

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

Université Constantine1



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

Mémoire

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

Thème

*Etude de l'effet du manque d'eau sur la
régulation de l'expression de quelques gènes
chez des génotypes de luzerne annuelle.*

Présenté par : M^{lle} ZAIM Amina.

Soutenu le : 22 juin 2014.

Devant le jury d'évaluation :

Présidente : Pr. YKHLEF Nadia.

Prof. Université Constantine1.

Encadreur : Mr. TEMAGOULT Mahmoud.

M.A.A. Université Constantine1.

Examinatrice : Mme. GHIOUA Karima.

M.A.A. Université Constantine1.

Année universitaire 2013-2014

Remerciement

C'est avec beaucoup de reconnaissance que j'adresse mes sincères remerciements à Mr. TAMAGHOULT Mahmoud, maître assistant à l'Université Constantine1 pour avoir suivi et dirigé ce travail. Son aide, ses conseils, ses orientations m'ont été d'un apport précieux.

Je tiens également à remercier les membres du jury, M^{lle} YKHELLEF Nadia, Professeur à l'université Constantine1 et Mme. GHIOUA Karima, maître assistante à l'Université Constantine1 qui ont accepté de juger ce travail.

Mes vifs remerciements vont à toute l'équipe de laboratoire de Biochimie génétique et Biotechnologies végétales Mr. BELBEKRI Nadir, ingénieur de laboratoire, ainsi que M^{lle}. BOULDJADJ Rima.

Je remercie également M^{lle}. MOUELLEF Adra pour son aide.

Toute ma gratitude à tous les BTGViste de ma promotion.

De peur d'oublier des noms, je remercie mes enseignant depuis la première année, et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



Dédicace

Je dédie cordialement ce modeste travail de fin d'étude à :

- *Mes chers parents pour leurs soutient, pour leurs encouragement, et qui ont toujours espère réussir, que dieu les gardes en leurs souhaitant une longue vie pleine de santé et de bonheur.*
- *Mon cher YAZID et sa famille.*
- *Ma petite Lola , Mes sœurs : KOUKA et ses enfant AMDJED et ASSIL, HANNEN et ses enfant JIJI et BIDJED, AMEL, et mon frère unique KHALED.*
- *En fin à tous les personnes qui m'aiment.*



Etude de l'effet du manque d'eau sur la régulation de l'expression de quelques gènes chez des génotypes de luzerne annuelle.

Résumé:

L'objectif de ce travail est d'étudier les modifications induites par le manque d'eau sur l'expression des gènes HD et MYB qui codent pour des facteurs de transcription chez quatre génotypes de luzerne annuelle : *Medicago truncatula* (souche Jemalong A17), un mutant *M. truncatula*, *M. ciliaris* et *M. minima*.

Les résultats obtenus montrent que le stress hydrique a entraîné une augmentation de la résistance stomatique chez tous les génotypes étudiés et que ce paramètre retrouve des valeurs semblables à celle du témoin après réhydratation.

En même temps, les résultats de la PCR semi quantitative montrent que le gène HD est s'exprime de façon différentielle chez l'espèce *M.minima* vis-à-vis le manque d'eau.

Mots clés:

Medicago, stress hydrique, régulation génique, PCR semi-quantitative.

Study of drought impact on the expression of some gene in annual medic genotypes.

Abstracts:

The aim of this study is the exploration of water deficit impact on the expression of the HD and MYB transcriptional factor genes in four genotypes of annual medic: *Medicago truncatula* (Jemalong strain A17), a mutant *M. truncatule*, *M. ciliaris* and *M. minima*.

The results show that water stress resulted in an increase in stomatal resistance in all genotypes studied and found that this parameter similar to the control values after rehydration.

At the same time, the results of the semi-quantitative PCR showed that the HD gene is expressed differentially in the species *M.minima* vis-à-vis the lack of water.

Keywords:

Medicago, water stress, gene regulation, semi-quantitative PCR.

Liste d'abréviation :

A17 : Souche de référence Jemalong A17.

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

BET : Bromure d'éthidium.

DEPC : Diethylpyrocarbonate.

dNTP : Mélange des quatre désoxyrébonucléique.

H : Réhydraté.

Hb1: Mutant de *Medicago truncatula*.

M: *Medicago*.

Mt-Act: Gène de référence Actine de *Medicago truncatula*.

PCR : *Polymerase chain reaction*.

RT-PCR : *Reverse transcriptase PCR*.

R.S : Résistance stomatique.

S : stressé.

T : Témoin.

TBE : Tris Borate EDTA.

Liste des figures :

	Page :
Figure 1 : Cycle de développement de la luzerne pérenne.....	9
Figure 2 : <i>Medicago truncatula</i>	11
Figure 3 : Variation de la résistance stomatique R.S chez les génotypes étudiés.....	24
Figure 4 : Résultats de la vérification de la présence des gènes ciblés dans les échantillons ADNc synthétisé.....	28
Figure 5 : Résultat de la vérification de l'expression génétique.....	29

Liste des tableaux :

	Page :
Tableau 1 : Classification des différentes espèces du genre <i>Medicago</i>	7
Tableau 2 : Le stade de développement de quelques espèces de <i>Medicago</i>	10
Tableau 3 : Les géotypes utilisées et ses coordonnées géographiques des lieux de collecte.....	16
Tableau 4 : Composition de cDNA synthesis mix.....	20
Tableau 5 : Composition du mix PCR pilote.....	21
Tableau 6 : Composition du mix PCR semi-quantitative.....	22
Tableau 7 : Analyse de la variance avec un intervalle de confiance de 95%.	24
Tableau 8 : Le test de <i>Newman Keuls</i> pour l'analyse de la variance entre les groupes en fonction de niveau.....	25
Tableau 7 : Le test de <i>Newman Keuls</i> pour l'analyse de la variance entre les groupes en fonction de géotype avec un intervalle de confiance de 95%.....	25
Tableau 8 : Quantité d'ARN extraits des racines de 4 géotypes étudiés.....	27

Table des matières :

	Page :
Introduction.....	1
Chapitre I: Revue Bibliographique	
I.1. Le stress hydrique.....	3
I.1.1. Définition.....	3
I.1.2. Effets du stress hydrique sur les plantes.....	3
I.1.3. Aspects moléculaires de la réaction des plantes soumises au manque d'eau.....	4
I.1.4. Stratégies développées par les plantes.....	5
I.2. Le genre <i>Medicago</i>	6
I.2.1. Botanique.....	6
I.2.2. Systématique.....	6
I.2.3. Biologie.....	9
I.2.5. Le modèle biologique <i>Medicago truncatula</i>	11
I.2.5.1. Présentation générale.....	11
I.2.5.2. Outils d'étude développés pour <i>M. truncatula</i>	12
Chapitre II: Matériels et Méthodes	
II.1. Matériel végétal.....	16
II.2. Méthodes.....	16
II.2.1. Conduite de l'essai.....	16
II.2.1.1. Prégermination des graines.....	16
II.2.1.2. Conditions de culture.....	17
II.2.1.3. Stade de mesure et application du stress.....	17
II.2.2. Paramètres mesurés.....	17
II.2.2.1. La résistance stomatique.....	17
II.2.2.2. Mesure du degré d'expression des gènes HD et MYB.....	18

II.2.2.2.1.	Extraction des ARN totaux.....	18
II.2.2.2.2.	Purification et application de l'ADNase.....	19
II.2.2.2.3.	Dosage des ARN totaux.....	19
II.2.2.2.4.	Réaction de la transcription réverse.....	19
II.2.2.2.5.	La PCR Pilote.....	20
II.2.2.2.6.	Quantification des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose..	21
II.2.2.2.7.	La PCR semi quantitatives.....	21
II.2.2.2.8.	La révélation.....	22

Chapitre III: Résultats et Discussion

III.1.	La résistance stomatique.....	24
III.2.	Mesure du degré d'expression des gènes HD et MYB.	27
III.2.1.	Dosage des ARN totaux.....	27
III.2.2.	Réaction de la rétrotranscription et PCR pilote.....	27
III.2.3.	La PCR semi quantitative.	29
	Conclusion.....	32
	Références Bibliographique.....	33

Introduction

Introduction

Le nord algérien est une zone qui couvre différents étages bioclimatiques caractérisés par des sécheresses répétées et plusieurs autres contraintes environnementales. Cette diversité climatique est accompagnée par une diversité floristique caractéristique de chaque région.

Afin de valoriser les ressources phytogénétiques en Algérie, l'étude des espèces sauvages à intérêt agronomique s'avère d'une importance essentielle. C'est le cas des espèces annuelles du genre *Medicago* qui présentent une grande diversité génétique et une importante répartition géographique qui renseigne sur un très grand pouvoir d'adaptation aux différentes contraintes environnementales. Ces espèces qui appartiennent à la famille des légumineuses représentent un important réservoir de gènes qui peuvent être utilisés en recherche fondamentale et appliquée. En plus, le genre *Medicago* compte deux espèces parmi les plus étudiées et les mieux caractérisées génétiquement. Ces espèces sont *Medicago truncatula* qui a été proposée par la communauté scientifique comme modèle d'étude des légumineuses, et la luzerne cultivée *Medicago sativa*.

Le manque d'eau est l'une des plus importantes contraintes environnementales pénalisant la croissance et le rendement chez les végétaux. La réponse des plantes soumises à des conditions déficitaires en eau suit le même schéma général observé dans le cas d'autres contraintes environnementales et se traduit par un ensemble de changements physiologiques et morphologiques contrôlés à la base par des mécanismes moléculaires de régulation de l'expression génétique.

La régulation de l'expression des gènes chez les plantes exposées aux contraintes environnementales, notamment le manque d'eau, se traduit par des modifications quantitatives et qualitatives du profil des produits de gènes exprimés et dont l'étude a montré que certains gènes sont surexprimés, d'autres sont réprimés, alors que d'autres sont induits.

Dans ce contexte, le présent travail s'intéresse aux modifications induites par le manque d'eau sur l'expression des gènes *MYB* et *HD* chez deux génotypes de la plante modèle *Medicago truncatula* (souche Jemalong A17) ainsi que chez deux autres espèces du même genre : *M. ciliaris* et *M. minima*.

Le mémoire sera présenté sous forme de trois chapitres :

- Une revue bibliographique relative aux composantes essentielles du thème à savoir le manque d'eau son effet multidimensionnel, le genre *Medicago*, notamment le modèle biologique *Medicago truncatula* et les outils développés pour son études.
- La deuxième partie se focalise sur le matériel végétal utilisé ainsi que sur les différentes techniques utilisées pour étudier l'expression des deux gènes étudiés sous l'effet d'un stress hydrique.
- Les résultats obtenus avec ces différentes méthodes sont présentés et discutés dans la troisième partie.

Enfin, le travail se termine par une conclusion générale avec le dégagement de quelques perspectives.



Chapitre I

Revue Bibliographique

I.1. Le stress hydrique :

I.1.1. Définition :

Lorsqu'on parle de l'alimentation hydrique d'une plante, trois termes « déficit, contrainte et stress » sont souvent utilisés sans distinction pour caractériser les relations au sein du continuum sol- plante- atmosphère (Jérémie, 2007). On parle de déficit hydrique chez les plantes lorsque l'approvisionnement en eau à leurs racines devient faible ou si le taux de transpiration devient intense par rapport à la quantité d'eau absorbée (Seyed *et al.*, 2012).

Donc le stress hydrique est un stress abiotique et l'un des principaux facteurs limitant la croissance et la production (Cornic et Massacci, 1996), qui peut résulter d'une faible disponibilité en eau dans la portion de sol explorée par les racines et/ou d'une forte demande évaporatrice au niveau des feuilles (Jérémie, 2007).

I.1.2. Effets du stress hydrique sur les plantes :

Le stress hydrique est de nature multidimensionnelle car il affecte les plantes à différents niveaux de leur organisation suivant sa durée, son intensité, le stade de développement de la plante ainsi que le génotype de cette dernière et son interaction avec l'environnement (Yokota *et al.*, 2006).

Selon la durée de l'exposition, on peut classer les effets du manque d'eau en trois catégories :

I.1.2.1. Effets à court terme :

Lors d'un déficit hydrique, l'activité physiologique de la feuille, et plus particulièrement la photosynthèse et la conductance stomatique sont affectées (Lowlor et Cornic, 2002). La réduction de la photosynthèse, liée à la diminution du potentiel hydrique foliaire, est supposée dépendre à la fois de la fermeture des stomates, avec pour conséquence une diminution de la conductance à la diffusion du CO₂ et d'une limitation biochimique du chloroplaste à fixer le CO₂ (Tradieu et Simoneau, 1998 ; Escalona *et al.*, 1999 ; Flexas et Medrano, 2002.)

La régulation de la conductance stomatique reste le mécanisme majeur intervenant à court terme pour limiter les pertes en eau : le potentiel hydrique foliaire sera maintenu d'autant plus longtemps que la fermeture des stomates est précoce (Bota *et al.*, 2001).

En outre, quand les stomates sont fermés sous l'effet d'une contrainte hydrique et l'assimilation du CO₂ est réduite, la réduction photosynthétique de l'oxygène par la photorespiration augmente et sert comme consommateur de l'excès de l'excitation

énergétique de l'appareil photosynthétique (Escalona *et al.*, 1999 ; Baker et Rosenqvist, 2004).

Donc, c'est l'ouverture plus ou moins importante des stomates qui permet à la plante de faire varier dans une certaine mesure la quantité d'eau transpirée.

I.1.2.2. Effet à moyen terme :

Lors d'un stress hydrique de faible intensité, le potentiel hydrique de la plante peut être maintenu par un ajustement osmotique. Cet ajustement implique l'accumulation, au niveau cellulaire, de sucres, d'acides aminés, d'ions ou d'autres solutés compatibles c'est-à-dire non toxiques. L'accumulation d'osmolites permet de créer un influx d'eau dans la cellule ou tout du moins d'éviter un efflux, en augmentant la force de rétention des molécules d'eau. Le maintien de cette quantité d'eau permet ainsi de conserver la turgescence nécessaire à la croissance des cellules. Il semble que cette accumulation d'osmolites soit reliée au maintien de l'intégrité des protéines et des membranes (Crowe *et al.*, 1992).

I.1.2.3. Effet à long terme :

Des modifications morphologiques, anatomiques, physiologiques et développementales de la plante sont observées dès qu'une sécheresse s'installe (Boyer, 1970 ; Lamaze *et al.*, 1994). Elles comprennent principalement une réduction de la surface foliaire qui peut provenir d'une diminution de l'expansion foliaire et/ou d'une sénescence accélérée de la feuille (Kramer et Boyer, 1995).

La diminution de la surface foliaire est accompagnée par un repliement des parois cellulaires. Le volume total des cellules est alors diminué (jusqu'à 78%) (Jill, 2000).

I.1.3. Aspects moléculaires de la réaction des plantes soumises au manque d'eau :

De nombreuses données moléculaires, permettent cependant d'élucider les principaux mécanismes cellulaires mis en place par la plante lors d'un stress hydrique. L'expression des gènes en réponse à un déficit hydrique fait intervenir une cascade de transduction du signal extrêmement complexe et la perception du stimulus, implique l'amplification et l'intégration du signal qui va réguler l'expression des gènes (Dubos, 2001).

Les hormones peuvent être impliquées dans la transmission du signal, l'augmentation du niveau d'ABA endogène est une caractéristique d'un état de stress hydrique chez de nombreuses espèces. De nombreux gènes induits par l'ABA ont été

identifiés. Cependant, tous les gènes qui répondent au stress hydrique ne sont pas forcément induits par l'ABA. Il existe donc deux types d'inductions, l'une ABA dépendante et l'autre ABA indépendante (Dubos, 2001).

Cette régulation de l'expression des gènes au cours du stress hydrique s'opère, au niveau de l'ADN génomique, des promoteurs, des molécules impliquées dans la signalisation du stress et des modifications post-transcriptionnelles (Dubos, 2001).

I.1.4. Stratégies développées par les plantes :

Lorsque l'alimentation hydrique est interrompue, les végétaux sont caractérisés par une grande capacité de résistance à des variations importantes de la teneur en eau du sol (Hireche, 2006). Les stratégies développées par les plantes pour faire face au manque d'eau peuvent être classées en trois catégories : l'évitement, la tolérance et l'adaptation. (Jones, 1992).

I.1.4.1.L'esquive :

La première façon d'éviter la sécheresse est l'esquive, qui est un changement dans la longévité du cycle phénologique. Elle permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets du stress hydrique en évitant que le stress ne se produise au cours d'une phase sensible ou critique (Belhassen et *al.*, 1995). Le développement phénologique rapide avec une floraison précoce, permet à la plante d'éviter les périodes sèches. Cette stratégie appliquée aux espèces cultivées a amené à décaler la date de semis et/ou à sélectionner des variétés plus précoces permettant d'éviter les déficits hydriques de fin de cycle (Attia, 2006).

I.1.4.2.La tolérance :

La tolérance est la stratégie qui permet à la plante d'assurer ses fonctions physiologiques malgré une dégradation de son état hydrique. Le maintien de la turgescence lors d'un déficit hydrique permet de retarder la fermeture des stomates (Passioura, 1996), de maintenir le volume chloroplastique et de réduire le flétrissement foliaire (Blum et Ebercon, 1981 ; Medrano et *al.*, 2003).

En outre, le maintien de la turgescence cellulaire est à la base de la préservation de plusieurs fonctions physiologiques comme la photosynthèse, la transpiration, l'assimilation du carbone et l'élongation cellulaire (Bammoun, 1997).

Cette aptitude confère à la plante une meilleure tolérance au déficit hydrique (Attia, 2006).

I.1.4.3.L'adaptation :

La sécheresse se manifeste par la combinaison d'une part, de la restriction de la disponibilité en eau du sol et, d'autre part, de l'augmentation de la demande évaporatrice.

Dans les zones arides, les plantes ont développé des mécanismes de régulation assurant leur survie, en général aux dépens de la productivité. D'un point de vue agronomique, l'adaptation à la sécheresse est la capacité de la plante à croître et donner des rendements satisfaisants dans des zones sujettes à des déficits hydriques épisodiques (Chaves et Oliveira, 2002).

I.2. Le genre *Medicago* :

I.2.1. Botanique :

Le genre *Medicago* de la famille des Fabacées (anciennement Légumineuses), constitue un groupe taxonomique largement distribué dont les centres de diversification recouvrent le pourtour méditerranéen et l'Eurasie (Saada, 2008).

Il comporte un grand nombre d'espèces qui sont soit herbacées ou arbustives, avec de fortes racines pivotantes pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur, les tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentés au sommet et présentent des inflorescences en grappes, les stipules sont larges de forme allongée ou cordiforme. Les fleurs dont la couleur varie du mauve au jaune sont portées sur un long racème qui contient jusqu'à 20 fleurs (Lapeyronie, 1982; Mathieu, 2003).

La fécondation est allogame chez les espèces vivaces et autogames chez les espèces annuelles (Prosperi et *al.*, 1993). Le fruit est une gousse plus ou moins enroulée, soit en forme de faucille, soit spiralée (de 1 à 4 spires) parfois épineuse. La graine plus ou moins réniforme est longue d'environ 10 mm (Mathieu, 2003; Hireche, 2006).

I.2.2. Systématique :

Le genre *Medicago* « luzerne » appartenant à la famille des Fabacées (ou Légumineuses) avec la position systématique suivante : (SMALL et JOMPHE, 1989)

<u>Règne :</u>	<i>Planta</i>
<u>Sous-règne :</u>	<i>Tracheobionta</i>
<u>Embranchement :</u>	Spermatophytes
<u>Sous- embranchement :</u>	Angiospermes
<u>Superdivision :</u>	Dicotylédones
<u>Division :</u>	<i>Magnoliophyta</i>
<u>Classe :</u>	<i>Magnoliopsida</i>
<u>Sous-classe :</u>	<i>Rosidae</i>
<u>Ordre :</u>	<i>Fabales</i>
<u>Famille :</u>	<i>Fabaceae</i>
<u>Sous-famille :</u>	<i>Faboideae</i>
<u>Tribus :</u>	<i>Trifolieae</i>
<u>Genre :</u>	<i>Medicago</i> (L.)

Il se divise en 4 sous genres (*Lupularia*, *Orbicularia*, *Falcago*, *Spirocarpus*) et 14 sections (Schoutteten, 2004). D’après Lesins et Lesins (1979) le genre *Medicago* comprend 55 espèces herbacées parmi lesquelles 34 sont annuelles et 21 sont pérennes (Tableau 01).

Tableau 01: Classification des différentes espèces du genre *Medicago* (Lesins et Lesins, 1979).

Sous-genre	Section	Sous-section	Espèce
<i>Lupularia</i>			<i>M. lupulinae</i>
			<i>M. secundiflora</i>
<i>Orbicularia</i>	<i>Carstiensae</i>		<i>M. carstiensis</i>
	<i>Platycarpae</i>		<i>M. platycarpa</i>
			<i>M. ruthenica</i>
	<i>Orbiculres</i>		<i>M. orbicularis</i>
	<i>Hymenocarpos</i>		<i>M. radiata</i>
	<i>Heyniana</i>		<i>M. heyniana</i>
<i>Cretaceae</i>		<i>M. cretacea</i>	
	<i>Falcago</i>	<i>Falcatae</i>	<i>M. falcata</i>
			<i>M. sativa</i>
			<i>M. glomerata</i>

<i>Falcago</i>		<i>Rupestres</i>	<i>M. glutinosa</i>
			<i>M. prostrata</i>
			<i>M. rhodopea</i>
			<i>M. saxatilis</i>
			<i>M. rupestris</i>
		<i>Daghestanicae</i>	<i>M. cancellata</i>
			<i>M. daghestanica</i>
			<i>M. pironae</i>
		<i>Papillosae</i>	<i>M. dxhawakhetica</i>
			<i>M. papillosa</i>
<i>Arobeae</i>		<i>M. arobea</i>	
<i>Marinae</i>		<i>M. marina</i>	
<i>Suffruticosae</i>		<i>M. hybrida</i>	
		<i>M. suffruticosa</i>	
<i>Spirocarpus</i>	<i>Rotatae</i>		<i>M. rotata</i>
			<i>M. bonarotina</i>
			<i>M. noeana</i>
			<i>M. shephardii</i>
			<i>M. rugosa</i>
			<i>M. scutellata</i>
	<i>Pachyspirae</i>		<i>M. soleirolii</i>
			<i>M. tornata</i>
			<i>M. littoralis</i>
			<i>M. truncatula</i>
			<i>M. rigidula</i>
			<i>M. murex</i>
			<i>M. constricta</i>
			<i>M. turbinata</i>
			<i>M. doliata</i>
			<i>M. sauvagei</i>
			<i>M. laciniata</i>
	<i>Leptospirae</i>		<i>M. minima</i>
			<i>M. praecox</i>
			<i>M. coronata</i>
			<i>M. polymorpha</i>
			<i>M. arabica</i>
			<i>M. lanigera</i>
			<i>M. disciformis</i>
			<i>M. tenoreana</i>
	<i>Intertextae</i>		<i>M. intertexta</i>
			<i>M. ciliaris</i>
			<i>M. muricoleptis</i>
			<i>M. granadensis</i>

I.2.3. Biologie :

D'après Mathieu (2003), le cycle de développement des espèces du genre *Medicago* passe par différents stades végétatifs (Annexe 1 et Figure 01) :

Stade 1 : la plante est une dicotylédone (germination hypogée).

Stade 2 : l'apparition de la première feuille simple (unifoliée).

Stade 3 : les feuilles sont alternées et composées de trois folioles rattachées à la tige par un pétiole (trifoliées).

Au cours de son développement la première tige croît en produisant des feuilles alternées. Les feuilles sont en général de type trifoliées mais il existe des feuilles multifoliolées à 4, 5, 6 voire 7 folioles portées sur un pétiole.

Stade 4 : un bourgeon axillaire de la première feuille unifoliée se développe pour donner une tige secondaire.

Deux autres tiges secondaires démarrent à sa suite depuis le niveau des cotylédons. Les luzernes pérennes de type non dormant produisent plus de tiges secondaires à partir du niveau des cotylédons que les types dormants dont la croissance est stoppée en hiver. C'est cet ensemble de tiges qui va former le collet.

Stade 5 : Le développement des tiges primaires, secondaires et tertiaires.

Les fleurs apparaissent entre le 6^{ème} et le 14^{ème} entre-noeud en fonction des conditions du milieu et de leur déterminisme génétique.

Stade 6 : floraison, maturité.

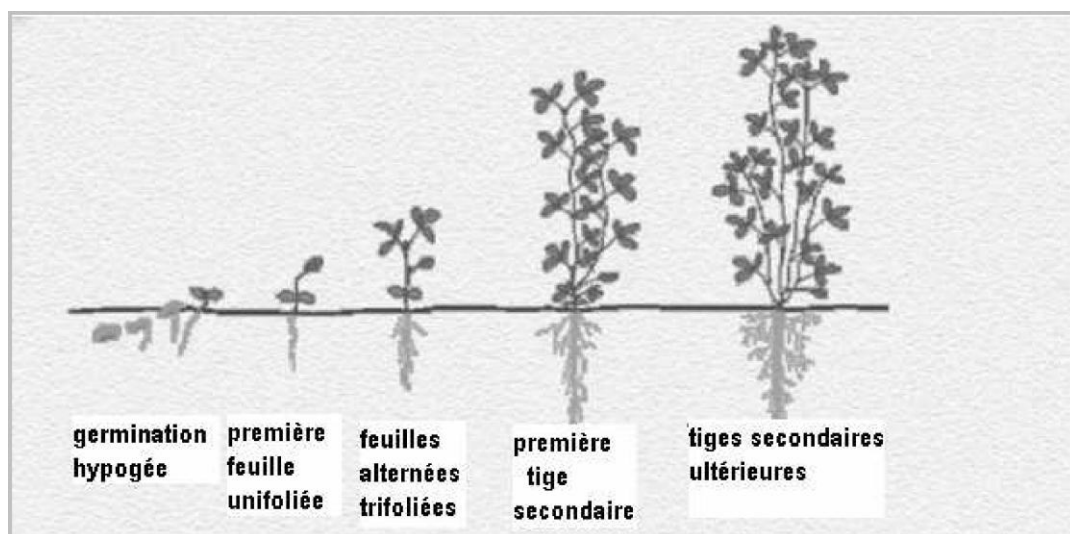



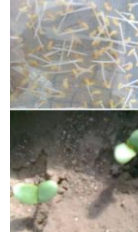




















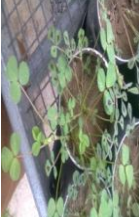













Figure 1: Cycle de développement de la luzerne pérenne (Prolea, 2002)

Tableau 02 : Le stade de développement de quelques espèces de *Medicago*.

		Hb1	M.minima	Mt A17	M.ciliaris	TN1.11	Mt DZ
Germination 12/03 – 23/03							
Stade végétatif	Unifoliée 23/03-13/04						
	Trifoliée 13/04-22/04						
Bourgeonnement	1 ^{ère} tige secondaire 22/04-06/05						
	Tige secondaire ultérieur 06/05-22/05						
Floraison 22/05 – 04/06							

I.2.4. Le modèle biologique *Medicago truncatula* :

I.2.4.1. Présentation générale :

Medicago truncatula est une légumineuse annuelle fortement autogame dans la nature (Lesins et Lesins 1979). Elle est diploïde ($n=8$), produit des graines en abondance avec un temps de génération de 10 à 12 semaines, la taille de son génome est de 450 Mb dont le séquençage a été achevé en 2006 par la National Science Foundation et le sixième programme de cadre de l'Union européenne. (CRAIG VENTER, 2006)

Medicago truncatula est originaire du pourtour méditerranéen et proche de la luzerne cultivée *M.sativa*, elle a été proposée comme l'espèce modèle pour l'étude des légumineuses d'après le programme INRA (1985-1986), en plus, elle s'associe avec la bactérie *Sinorhizobium meliloti*, le microsymbiote le plus étudié dans le domaine des interactions symbiotiques de type plante-bactérie (Barker et al., 1990).

Deux principaux génotypes de *M.truncatula* sont actuellement utilisés en laboratoire. Le premier est le génotype A17 issu du cultivar Jemalong et l'autre est le génotype R-108-1-c3 issu de l'accession 108-1. Ces génotypes ont été choisis par rapport à leurs capacités symbiotiques et leur pouvoir de régénération *in vitro* (Thomas et al., 1992 ; Chabaud et al., 1996 ; Trieu et Harrison, 1996 ; Kamate et al., 2000).

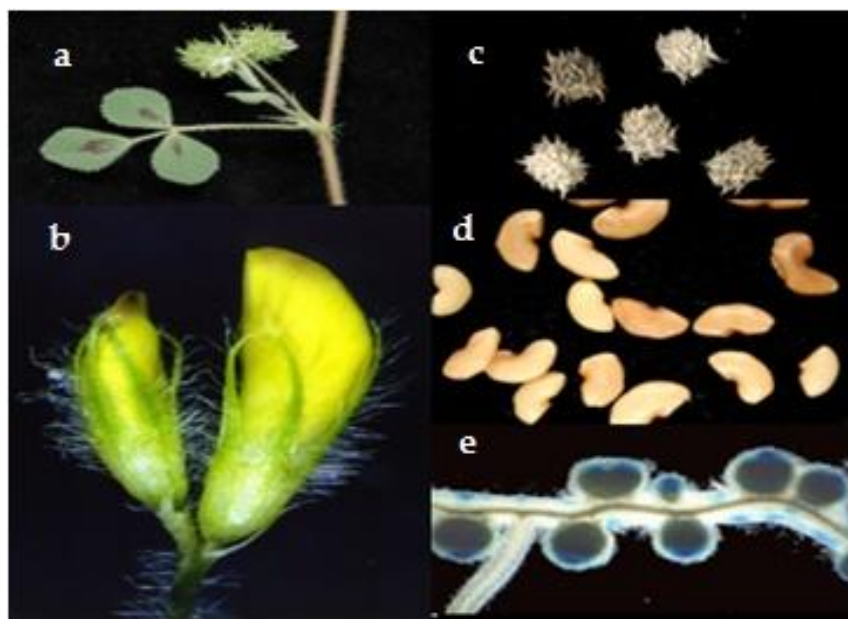


Figure 2: *Medicago truncatula* (Journet, 1997).

(a: feuilles avec gousses, b: fleurs, c: gousse, d: graines, c: nodules)

I.2.4.2. Outils d'étude développés pour *M. truncatula* :

1. Outils bibliographiques (bases de données) :

Medicago truncatula est une espèce de référence pour la génétique des légumineuses, leur génomique et leur reproduction. Pour soutenir la génomique fonctionnelle de cette espèce, les chercheurs ont développé un recueil de profils d'expression génique pour la majorité des gènes de *M. truncatula* couvrant l'ensemble de ses principaux systèmes d'organes. Ces données ont été complétées par d'autres données du transcriptome relatives à différents types de cellules et de tissus en conditions de stress abiotiques et biotiques. Ces données aideront à la découverte des gènes, de leur fonction, et au criblage moléculaire (Samuel Roberts Noble Foundation, 2014).

❖ *Le Medicago truncatula Gene Expression Atlas (MtGEA):*

Le serveur Web *Medicago truncatula Gene Expression Atlas* (MtGEA) est une plate-forme centralisée pour l'analyse du transcriptome de *Medicago truncatula* . Actuellement, il héberge les données d'expression génique de 156 *GeneChip* du génome de *Medicago truncatula* dans 64 expériences différentes, couvrant un large éventail de conditions environnementales et de stades de développement. (Ji He *et al.*, 2009).

C'est une plate-forme Web MtGEA riche en données et offre aux chercheurs de multiples outils d'analyse des transcrits d'intérêt et qui leur permet de formuler des hypothèses sur la fonction des gènes (Ji He *et al.*, 2009)

❖ *Base des données Legoo:*

Cette base de données offre plusieurs fonctionnalités aux chercheurs travaillant sur les légumineuses, essentiellement sur *M. truncatula* :

- La fonction *Nicknames* permet d'établir rapidement une correspondance entre plusieurs identifiants d'un même gène.
- La fonction *Knowledgebase* qui représente sous forme de model les résultats des expérimentations cités dans des articles.
- La fonction *Legume Proteomes* : qui est un portail web dédié à l'annotation fonctionnelle de *M. truncatula*, *Glycine max* et *Lotus japonicus*
- La fonction *workflows* pour l'étude *in silico* des données.

- La fonction *Narcisse* pour la génomique comparative des deux légumineuses modèles *M. truncatula* et de *Lotus japonicus*.

❖ **Legume Information System (LIS):**

Le LIS (*Legume Information System*) a été développé par le Centre national de ressources génomiques végétales Localisé sur le centre INRA de Toulouse, France, en collaboration avec le Service de recherche agricole de l'USDA (ARS) au États-Unis. C'est une ressource qui intègre des données de génomique et de transcriptomique comparative de plusieurs espèces de légumineuses. L'interface virtuelle permet une navigation simplifiée et intuitive des données.

Il contient également des données génomiques annotées comportant des alignements des transcrits pour permettre de valider les prédictions de gènes via de nouvelles comparaisons d'annotation fonctionnelle. La plate-forme a été élargie pour inclure l'expression des gènes et les voies biochimiques qui leur sont associés.

La fonctionnalité CMap, qui a été développé dans le cadre du projet GMOD, a été constituée pour soutenir les analyses de phylogénie et les données de cartographie physique. (Gonzales *et al.*, 2006).

❖ **Noble foundation:**

La *Noble Foundation* a été créé en Ardmore, Oklahoma, Etats-Unis en 1945 (Ramakrishnan et Hughes, 2006). Aujourd'hui, son activité est menée par trois divisions : la division Exploitation Agricole, la division Biologie végétale et la division Amélioration du fourrage. Elle est reconnue internationalement pour ses contributions à la communauté scientifique et en particulier ses efforts pour faire progresser *Medicago truncatula* comme modèle génomique pour l'étude des légumineuses (Samuel Roberts Noble Foundation¹, 1997).

Le site web de la fondation met en accès libre à la disponibilité des chercheurs une importante source de documentation bibliographique, le *Medicago truncatula* handbook, qui est une synthèse sur les différents aspects de la recherche sur *M.truncatula*, sa biologie et les protocoles des techniques couramment utilisées.

2. Banques EST :

Le développement rapide du modèle *M.truncatula* s'est accompagné par une très grande quantité d'EST (*Expressed Sequence Tags*) déposées en trois ans dans les bases de données publiques. Les deux premiers lots d'EST ont été produits à partir d'une banque d'ADNc issus de pointes racinaires enrichies en poils absorbants (Covitz *et al.*, 1998) et d'une banque issue de jeunes nodosités (Gyogyey *et al.*, 2000)

Depuis 1999, la *Noble Foundation* a généré un total de 129 696 clones d'EST de 14 bibliothèques distinctes de *M. truncatula*, ce qui représente plus de 50% du total des ESTs de la communauté de recherche *Medicago*. Tous ces clones d'EST de la *Noble Foundation* ont été séquencés et déposés dans la base des données EST de *M. truncatula* TIGR. (Ramakrishnan et Hughes, 2006).

Ensuite, les ressources Mt EST ont considérablement et rapidement augmenté, en raison de plusieurs programmes parrainés initialement par le consortium Mt.NSF et la *Noble Foundation* aux États-Unis, et une collaboration CNRS -INRA - Genoscope en France (Frugoli et Harris, 2001). Ces programmes ont permis d'atteindre en décembre 2002 le nombre de 181000 EST déposés. Dans le programme français de séquençage d'EST (collaboration CNRS-INRA Toulouse, INRA-université de Bourgogne, Dijon et Génoscope, Evry), 24000 EST exploitables ont été obtenues, correspondant à ~14000 clones (Journet et al., 2002).

En Mars 2006, plus de 227 000 EST Mt étaient disponibles, dont environ 95% ont été générés à partir de banques d'ADNc standards, classant *M. truncatula* dans la septième position parmi les plantes et dans la deuxième position parmi les légumineuses (Gamas et al., 2006).

3. Collection de germoplasmes :

Les collections de germoplasme de *Medicago truncatula* sont basées principalement dans trois centres de par le monde:

- **The South Australian Research & Development Institute (SARDI), Australie.**

La collection disponible est représentée par 5 509 accessions originaires de 40 pays dont 4517 ont été collectées en se basant sur les principales variations morphologiques décrites par Heyn en 1963. Elle contient aussi 2809 accessions de *M. litoralis* et 857 accessions de *M. tornata* qui sont les espèces les plus proches de *M. truncatula*.

- **The USDA National Plant Germplasm System (NPGS), USA.**

Cette collection inclut 324 ecotypes de *M. truncatula* originaire de 22 pays dont 50% ont été collectés en Algérie, au Maroc et en Tunisie. (Ramakrishnan et Steve, 2006).

- **L'Institut National de recherche agronomique (INRA), France.**

La collection française de géotypes de *medicago truncatula* contient plus de 800 populations dont certaines ont été obtenues du SARDI (Australie) et de l'ICARDA (Syrie). Elle représente la deuxième plus importante collection dans le monde (après la collection australienne) et la plus large collection de lignées pures avec plus de 900 lignées (Ramakrishnan et Steve, 2006).

4. Banques de mutants :

De larges programmes de mutagenèse ont été développés par l'INRA (Institut National de Recherche Agronomique – France) et le CNRS (Centre National de Recherche scientifique – France) qui utilisent principalement trois techniques : l'irradiation Gamma, la mutagenèse insertionnelle utilisant l'ADN – T et le transposon Tnt – 1 du Tabac et la mutagenèse par le Tilling. Tous ces programmes ont porté sur la souche australienne Jemalong A17 et mettent à la disposition de la communauté scientifique 200 lignées mutantes par le transposon Tnt-1, 50 par irradiation Gamma, 1500 par ADN- T et environs 10000 lignées obtenues par tilling (Ramakrishnan et Steve, 2006).

Chapitre II

Matériels et Méthodes

II. Matériel et méthodes :

Le présent travail entre dans le cadre de la préparation d'une thèse de doctorat en sciences réalisé par l'encadreur qui vise à mettre en évidence des gènes marqueurs de la sécheresse chez des espèces sauvage de luzerne annuelle.

II.1. Matériel végétal :

Le matériel végétal sur lequel on a travaillé est constitué de quatre génotypes de luzerne annuelle.

Les noms et la provenance des génotypes utilisés dans notre essai sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 3: Les génotypes utilisées et ses coordonnées géographiques des lieux de collecte.

Génotype	Provenance	Coordonnées géographiques	
		Longitude	Latitude
<i>A17</i>	CNRS Gif sur Yvette France	/	/
<i>HBI</i>			
<i>M.minima</i>	Arris (W.Batna)	6°21'10,50''E	35°14'34,86''N
<i>M.ciliaris</i>	Dj.Seloua (W.Guelma)	7°13'48,94''E	36°22'00,26''N

II.2. Méthodes :

II.2.1. Conduite de l'essai:

II.2.1.1. Prégermination des graines :

Les graines des quatre génotypes ont été scarifiées de façon manuelle à l'aide d'un scalpel en égratignant le tégument du côté opposé de l'embryon puis stérilisées dans une solution d'eau de javel diluée à 1/3.

Les graines sont ensuite lavées à l'eau distillée et mise à gonfler pendant deux heures.

Après gonflement, les graines sont transférées dans des boîtes de Petri contenant du bactoagar à 4% et mise ensuite à 4°C et à l'obscurité pendant 72 h pour provoquer la germination (choc thermique).

Les graines ont été ensuite mise à germer pendant 24 h à l'obscurité et à 25° C.

II.2.1.2. Conditions de culture :

L'essai a été réalisé sous serre en conditions contrôlées de température et d'humidité au Laboratoire Biochimie Génétique et Biotechnologie Végétale –Chaaberssas, Constantine.

Les graines germées ont été semées dans des pots de 1 L sur un substrat constitué d'un mélange terre/sable : 1/1 à raison de 3 graines par pots. Après levée, une seule plantule est maintenue.

La capacité au champ du substrat utilisé a été mesurée selon l'équation suivante par la méthode de Musy et Soutter, (1991).

$$C. C = \frac{P2 - P1}{P1} \times 100$$

Où :

P2 : Poids du substrat saturé en eau.

P1 : Poids sec du substrat.

I.2.4.3. Stade de mesure et application du stress :

Le stade de développement sur lequel l'expérimentation a été réalisée correspond à la fin de la phase végétative et le début de floraison.

A ce stade, qui a été choisis en se référant à Gonzalez *et al.*, 2007, le stress hydrique a été appliqué par arrêt total de l'irrigation.

Les mesures et le prélèvement des échantillons ont été effectués une fois que la quantité d'eau restante dans le sol atteint 25 % de la capacité au champ.

I.2.5. Paramètres mesurés :

I.2.5.1. La résistance stomatique :

La fermeture des stomates est la première réponse développée par la plante en condition de manque d'eau (Verslues *et al.*, 2006). Ce paramètre a été choisi pour estimer l'état physiologique de la plante vis-à-vis la progression du manque d'eau dans le sol.

Ainsi, une mesure de ce paramètre a été réalisée une fois que la quantité d'eau restante atteint 25% de la capacité au champ à l'aide d'un Poromètre à pression de vapeur de type DELTA-T DEVICES-Cambridge-UK.

En premier lieu, on fait l'étalonnage de l'appareil; puis on lance la lecture. Il s'agit d'insérer la partie médiane de la feuille dans la pince (Herbinger *et al.*, 2002). Les données de la résistance stomatique sont stockées dans l'appareil de mesure et ensuite transférées vers un ordinateur pour leur traitement.

Les résultats ont été ensuite analysés en utilisant *Excel Stat 2009*.

I.2.5.2. Mesure du degré d'expression des gènes HD et MYB :

Les gènes ciblés par notre expérimentation codent pour des facteurs de transcriptions qui ont été cités par Kakar *et al.*, 2008.

Afin de tester leur degré d'expression en conditions de manque d'eau, nous avons utilisé la réaction de polymérisation en chaîne semi- quantitative.

La PCR semi quantitative est une variante de la PCR qui permet d'estimer la quantité d'un transcrit ARN présente initialement dans un échantillon par la mesure relative dans le temps de son taux d'amplification par rapport à un gène témoin (gène de référence).

Le gène témoin utilisé dans notre travail est le *mt-Act* (gène de l'actine de *Medicago truncatula*), il a été choisi en se référant à la bibliographie (Plet *et al.*, 2011).

I.2.5.2.1. Extraction des ARN totaux :

Une fois que la résistance stomatique est augmentée, une 1^{ère} extraction des ARN totaux est effectuée. Après, les plantes ont été réhydratées et une 2^{ème} extraction a été réalisée après 48h de réhydratation.

L'extraction des ARN totaux a été réalisée au trizol selon Chomczynski et Mackey, (1995), avec quelques modifications :

- Réduire l'échantillon végétal en poudre à l'aide d'un mortier et d'un pilon en utilisant de l'azote liquide (mortier préalablement refroidi).
- Transférer environ 100 mg de poudre dans un tube *Eppendorf* contenant 1 ml de trizol.
- Homogénéiser.
- Incuber 5 min à température ambiante.
- Ajouter 200 µl de chloroforme (1/5 du volume de trizol utilisé).
- Secouer vigoureusement pendant 15 s.

- Incuber pendant 5 min à température ambiante.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 min à 4°C.
- Transférer la phase aqueuse (supérieure) dans un nouveau contenant 500 µl d'isopropanol (1/2 du volume de trizol utilisé).
- Incuber pendant 10 min à température ambiante.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 min à 4°C.
- Jeter le surnageant.
- Laver le culot avec 1 ml d'éthanol à 75% (le même volume que celui de trizol utilisé).
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 15 min à 4°C.
- Jeter le surnageant.
- Sécher le culot pendant 15 à 20 min.
- Solubiliser le culot dans 30 µl de H₂O DEPC.
- Incuber pendant 10 min à 60° C.
- Conserver à -80°C.

I.2.5.2.2. Purification et application de l'ADNase :

Les extraits ARN ont été purifiés et débarrassés de l'ADN génomique contaminant à l'aide d'un Kit *RNA Mini preps Kit-Bio Basic Canada INC* en suivant les étapes décrites par le producteur.

I.2.5.2.3. Dosage des ARN totaux :

La concentration des extraits obtenus a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre type *Nanodrop 2000 Thermo*.

I.2.5.2.4. Réaction de la transcription réverse :

La transcription reverse est la réaction inverse de la transcription. C'est la synthèse d'un brin d'ADN à partir d'une matrice ARN grâce à la rétrotranscriptase et une amorce polyThymine. La molécule d'ADN synthétisée est alors appelée ADN complémentaire (ADNc).

Cette réaction a été effectuée selon (Coutard et al., 2005) avec quelques modifications :

- **Mesure de la quantité d'ARN matrice nécessaire pour la synthèse :**

Pour chaque échantillon ARN, 1.5 µg d'ARN matrice est nécessaire pour faire la synthèse. Les mesures des quantités à prélever ont été faites en se référant aux concentrations des échantillons ARN données par le *Nanodrop*.

Pour chaque échantillon, la réaction de transcription reverse a été conduite dans un volume de 30 µl constitué de :

- 1.5µg d'ARN pour réaliser la synthèse d'ADNc.
- Ajouter l'eau + DEPC jusqu'à avoir 15µl de volume finale.
- Chauffer les échantillons, à 70°C pendant 3min.
- Dans chaque tube, ajouter 15µl du « cDNA synthesis mix».

Tableau 4: Composition de cDNA synthesis mix.

Buffer RTase 5X	6µl
DTT 0.1M	3 µl
Oligo d(T)	0,6 µl
dNTPs	0.6 µl
RNA guard (1unité/µl)	1 µl
Reverse transcriptase	0.8µl
H ₂ O-DEPC	3 µl

- Incuber à 42°C pendant une heure.
- Incuber à 75°C pendant 10min afin de désactiver les ARNase.
- Ajouter à chaque échantillon 60µl d'eau.

I.2.5.2.5. La PCR Pilote :

A partir de chaque échantillon ADNc, une amplification de 45 cycles a été réalisée afin de vérifier la présence ou l'absence dans ces échantillons les séquences ciblées par notre travail.

La PCR a été conduite dans un volume réactionnel de 20 µl composé de :

Taleau 5 : Composition du mix PCR pilote.

	Mix PCR
AmpliTaq gold 2x mastermix	10 µl
Oligos F (10µl)	0.2 µl
Oligos R (10µl)	0.2 µl
ADNc	0.8 µl
H ₂ O	8.8 µl

Le résultat de l'amplification a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% et la taille des produit PCR a été estimé par comparaison au marqueur de taille *Biomatik 100 pb DNA Leader*.

I.2.5.2.6. Quantification des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :

Les échantillons ainsi prélevés sont analysés sur gel d'agarose à 2% et la quantification a été faite par comparaison de l'intensité de la fluorescence émise par la bande révélée au Bromure d'Ethidium, et qui est fonction de la quantité d'ADN présente dans l'échantillon, avec celle du gène de référence.

I.2.5.2.7. La PCR semi quantitatives :

La réaction de polymérisation en chaine a été conduite dans un thermocycleur type GeneAMP* PCR System 9700, en utilisant comme matrice les ADNc synthétisés précédemment.

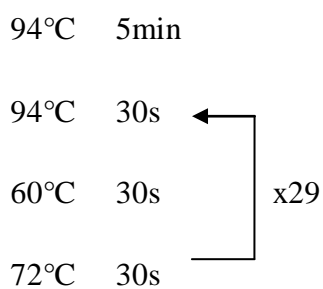
Pour chaque échantillon, la réaction a été réalisée dans un volume final de 50 µl composé de :

Tableau 6: Composition du mix PCR semi-quantitative.

	Mix PCR
AmpliTaq gold 2x mastermix	25 μ l
Oligos F (10 μ M)	0.5 μ l
Oligos R(10 μ M) (10 μ l)	0.5 μ l 0.5 μ l
ADNc	2 μ l
H ₂ O	22 μ l

La PCR semi-quantitative est basée sur l'interruption de la PCR en plusieurs cycles qui correspondent à plusieurs points de la phase exponentielle de l'amplification.

Le thermocycleur a été réglé selon le programme suivant :



Durant la réaction, les prélèvements ont été effectués sur les cycles 23, 25, 27 et 29 pour les deux gènes étudiés et le gène de référence.

A chacun de ces cycles, la réaction est interrompue et 10 μ l du produit PCR sont prélevés à partir de chaque tube.

I.2.5.2.8. La révélation :

La révélation des résultats de l'amplification a été réalisée pour chaque cycle de prélèvement par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, et la taille des produits d'amplification a été estimée par comparaison au marqueur de taille *Biomatik 100pb*.

❖ **Préparation d'un gel d'agarose.**

- Pesez l'agarose.
- Ajoutez le volume approprié de tampon d'électrophorèse TAE 1X et TBE 1X.
- Ne mélangez pas l'agarose ne se dissout qu'en chauffant.
- Faites fondre au four à micro-ondes.
- Attendez que l'agarose refroidisse (<60°C)
- Ajoutez le bromure d'éthidium.
- Coulez le gel dans le moule et disposez immédiatement le peigne.
- Une fois le gel polymérisé, disposer le moule contenant le gel dans la cuve d'électrophorèse.
- Recouvrez le gel de tampon d'électrophorèse TAE 1X ou TBE 1X.
- Enlevez le peigne.

❖ **Marqueur de taille *Biomatik 100 pb DNA Leader*.**

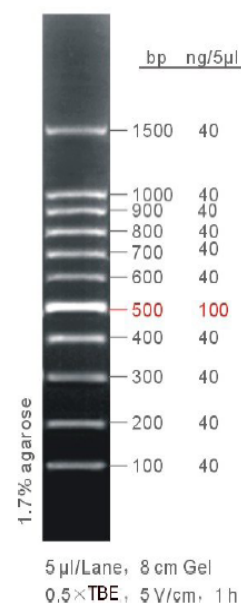
100bp DNA Ladder, Quantitative, 11 Bands, 100bp-1.5kb, Ready to Use

Code	Size
M7123-100Loads	100 Loads (500µl)
M7123-5x100Loads	5x100 Loads (5x500µl)

Description: 100bp DNA ladder (Quantitative) is ideal for determining the size of double-stranded DNA from 100 to 1500 base pairs. The ladder consists of 11 linear double-stranded fragments. The intensity of the 500bp has been increased to serve as a reference for easy identification. All fragments are precisely quantified and mixed during the production. For 5µl loading, all fragments except 500bp are at 40ng. The 500bp fragment is at 100ng. This ladder is pre-mixed with loading dye and is ready to use.

Store at -20°C.

100bp ladder



Chapitre III

Résultats et Discussions

III. Résultats et discussion

III.1. La résistance stomatique :

Avant l'application du stress, les valeurs de la résistance stomatique enregistrées chez les génotypes se situent entre 1.03 ± 0.51 et 3.6 ± 0.03 s.cm⁻¹.

L'arrêt de l'irrigation jusqu'à ce que la teneur du sol en eau atteigne 25 % de la capacité au champ a provoqué l'augmentation de ce paramètre chez les quatre génotypes étudiés par rapport à celles des témoins. La plus grande valeur enregistrée était de 88 ± 9.07 s.cm⁻¹ enregistrée chez l'espèce *M. ciliaris* alors que la plus basse valeur était de $24,8 \pm 6.35$ s.cm⁻¹ et qui a été enregistrée chez l'espèce *M. minima*.

Après 48h de réhydratation, on remarque que les valeurs de la résistance stomatique baissent considérablement chez tous les génotypes étudiés et retrouvent des valeurs qui se situent entre 4.8 ± 1.68 et 5 ± 0.72 s.cm⁻¹.

Les valeurs obtenues sont représentées dans le graphe suivant :

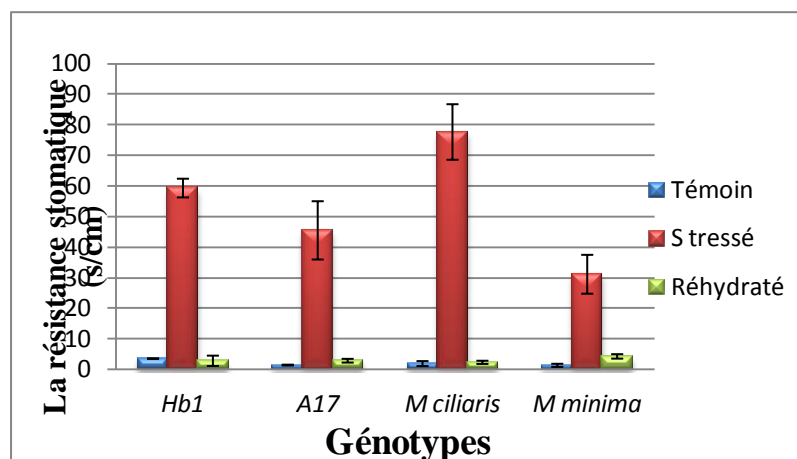


Figure 3: Variation de la résistance stomatique R.S chez les génotypes étudiés.

L'analyse de la variance des résultats obtenus, révèle l'existence de différence très hautement significatif entre les niveaux de stress et entre les espèces étudiées et même l'interaction entre les deux facteurs (tableau 7).

Tableau 7: Analyse de la variance avec un intervalle de confiance de 95%.

Source	ddl	Somme des carrés	Carré moyen	F de Fisher	Pr > F
Niveau	2	20690,395	10345,197	544,638	< 0,0001
Génotype	3	1145,022	381,674	20,094	< 0,0001
Niveau*Génotype	6	2412,932	402,155	21,172	< 0,0001

- **Tests de comparaisons multiples pour la variable niveau :**

Tableau 8 : Le test de *Newman Keuls* pour l'analyse de la variance entre les groupes en fonction de niveau avec un intervalle de confiance de 95%.

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
S ~ T	51,387	28,881	2,497	< 0,0001	Oui
S ~ R	50,308	28,274	2,064	< 0,0001	Oui
R ~ T	1,079	0,607	2,064	0,550	Non

Le test de *Newman Keuls* au seuil 5% classe le facteur niveaux en 2 groupes :

Modalités	Moyenne	Regroupements	
S	53,413	A	
R	3,105		B
T	2,026		B

Cela signifie que le manque d'eau a provoqué l'augmentation de la résistance stomatique (groupe A), et qu'après arrosage, les plantes ont pu retrouver une activité stomatique normale (groupe B).

- **Tests de comparaisons multiples pour la variable génotype :**

Tableau 9: Le test de *Newman Keuls* pour l'analyse de la variance entre les groupes en fonction de génotype avec un intervalle de confiance de 95%.

Modalités	Différence	Différence réduite	Valeur critique	Pr. > Diff	Significatif
<i>M.ciliaris</i> ~ <i>M.minima</i>	15,053	7,327	2,759	0,000	Oui
<i>M.ciliaris</i> ~ <i>A17</i>	10,711	5,213	2,497	< 0,0001	Oui
<i>M.ciliaris</i> ~ <i>Hb1</i>	5,498	2,676	2,064	0,013	Oui
<i>Hb1</i> ~ <i>M.minima</i>	9,556	4,651	2,497	0,000	Oui
<i>Hb1</i> ~ <i>A17</i>	5,213	2,538	2,064	0,018	Oui
<i>A17</i> ~ <i>M.minima</i>	4,342	2,114	2,064	0,045	Oui

Le test de *Newman Keuls* au seuil 5% classe le facteur génotype en 4 groupes :

Modalités	Moyenne	Regroupements			
<i>M. ciliaris</i>	27,330	A			
<i>Hb1</i>	21,832		B		
<i>A17</i>	16,619			C	
<i>M. minima</i>	12,277				D

Cela signifie que la réaction envers le manque d'eau par la fermeture des stomates n'as pas été de la même intensité chez les quatre génotypes étudiés. L'augmentation la plus importante a été observée chez l'espèce *M. ciliaris* (27.33) alors que la plus faible augmentation était celle observée chez l'espèce *M. minima* (12.27).

- **Tests de comparaisons multiples pour la variable niveau-génotype :**

Le test de *Newman Keuls* au seuil 5% classe le facteur génotypes-niveaux en 5 groupes :

Modalités	Moyenne	Regroupements				
Niveau-S*Génotype- <i>M.ciliaris</i>	77,667	A				
Niveau-S*Génotype- <i>Hb1</i>	59,333		B			
Niveau-S*Génotype- <i>A17</i>	45,500			C		
Niveau-S*Génotype- <i>M.minima</i>	31,150				D	
Niveau-R*Génotype- <i>M.minima</i>	4,300					E
Niveau-T*Génotype- <i>Hb1</i>	3,297					E
Niveau-R*Génotype- <i>A17</i>	2,893					E
Niveau-R*Génotype- <i>Hb1</i>	2,867					E
Niveau-R*Génotype- <i>M.ciliaris</i>	2,360					E
Niveau-T*Génotype- <i>M.ciliaris</i>	1,963					E
Niveau-T*Génotype- <i>A17</i>	1,463					E
Niveau-T*Génotype- <i>M.minima</i>	1,380					E

Ces résultats montrent que le niveau de stress hydrique a un effet sur le génotype par une augmentation de la résistance stomatique (groupes A, B, C, D).

Après la réhydratation chaque génotype récupère leur état initial correspondant à celle du témoin (groupe E).

La fermeture des stomates est une des réponses précoces au déficit hydrique, elle se fait en quelques minutes, elle a pour but la protection de la plante contre la déshydratation (ASSMANN et al., 2000).

III.2. Mesure du degré d'expression des gènes HD et MYB :

III.2.1. Dosage des ARN totaux :

La mesure de la concentration des extraits ARN par le *Nanodrop* montre que les quantités extraites pour chaque échantillon se situent entre 53,8 ng/μl 651.1 ng/μl.

Le spectre d'absorption montre un seul pique à 260nm.

Tableau 10: Quantité d'ARN extraits des racines de 4 génotypes étudiés.

Génotype	concentration d'ARN (ng/μl)	260/280
<i>HBI</i> T	114,6	1,98
<i>HBI</i> S	59,2	1,96
<i>HBI</i> H	117,6	1,9
<i>A17</i> T	87,9	2,06
<i>A17</i> S	53,8	1,98
<i>A17</i> H	74	2
<i>M.ciliaris</i> T	630.2	2.12
<i>M.ciliaris</i> S	279.1	2.16
<i>M.ciliaris</i> H	302.9	2.1
<i>M.minima</i> T	651.1	1.99
<i>M.minima</i> S	142.3	2.12
<i>M.minima</i> H	334.7	2.1

Le calcul de la concentration des Acide nucléique est basé sur la mesure du nombre d'unité de densité optique à 260nm où chaque unité D.O correspond à 40ng/μl dans le cas de l'ARN, au même temps le rapport de la densité optique mesurée à 260nm et à 280nm renseigne sur la pureté de ces extraits. Ainsi, il est établi qu'un extrait pur d'ARN doit avoir un rapport A260/A280 de 2.0. Un rapport compris entre 1.8 et 2 indique que l'extrait est constitué d'un mélange ADN – ARN alors qu'un rapport inférieur à 1.8 renseigne sur une contamination par les protéines. (Tableau 10). (NOLAN *et al.*, 2006).

III.2.2. Réaction de la rétrotranscription et PCR pilote:

L'amplification des gènes cible par PCR à partir des ADNc synthétisé nous révèle les profils suivant :

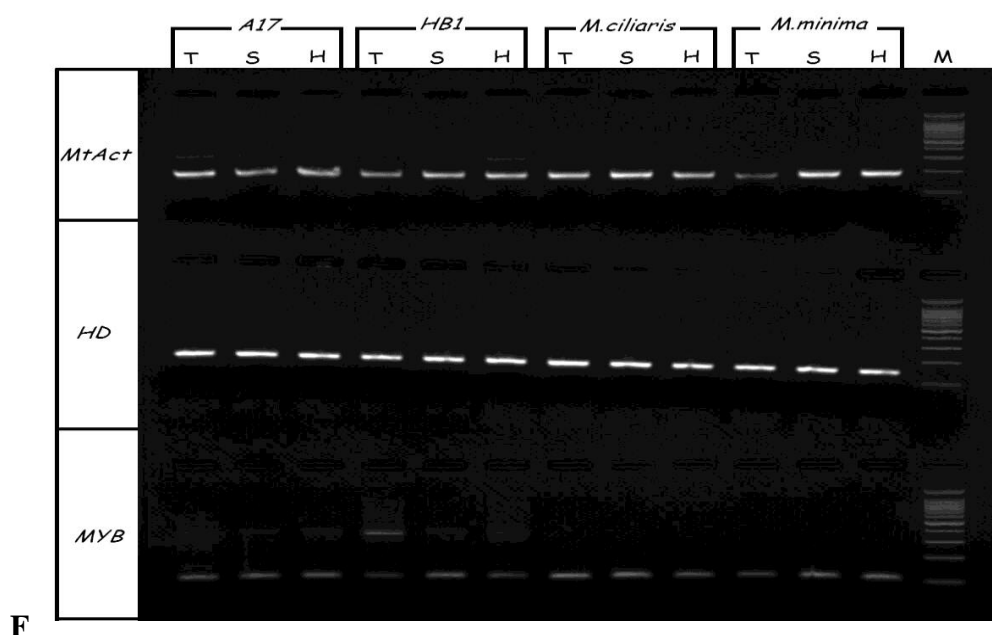


figure 4: Résultats de la vérification de la présence des gènes ciblés dans les échantillons ADNc synthétisé.

(T : témoin ; S : stressé ; H : réhydraté)

On remarque que la taille de chaque séquence amplifiée correspond à celle des gènes ciblés par notre manipulation.

La PCR Pilote est une PCR classique qui utilise comme matrice des ADNc, afin de détecté la présence de transcrit cible dans des échantillons, elle permet de vérifié la qualité de la réaction de transcription réverse.

Le résultat obtenu renseigne sur la présence des séquences cibles dans nos échantillons ce qui indique que notre réaction de transcription réverse a été efficace.

Par ailleurs, on remarque une variabilité dans l'intensité des bandes détectées. Cela s'explique par le fait que les séquences cibles ne sont pas présente en quantités égales dans tous nos échantillons.

D'autre part, on remarque des produits d'amplification d'une taille de 600pb dans les échantillons *A17* et *Hb1*, et d'autre d'une taille de 300pb et d'une densité moindre pour les mêmes échantillons.

La comparaison de ces tailles avec celle des séquences cibles nous mène à conclure que ce sont des amplifications non spécifique. Cela peut s'expliqué par le

faite qu'on a poussé la PCR jusqu'au 45^{ème} cycle ce qui a permis à des produits d'hybridation non spécifique de sortir du bruit de fond.

III.2.3. La PCR semi quantitative :

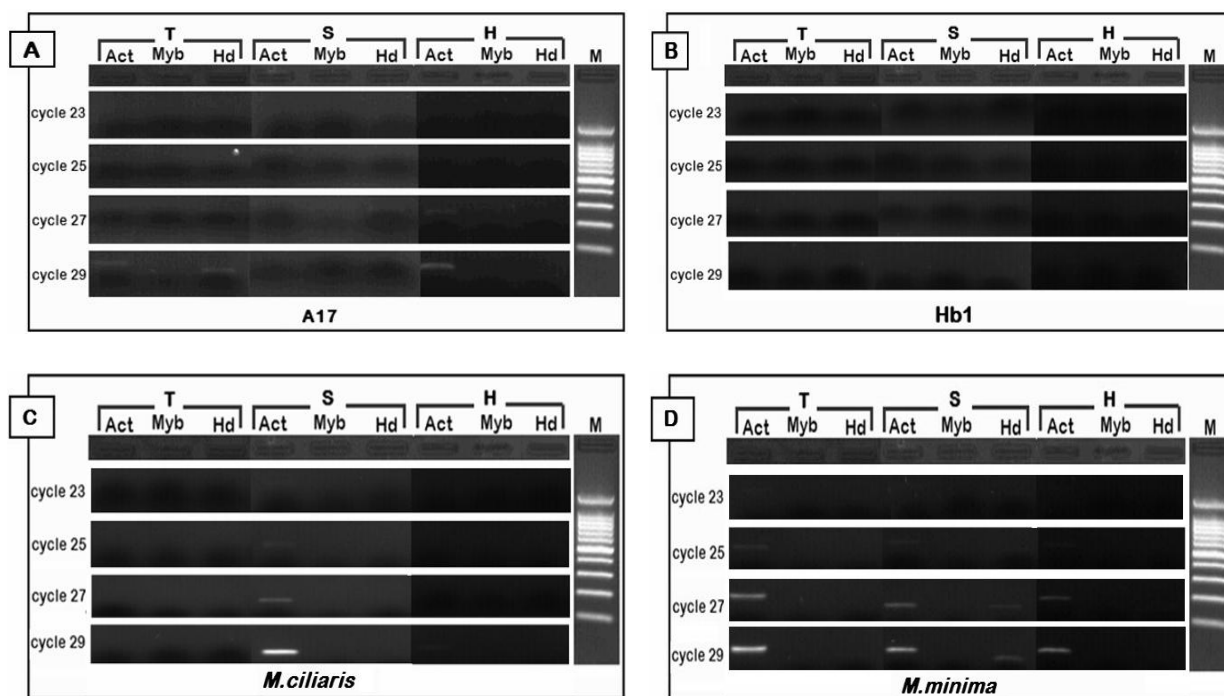


Figure 5: Résultat de la vérification de l'expression du gène de référence MtAct et deux autre gène du genre *Medicago* sous des conditions différentes (témoin, stressé, réhydraté) par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

- **Le gène MtAct :**

La réaction de polymérisation en chaîne permet d'évaluer la quantité relative de gènes cibles par rapport au gène de référence, ce dernier permettant de normaliser la quantité et la qualité d'acide nucléique extrait.

Les gènes de références utilisés dans les réactions quantitatives de PCR sont des gènes dont le profil d'expression n'est pas affecté par les conditions de l'environnement et le stade de développement, ce sont des gènes qui ont été désigné par la communauté scientifique pour chaque espèce étudiée, afin de mesuré de façon relative le taux d'expression des autres gènes dont l'expression est modulée (Zeevaart 2006; Zeevaart 2007).

Le profil d'expression révélé pour le gène de référence utilisé dans notre manipulation et qui est le MtAct montre que son seuil de détection se situe au 25^{ème} cycle pour les échantillons ADNc des génotypes *M.ciliaris* et *M.minima*, avec une

augmentation progressive de l'intensité de la bande détectée suivant la progression de la PCR.

Pour le génotype *Jemalong A17* on remarque que le seuil de détection se situe entre le 27^{ème} et le 29^{ème} cycle.

Pour le génotype Hb1 aucun produit d'amplification n'a pas pu être détecté.

La comparaison de ce résultat avec celui de la PCR Pilote renseigne sur la faible concentration de ce transcrite dans nos échantillons.

Toutefois, cette constatation nous indique que pour une analyse ultérieure un décalage du 1^{er} prélèvement vers le cycle 25 donnera de meilleurs résultats.

- **Le gène MYB :**

Les résultats obtenus par PCR semi-quantitative sur le gène MYb montrent qu'aucune bande n'a pu être révélée chez tous les génotypes étudiés et à tous les points de prélèvement.

Sachant que le seuil de détection est le point de départ de la phase exponentielle, phase au cours de laquelle l'efficacité d'amplification est supposée rester constante (Williams et *al.*, 1996), l'analyse du profil d'expression du gène MYB utilisé dans notre manipulation montre que son seuil de détection se situe après le 29^{ème} cycle, c'est à cette raison qu'on n'a pas obtenu des bandes pour tous les génotypes et les niveaux étudiés.

Par ailleurs, décalage des points de prélèvement vers des cycles ultérieurs (par exemple cycle 29, 31, 33 et 35) pourra conduire à une saturation de la bande correspondant au gène de référence ce qui empêchera la quantification.

La comparaison de ce résultat avec ce de la PCP Pilote renseigne sur la faible concentration de ce transcrite dans nos échantillon.

- **Le gène HD :**

Le profil d'expression révélé pour le gène HD utilisé dans notre manipulation montre qu'il s'exprime de façon différentielle par rapport au génotype et par rapport au manque d'eau.

Ainsi, on a pu révéler une expression de ce gène chez les individus stressés de l'espèce *M. minima* avec un seuil de détection qui se situe au 27^{ème} cycle et un niveau d'expression qui équivaut à la moitié de notre gène de référence.

Après réhydratation, le profil d'expression relevé est semblable à celui du témoin et renseigne sur une expression nulle.

Ces résultats montrent que pour l'espèce *M. minima* exprime le gène HD en conditions de stress hydrique.

Par ailleurs, les autres génotypes renseignent sur le manque d'expression pour tous les points de prélèvement. La comparaison de ces résultats avec ce de la PCR pilote renseigne sur la faible la faible quantité initiale de l'extrait.

L'expression des gènes modulés par le stress peuvent contribuer à identifier les traits physiologiques utiles pour les programmes de sélection concernant l'adaptation à la sécheresse, selon [Nunes et al.](#), 2008 ont permis d'identifier des mécanismes chez *M. truncatula* pour maintenir un niveau de tolérance très élevé en conditions sévères de déficit hydrique.

Ainsi, un autre groupe de [Ismanizan et al.](#), 2011 ont identifié une collection de JA gènes qui peuvent être impliqués dans la production de métabolite secondaire. Ces gènes indiquent que les plantes réagissent en parallèle aux stress abiotique avec la biosynthèse de certains métabolites secondaires.

Les applications de la PCR quantitative sont déjà nombreuses, parmi eux celle de [Kakar et al.](#), 2008 qui ont été validé l'efficacité des gènes spécifiques de facteurs de transcription chez *Medicago truncatula* par l'utilisation de plus de 1000 pb.

[Federico et al.](#), 2010 ont pu mettre en évidence le facteur de transcription HD-ZIP1 du gène Hb1 qui est exprimé dans les méristèmes des racines primaires et latérales et induite par le stress salin dont le gène Hb1 peut induire des modifications au niveau des racines de *M. truncatula*, s'expriment par une réponse adaptative de développement pour réduire la surface de la racine exposée au stress environnementaux négatifs.

Ces modifications permettent à la plante de faire face aux conditions extrêmes de l'environnement.

Conclusion et Perspectives

Conclusion

La réaction des plantes face à un état de stress implique plusieurs mécanismes physiologiques accompagnés par des modifications dans le profil d'expression des gènes. Dans ce contexte, le présent travail a porté sur l'étude des changements qu'induit un déficit hydrique dans le profil d'expression de deux gènes chez quatre génotypes de luzerne annuelle.

Ainsi, deux paramètres ont été étudiés durant la réalisation de ce travail : la résistance stomatique et la mesure du degré d'expression de deux gènes qui codent pour des facteurs de transcription et qui sont le gène HD et le gène MYB en utilisant comme gène de référence le gène MtAct.

La mesure de la résistance stomatique qui est un paramètre qui renseigne sur l'état physiologique de la plante montre que les quatre génotypes ont senti le stress différemment dont le génotype *M.ciliaris* a développé la plus intense réaction, par rapport au génotype *M.minima* qui a réagi le plus faiblement au manque d'eau.

D'autre part, l'analyse du profil d'expression des gènes choisis pour notre travail montre qu'en état de manque d'eau, l'espèce *M. minima* exprime le gène HD ce qui indique leur importante résistance en condition déficitaire.

Par ailleurs, les résultats obtenus sur les génotypes étudiés au cours de notre travail renseigne sur le manque d'expression des deux gène MYb et Hd en comparaison avec le gène de référence MtAct ce qui reflète l'utilisation d'une faible quantité initial de l'extrait.

Dans le cadre d'un travail future, il serait souhaitable de compléter le travail par des études physiologique et de la génomique fonctionnelle pour valider ces gènes, afin d'avoir une idée plus claire sur son expression.

Références Bibliographique

Références Bibliographiques

- **André G, Hubert B., 1992** : Amélioration des espèces végétales cultivées. Quae. Paris. P : 271.
- **Attia F., 2007** : Effet du stress hydrique sur le comportement ecophysiologique et la maturité phénolique de la vigne *Vitis vinifera L* : Etude de cinq cepages autochtones de midi-pyrenees. Université de Toulouse. Formation doctorale : Science Agronomique. P : 13-47.
- **Baker N R, Rosenqvist E., 2004**: Application of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. Journal of Experimental Botany 55. P: 1607-1621.
- **Bammoun A., 1997**: Contribution à l'étude de quelque caractères morphologiques, biochimiques et moléculaires chez des variétés de blé dur, *Triticum turgidum* esp. *durum*, pour l'étude de la tolérance à la sécheresse dans la région des hauts plateaux de l'ouest Algérien. Thèse de Magistère. P :1-33.
- **Barker D G, Bianchi S, London F, Dattee Y, Duc G, Essad S, Flament P, Gallusci P, Genier G, Guy P, Muel X, Tourneur J, Dénarié J, Huguet T., 1990** : *Edicago truncatula* a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. Plant mol. Biol. Rep., 8. P : 40-49.
- **Belhassen E, This D, Monneveux P., 1995** : L'adaptation génétique face aux contraintes de la sécheresse. Cahiers Agricultures, 4. P : 251-261.
- **Blum A, Ebercon A., 1981**: Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. Crop Sci. 21. P: 43-47.
- **Bota J, Flexas J, Medrano H., 2001**: Genetic variability of photosynthesis and water use in Balearic grapevine cultivars. Annals of Applied Biology 138. P: 353-361.

- **Boyer J S., 1970:** Leaf Enlargement and Metabolic Rates in Corn, Soybean, and Sunflower at Various Leaf Water Potentials. *Plant Physiol.* 46. P: 233-235.
- **Chabaud M, Larssonaud C, Armouget C, Huguet T., 1996:** Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula Gaertn*) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promoter fused to the gus reporter gene. *Plant Cell Rep.*, 15. P: 305-310.
- **Chomczynski P. Mackey K. (1995):** Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 19(6). P: 42-59.
- **Chaves M M, Oliveira M M., 2002:** Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of Experimental Botany* 55. P: 2365-2384.
- **Cornic G, Massacci A., 1996:** Leaf photosynthesis under drought stress. In: *Photosynthesis and the environment*, N.R Baker (ed.). *Advances in photosynthesis Vol 5 Govindjee series editor*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ISBN 0-7923-4316-1.
- **Coutard F, Pommepuy M, Loaec S, Heryio H., 2005 :** MRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *Journal of Applied Microbiology*, 98(4). P: 951-961.
- **Covitz PA, Smith LS., 1998:** Expressed sequence tags from a root-hair-enriched *Medicago truncatula* cDNA library. *Plant Physiol.*, 117, 1325-1332.
- **Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM., 1992:** Anhydrobiosis. *Annal Rev physiol* 54. P : 579-599.

- **Dubos C., 2001 :** Réponse moléculaire de jeunes plants de pin maritime soumis à un stress hydrique en milieu hydroponique. INRA – Equipe de Génétique et Amélioration des Arbres Forestiers BP 45, 33 610 Cestas, France. P : 56.
- **Escalona, JM, Flexas J, Medrano H., 1999:** Stomatal and non-stomatal limitations of photosynthesis under water stress in field-grown grapevines. *Aust. J. Plant Physiol.* 26. P: 421-433.
- **Federico A, Anouck D, Verdenaud M, Gruber V, Frugier F, Chan R, Crespi M., 2010:** Environmental Regulation of Lateral Root Emergence in *Medicago truncatula* Requires the HD-Zip I Transcription Factor HB1. *Plant Cell* 2010;22;2171-2183. DOI 10.1105.
- **Flexas J, Medrano H., 2002:** Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plant: Stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany* 89. P: 183-189.
- **Frugoli J, Harris J., 2001:** *Medicago truncatula* on the move! *Plant Cell* 13. P: 458-463.
- **Gamas P, Debellé F, Berges H, Godiard L, Niebel A, Journet EP, Gouzy J., 2006:** *Medicago truncatula* cDNA and genomic libraries. Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes CNRS-INRA (LIPM), Chemin de Borde-Rouge – Auzeville et Centre National de Ressources Génomiques Végétales INRA (CNRGV), Chemin de Borde Rouge BP 52627, 31326 Castanet Tolosan CEDEX, France. P : 2-7.
- **Gonzales M, Andrew F, Gajendran K, William D., 2006:** *The Legume Information System (LIS): An integrated, dynamic comparative legume information resource.* BIOINFORMATICS RESOURCES FOR *MEDICAGO TRUNCATULA*. P: 10-12.

- **González M., Rubén L, Estíbaliz L, Cesar A; 2007:** Response of *Medicago truncatula* to abiotic stress. *Medicago Handbook*. Noble Foundation.
- **Gyorgyey J, Vaubert D, Jimenez-Zurdo JI, Charon C, Troussard L, Kondorosi A, Kondorosi E., 2000:** Analysis of *Medicago truncatula* nodule Expressed Sequence Tags. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13. P: 62-71.
- **Herbinger K, Tausz M, Wonisch A, Soja G, Sorger A, Grill D., 2002:** Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defence systems of two wheat cultivars. *Plant Physiol. Biochem.* 40. P : 691-696.
- **HIRECHE Y., 2006:** Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. UNIVERSITE AL HADJ LAKHDAR, BATNA. MEMOIRE DE MAGISTERE. P: 6.
- **Ismanizan I, Mian C, Zeti A, Hussein M, Zamri Z, Normah MN., 2011:** Alteration of Abiotic Stress Responsive Genes in *Polygonum minus* Roots by Jasmonic Acid Elicitation, *Plants and Environment*, Dr. Hemanth Vasanthaiah (Ed.), ISBN: 978-953-307-779-6.
- **Jémie L., 2007 :** influence d'un déficit hydrique sur le fonctionnement d'un couvert végétal cultivé. *Sciences du végétal*. Montpellier SupAgro.
- **Ji He, Vagner AB, Mingyi W, Jeremy DM, Patrick XZ, Yuhong T, Michael KU., 2009:** The *Medicago truncatula* gene expression atlas web server. Plant Biology Division, the Samuel Roberts Noble Foundation, 2510 Sam Noble Parkway, Ardmore, OK 73401, USA. P: 2-9.
- **Jill F., 2000 :** Effet de la contrainte hydrique sur la photosynthèse foliaire : de l'utilisation expérimental des relations A/Ci et ACc. P: 32.

- **Jones HG., 1992:** Plant and Microclimates (Ed): A quantitative approach to environmental plant physiology, Cambridge University Press, London.
- **Journet EP., 1997:** A bioinformatics gateway towards integrative legume biology [en ligne]. Page consulté le 18.05.2014. Adresse URL: <<https://www.legoo.org/>>.
- **Journet E.P, Van Tuinen D, Grespeau H, Carreau V, Farmer MJ, Niebel A, Schiex T, Jaillon O, Chatagnier O, Godiard L, Micheli F, Kahn D, Gianinazzi P, Gamas P., 2002:** Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids.Res.*, 30. P: 5579-5592.
- **Kakar K, Wandrey M, Czechowski T, Gaertner T, Scheible WR, Stitt M, Torres J, Xiao Y, Redman JC, Wu Hc, Cheung F, Town C, Udvardi MK., 2008:** A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula* *Plant Methods*. P: 4-18.
- **Kamate K, Rodriguez L, Lorente ID, Scholte M, Durand P, Ratet P, Kondorosi E, Kondorosi A, Trinh TH, 2000:** Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Rep.*, 19. P: 647-653.
- **Kramer PJ, Boyer JS., 1995:** Water relations of plants and soils. Academic Press, California. Lavergne, J. and Briantais, J.M., 1996. Photosystem-II heterogeneity. In: Ort DR and Yocum CF (eds). Oxygenic photosynthesis: The light reactions, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. P: 265-287.
- **Lamaze T, Tousch D, Sarda X, Grignon C, Depigny TD, Monneveux P, Belhassen E., 1994 :** Résistance de plantes a la sécheresse : mécanismes physiologiques. *Le sélectionneur Français* 45. P : 75-85.

- **Laouar M, Abdelguerfi A., 2003** : variabilité morphologique et phénologique chez deux taxa très proches : *Medicago ciliaris* et *Medicago intertexta*. INRAA. P : 263- 264.
- **Lapeyronie A., 1982** : Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. Maisonneuve et Larose. Paris. P : 307-315.
- **Lawlor DW, Cornic G., 2002**: Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, Cell Environment* 25. P: 275–294.
- **Lesins KA, Lesins I., 1979**: Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. *Plant ecology*. Vol 50. N° 2. P : 228- 229.
- **Mathieu M., 2003** : Luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. France agricole. P: 11-16.
- **Medrano H, Escalona JM, Cifre J, Bota J, Flexas J., 2003**: A ten-year study on the physiology of two Spanish grapevine cultivars under field conditions: effects of water availability from leaf photosynthesis to grape yield and quality. *Functional Plant Biology* 30. P: 607-619.
- **Musy A, Soutter M, 1991**: physique du sol, livre, Lausanne : Presses polytechniques et universitaires romandes ; Paris : Lavoisier. P : 335.
- **Nunes C, Araújo S, Silva JM, Manuel P, Fevereiro S, Bernardes A., 2008** : Physiological responses of the legume model *Medicago truncatula* cv. Jemalong to water deficit. *Environmental and Experimental Botany* Volume 63. P: 289–296.
- **Passioura J.B., 1996**: Drought and drought tolerance. *Review Plant Growth Regulation*. 20. P:79-83.

- **Plet J, Wasson A, Ariel F, Signor C, Barker D, Mathesius U, Crespi M, Frugier F., 2011:** Mt MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J* 2011;65. P:622-633.
- **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. P : 4-7.
- **Prosperi JM, Isabelle O, Angevain M, Génier G, Nansat P., 1993 :** Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes. INRA. Mauguio. N°4. P: 1-5.
- **Ramakrishnan M, Hughes JS., 2006:** *Medicago truncatula* Stock centres. South Australian Research & Development Institute (SARDI), Adelaide, South Australia. P : 5-18.
- **Saada A., 2008 :** Identification cytogénétique d'espèces annuelles du genre *Medicago* par les techniques de coloration au Feulgeu et au Giemsa. Laboratoire de génétique et amélioration des plantes. Université d'Oran, Es-Senia. Mémoire de Magistère. P: 1.
- **Samuel Roberts Noble Foundation, 1997 :** Center for *Medicago* Genomics Research [en ligne]. Page consulté le 20.05.2014. Adresse URL: <<https://www.noble.org/research/medicago/>>.
- **Samuel Roberts Noble foundation, 2014 :** *Medicago truncatula* Gene Expression Atlas [en ligne]. Page consulté le 20.05.2014. Adresse URL: <<http://mtgea.noble.org/v3/>>.

- **Schoutteten F., 2004** : La luzerne. Fiche technique agro-industrie. Champagen-Ardenne. P : 1-5.
- **Small E, Jomphe M, 1989**: A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). Canad. J. Bot. 67. P: 3260 – 3294.
- **Seyed L, Rouhollah M, Mosharraf M, Hossain M, Ismail M, Rahman M., 2012**: Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses, Water Stress, Prof. Ismail Md. Mofizur Rahman (Ed.), ISBN: 978-953-307-963-9, InTech, Available from:
<<http://www.intechopen.com/books/water-stress/water-stress-inplants-causes-effects-and-responses>>.
- **Thomas MR, Rose RJ, Nolan KE., 1992**: Genetic transformation of *Medicago truncatula* using Agrobacterium with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Rep.*, 11. P:113-117.
- **Tradieu F, Simoneau T., 1998**: variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modeling isohydric and anisohydric behaviours. *J. exp. Bot.* **49**. P: 419-432.
- **Trieu AT, Harrison MJ., 1996**: Rapid transforamation of *Medicago truncatula*: regeneration via shoot organogenesis. *Plant Cell Rep.*, 16. P: 6-11.
- **Verslues PE, Agarwal M, Katiyar A, Zhu J, and Zhu JK., 2006**: Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant Journal*, 45. P: 523–539.
- **Williams PM, Heid CA, Stevens J, Livak KJ., 1996**: Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6.p: 941-986.
- **Yokota A, Takahara K, Akashi K., 2006**: Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. *Springer*. P: 15–39.

- **Zeevaart J., 2006:** Florigen coming of age after 70 years. *Plant Cell* 18:1783-1789
- **Zeevaart J., 2007:** FT protein, not mRNA, is the phloem-mobile signal for flowering. *Plant physiology online*.