire migrer l'ADN 15 min. à 100V
- Colorer le gel d'agarose 10 min. dans une solution BET à 2 µg/mL  
**Attention :** le BET est un mélange puissant, respecter les consignes de sécurité et travailler avec des gants
- Prendre une photo du gel sous UV
- **Attention :** les UV peuvent causer des brûlures graves, respecter les consignes de sécurité

**ANNEXE 4. Protocole expérimental pour l'analyse de l'ADN par SSR**

Préparer le mélange réactionnel (ou « Mix ») comme suit :

- Eau pure stérile	6.5	µL
- Tampon 10X	3	µL
- MgCl <sub>2</sub> 25 mM	1.2	µL
- dNTP mix 10 mM	2.4	µL
- Amorces (sens et anti-sens) 10 µM	1.8	µL
- Taq (2.5 U)	0.3	µL
- ADN (50 ng/µL)	3	µL
Volume finale	20	µL

Réaliser l'amplification selon le programme suivant :

Etape	Température °C	Temps	Nombre de cycles
Dénaturation initiale	95	5 min.	1
Dénaturation	94	45 s	35
Hybridation	55	45 s	
Elongation	72	1 min.	
Elongation finale	72	10 min.	1

**Gel de Polyacrylamide à 8%**

-Acrylamide-bisacrylamide (29 :1)	3.2	mL
-Tampon TBE 5X	2.4	mL
-Eau distillée	6.4	mL
-APS (10%)	200	µL
-TEMED	10	µL

**Tampon TBE 10X**

-Tris	108	g
-Borate	55	g
-EDTANa <sub>2</sub>	7.44	g
-Eau distillée	Qsp 1	L

**Tampon de migration**

-TBE 0.5X

**Solution de révélation**

-BET (2mg/mL)	100	µL
-Eau distillée	100	mL

**ATTENTION :** Le bromure d'éthidium (BET) est dangereux par contact, inhalation et ingestion (agent mutagène), porter des gants doubles en latex ou des gants simples en nitrile.

# Résumés

**Résumé**

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation et de la valorisation des ressources phylogénétiques présentant un intérêt agronomique en Algérie. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence une éventuelle variabilité génétique au niveau des microsatellites, à travers l'utilisation de la technique d'amplification PCR, combinée à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ainsi qu'une analyse biométrique réalisée sur 20 accessions de l'espèce *M. ciliaris*, collectées dans divers sites écogéographiques couvrant un large éventail des étages bioclimatiques du nord de l'Algérie.

La diversité des microsatellites a été étudiée à partir d'une matrice de présence/absence des bandes. La fréquence de ces bandes a été calculée pour l'ensemble des accessions à partir de deux amores SSR. Les distances génétiques ont été estimées selon l'indice de Jaccard, et des dendrogrammes ont été construits en utilisant la méthode de groupement hiérarchique UPGMA. Par ailleurs, des matrices de distances génétiques entre les 16 accessions ont été établies. En ce qui concerne l'analyse morphologique, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée.

Au total, 17 bandes ont été générées par les deux amores SSR, dont 8 bandes pour l'amorce AFct32 et 9 pour l'amorce AFctt1. Le nombre et la fréquence des bandes varient d'une accession à l'autre. Certaines bandes sont partagées par deux ou trois accessions, tandis que d'autres sont spécifiques à une accession donnée. Le polymorphisme observé a été confirmé par la classification hiérarchique des accessions. En complément, les résultats de l'ACP révèlent une grande diversité génétique entre les accessions étudiées, en soulignant une certaine corrélation avec leur origine écogéographiques.

Les résultats montrent qu'il existe une diversité génétique entre les populations de *M. ciliaris* en Algérie. La détermination de cette différence est attribuée aux marqueurs utilisés.

**Mots-clés :** Microsatellites, Polymorphisme, Algérie, *M. ciliaris*, morphologie, PCR, AFct32, AFctt1, ADN.

### **Abstract**

This work is part of the evaluation and valorization of phylogenetic resources of agricultural interest in Algeria. The objective of this study is to highlight potential genetic variability at the microsatellite level, using PCR amplification combined with polyacrylamide gel electrophoresis, as well as biometric analysis performed on 20 accessions of the species *M. ciliaris*, collected from various ecogeographic sites covering a wide range of bioclimatic zones in northern Algeria.

Microsatellite diversity was studied using a band presence/absence matrix. Band frequencies were calculated for all accessions using two SSR primers. Genetic distances were estimated using the Jaccard index, and dendograms were constructed using the UPGMA hierarchical clustering method. In addition, genetic distance matrices were established between the 16 accessions. For morphological analysis, a principal component analysis (PCA) was performed.

A total of 17 bands were generated by the two SSR primers, including 8 bands for the AFct32 primer and 9 for the AFctt1 primer. The number and frequency of the bands varied from one accession to another. Some bands were shared by two or three accessions, while others were specific to a given accession. The observed polymorphism was confirmed by hierarchical classification of the accessions. In addition, the PCA results revealed a high genetic diversity between the accessions studied, highlighting a certain correlation with their ecogeographic origins.

**Keywords:** Microsatellites, Polymorphism, Algeria, *M. ciliaris*, morphology, PCR, AFct32, AFctt1, DNA

## ملخص

هذا العمل جزء من تقييم وتنمية الموارد الوراثية ذات الأهمية الزراعية في الجزائر. تهدف هذه الدراسة إلى تسليط الضوء على التباين الوراثي المحتمل على مستوى الميكروساناتلايت، باستخدام تصخيم تفاعل البوليميراز المتسلسل (PCR) مع الرحلان الكهربائي للهلام متعدد الأكريلاميد، بالإضافة إلى التحليل البيومترى الذى أُجرى على 20 عينة من نوع *M. ciliaris*، جُمعت من موقع جغرافية بيئية متنوعة تغطي نطاقاً واسعاً من المناطق المناخية الحيوية في شمال الجزائر. درست تنوع الميكروساناتلايت باستخدام مصفوفة حضور/غياب النطاق. حُسبت ترددات النطاق لجميع العينات باستخدام بادئين قدرت المسافات الوراثية باستخدام مؤشر Jaccard ، وأنشئت مخططات شجرية باستخدام طريقة التجميع الهرمي UPGMA. بالإضافة إلى ذلك، وضع مصفوفات المسافة الوراثية بين العينات الستة عشر. ولتحليل المورفولوجي، أُجرى تحليل المكونات الرئيسية (PCA). تم توليد ما مجموعه 17 نطاقة بواسطة بادئي SSR ، بما في ذلك 8 نطاقات لبادئ AFctt1 و 9 نطاقات لبادئ AFct32. تفاوت عدد وتكرار هذه النطاقات من عينة إلى أخرى. بعض النطاقات مشتركة بين مجموعتين أو ثلاث عينات، بينما كانت أخرى خاصة بمجموعة محددة. تم تأكيد تعدد الأشكال الملاحظ من خلال التصنيف الهرمي للعينات. بالإضافة إلى ذلك، كشفت نتائج تحليل المكونات الرئيسية (PCA) عن تنوع وراثي كبير بين العينات المدروسة، مما يُبرز وجود ارتباط وثيق بأصولها البيئية الجغرافية.

**الكلمات المفتاحية:** الوسائل المکروية، تعدد الأشكال،الجزائر، *M. ciliaris*، مورفولوجي، PCR، AFctt1، AFct32، ADN.

**Thème :** Etude de la diversité génétique au sein de *Medicago ciliaris* Algérienne par les marqueurs morphologique et moléculaires

## Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Sciences Biologiques Spécialité Biochimie

### Résumé

Le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation et de la valorisation des ressources phylogénétiques présentant un intérêt agronomique en Algérie. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence une éventuelle variabilité génétique au niveau des microsatellites, à travers l'utilisation de la technique d'amplification PCR, combinée à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, ainsi qu'une analyse biométrique réalisée sur 20 accessions de l'espèce *M.ciliaris*, collectées dans divers sites écogéographiques couvrant un large éventail des étages bioclimatiques du nord de l'Algérie.

La diversité des microsatellites a été étudiée à partir d'une matrice de présence/absence des bandes. La fréquence de ces bandes a été calculée pour l'ensemble des accessions à partir de deux amores SSR. Les distances génétiques ont été estimées selon l'indice de Jaccard, et des dendrogrammes ont été construits en utilisant la méthode de groupement hiérarchique UPGMA. Par ailleurs, des matrices de distances génétiques entre les 16 accessions ont été établies. En ce qui concerne l'analyse morphologique, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée.

Au total, 17 bandes ont été générées par les deux amores SSR, dont 8 bandes pour l'amorce AFct32 et 9 pour l'amorce AFctt1. Le nombre et la fréquence des bandes varient d'une accession à l'autre. Certaines bandes sont partagées par deux ou trois accessions, tandis que d'autres sont spécifiques à une accession donnée. Le polymorphisme observé a été confirmé par la classification hiérarchique des accessions. En complément, les résultats de l'ACP révèlent une grande diversité génétique entre les accessions étudiées, en soulignant une certaine corrélation avec leur origine écogéographiques.

Les résultats montrent qu'il existe une diversité génétique entre les populations de *M. ciliaris* en Algérie. La détermination de cette différence est attribuée aux marqueurs utilisés

**Mots-clefs :** Microsatellites, Polymorphisme, Algérie, *M. ciliaris*, morphologie, PCR, AFct32, AFctt1, ADN.

**Laboratoires de recherche :** 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 U Constantine 1 Frères Mentouri).

**Présidente du jury :** BENSARI S. (MCB) - UConstantine1 Frères Mentouri)

**Encadrante :** MEDOUKALI I. (MCB) UConstantine1 Frères Mentouri)

**Examinateuse :** OUELBANI R. (MCB) UConstantine1 Frères Mentouri)