



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
Université Frères Mentouri Constantine -1-
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale

N° d'ordre :102/DS/2022

N° de série :02/Eco/2022

Thèse

En vue de l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES

Filière : Biologie et Physiologie Végétale

Spécialité : Bases Biologiques de la Production Végétale

Présentée par : **Mme Hammadi Hamida**

Thème

**Analyses morphologique, cytogénétique et moléculaire du *Lens*
culinaris Medik(Ssp *Macrosperma* et *Microsperma*) : importance de
cette espèce en agronomie.**

Soutenue le :18/12/2022

Devant le jury :

Président :	BOUSBA Ratiba	Professeur Uni.Freres Mentouri-Constantine1.
Directeur de la thèse :	HAMMOUDA Dounia	Professeur Uni.Freres Mentouri- Constantine1
Examineurs :	CHAIB Ghania	Professeur Uni. Freres Mentouri-Constantine1.
	KANOUNI Malika	Professeur Université Om-EL Bouaghi.
	BOUNAR Rabeh	Professeur Uni Mohamed Boudiaf-M'sila.
	BAZIZ Karim	M. C.A Université Hadj Lakhdar-Batna.

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Je tiens tout d'abords à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance à Allah de m'avoir donné la patience, le courage d'accomplir ce travail.

*Je remercie infiniment, Madame le Professeur **HAMMOUDA- BOUSBIA Dounia**, enseignante a l Université de Constantine1, pour m'avoir proposé ce sujet de thèse passionnant et avoir dirigé mon travail pendant ces six années et qui en plus d'être mon encadreur. J'ai trouvé en elle des qualités humaines et scientifiques qui m'ont aidé aussi bien, à avancer dans mes travaux. Je la remercie pour sa patience, sa disponibilité et ses précieux conseils, pour le temps qu'elle m'a accordé durant tout mon parcours jusqu'à la finalisation de cette thèse.*

*Mes remerciements sont aussi adressés à Madame le Professeur **BOUSBA Ratiba** de l'université des frères Mentouri-Constantine1 d'avoir acceptée de présider mon jury.*

*Je tiens a remercier, énormément, Madame le Professeur **CHAIB Ghania** de l'université des frères Mentouri-Constantine1 pour avoir acceptée d'examiner ce travail.*

*Je remercie également Madame le Professeur **KANOUNI Malika** de l'université Oum El-Bouaghi. d avoir acceptée d'examiner ce travail.*

*Je tiens aussi, a remercié Monsieur le Professeur **BOUNAR Rabeh** de l'université Mohamed Boudiaf de M'sila d'avoir acceptée d'examiner ce travail.*

*Mes chaleureux remerciements sont aussi adressés à Monsieur le **Dr.BAZIZ Karim** maître de conférences classe « A » à l'université Hadj Lakhdar. Batna.*

*Les travaux de cette thèse sont déroulés au laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales, département de biologie et d'écologie végétal de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Constantine 1, sous la direction du Professeur **HAMMOUDA-BOUSBIA Dounia**, et en partie à Centre de recherche en biotechnologie végétale (**CRBT**) sous la direction du **Dr. Ammar AZIOUNE**, que je présente mon grand remerciement pour tous l'équipe.*

*Je remercie aussi **Mlle Dr .GAAD Djouher** chercheuse au (CRBT) Centre de recherche en biotechnologie végétale pour son soutien théorique et pratique, ainsi que pour sa disponibilité tout au long de mon stage à CRBT ,et aussi pour son utilité, en me donnant les amorces pour accomplir l'étude moléculaire .*

*Je remercie également les personnels de la CNCC et le directeur de la station ITGC El-Khroub Constantine **Mr. SAKHRI Mohamed El Hadi** dont ils étaient serviables, en me fournissant les graines des différents génotypes.*

*Mes vifs remerciements à monsieur le directeur de CRBT de Constantine
Pour me donner une chance de faire mon stage chez lui.*

*A tous les étudiants (masters2) de **Mme HAMMOUDA: Nadia, Maroua, Chahrazad, Alia et Ikram** qui ont joué un rôle déterminant dans la réalisation de cette étude.*

*J'exprime ma profonde reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont permis de mener à bien ce travail, en particulier **Mlle Radhia DJEGHAR**, **Mme BOULDJADJ Rima** Pour le soutien moral qu'elles m'ont apporté lors de mes recherches au laboratoire, non pas oublier **Mlle Chafiqua et Mr Nadir BELBEKRI.***

*Parmi toutes les personnes à qui je souhaite adresser mes plus sincères remerciements quelques membres de, CRBT Constantine laboratoire de Biomoléculaire et Biochimie **Dr .RIMA BOUDCHICHA** pour sa gentillesse avec moi et pour ces encouragements. Sans oublier **Mme MAGHBOUNE Ibtissam** qui m'a beaucoup aidé à obtenir le stage en CRBT. Egalement, je n'oublie pas :, **Amine, Faiza, Ali, Zobaida, Selwa et Anfel** pour leur sympathie, leur soutien et leurs encouragements.*

De façon plus personnelle, un grand merci à ma famille en particulier ma mère, mon mari, ma sœur qui m'ont encouragés et soutenus durant toutes ces années d'apprentissage.

Je remercie également toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je dédie se modeste travail à :

Mes chers parents, nulle dédicace n'est acceptable de vous exprimer ma profonde reconnaissance et mon immense gratitude pour tous les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et mes études. QU'Allah vous garder en bonne santé.

Mon ami et compagnon de ma vie sur qui je m'appuie dans l'adversité et pleure dans ses bras A mon cher mari Abdousslam

Mes deux princesses : Hiba et Hadjer

Mon amie, compagne et sœur, sans qui je n'aurais pas terminé mes études, la meilleure personne que j'ai connue, ma chère sœur

Fatima Zahra

Mon frères Djalal et A Mes petites

nièce Toba et Lina

Mon encadreur Mme Hammouda Dounia

Pour toute ma famille, mes amis sans oublier à tous ceux qui j'aime

Qui on été devant moi de proche et de loin.

Résumé

La lentille (*Lens culinaris*), une des principales cultures légumineuses alimentaires cultivées en Algérie. L'objectif de ce travail est l'évaluation de la variabilité génétique de 12 cultivars à travers des approches agro-morphologiques, cytogénétiques, biochimiques et moléculaires.

Des nombreux travaux sont effectués à différents niveaux (plante, graine, cellule, chromosome, protéine et ADN). Ces travaux consistent à étudier la caractérisation agro morphologique réalisée sur 15 paramètres quantitatifs, d'établir une étude cytogénétique détaillée (analyse du caryotype, NORs, N-banding et C-banding, méiose et palynologie), l'analyse biochimique pour mettre en évidence la teneur en protéines par la technique SDS-PAGE. Parallèlement, une caractérisation moléculaire effectuée à partir de 7 marqueurs microsatellites proposés.

Les cultivars Idlep3 et Flip90-31 ont révélés un potentiel de rendement élevé et l'existence d'une différence significative selon les paramètres morphologiques qui expliquent une variation inter-génotypique importante, les scores PC1 (F1) et PC2 (F2) sont calculés comme 36,87 et 21,93 % de la variance totale, respectivement. Selon le clustering hiérarchique ascendant, l'analyse a révélé cinq groupes majeurs avec une différentiation des types de graines (*Macrosperma* et *Microsperma*).

Les résultats cytogénétiques montrent une régularité entre la mitose et la méiose. Les caryotypes sont symétriques. une corrélation positive est mise en évidence entre le taux d'hétérochromatine et le nombre de NOR. a partir des bandes C et N. Nos résultats sont originaux, consternant la détermination des chromosomes marqueurs 1, 2,3,4 , alors que les chromosomes 5,6,7 en sont dépourvues. A noter également, la présence de satellites et de chromosomes B de types (euchromatique et hétérochromatique), dans ce cas là, pourrait être expliquée comme une manifestation de leur adaptation. Egalement, nous avons observé des anomalies méiotiques, et l'existence d'une variabilité par l'étude les caractères biométriques de pollens des différentes cultivars ce qui reflète la grande diversité.

Le polymorphisme du motif de bandes protéiques (84 %) a révélé une variabilité inter-génotypique. Le gel obtenu a montré quarante bandes allant de 13 à 21 avec un poids moléculaire de 10 à 120 KDa. Le cultivar Idlep3 est caractérisé par des bandes spécifiques, suivi du cultivar Flip90-31.

Une grande variabilité génétique caractérise les cultivars de lentille. Le nombre d'allèles par locus varie de 2 (SSR317-1) à 6 (SSR19,SSR 151) et l'indice PIC variait entre 0,42 à 0,75 . La fréquence de l'allèle le plus courant à chaque locus varie de 42 % (SSR317-1) à 75 % (SSR28, SSR19). Sur la base des coefficients de similarité génétique 44%, l'analyse de dendrogramme révélé une grande diversité observée chez les cultivars, et il sépare les cultivars en cinq groupes. Signalons, qu'il n'existe pas une relation entre l'origine géographique des cultivars et la distance génétique.

La relation génétique découverte dans cette étude pourrait constituer à la base de futures programmes de sélection systématique de lentilles.

Les cultivars Idlep3 ,Dahra et Flipe90-31 marquent les rendements les plus élevés et se caractérisent par des bandes spécifiques (ou marqueurs spécifiques) ,ce qui suggère que ce sont les cultivars les plus adaptés. Donc, nous pouvons les proposer aux agronomes de les utiliser dans les croisements des lentilles pour la sélection végétale.

Mots clés : Bandes C, Bandes N, Caryotype, Chromosomes marqueurs, chromosomes B , *Lens culinaris*, NORs, Polymorphisme , Satellites, SDS-PAGE, SSR.

Summary

Lentil (*Lens culinaris*), one of the main food leguminous crops grown in Algeria. The objective of this work is the evaluation of the genetic variability of 12 cultivars through agro-morphological, cytogenetic, biochemical and molecular approaches.

Many works are carried out at different levels (plant, seed, cell, chromosome, protein and DNA). This work consists of studying the agro-morphological characterization carried out on 15 quantitative parameters, establishing a detailed cytogenetic study (karyotype analysis, NORs, N-banding and C-banding, meiosis and palynology), biochemical analysis to highlight protein content by SDS-PAGE technique. At the same time, a molecular characterization carried out using seven proposed microsatellite markers.

The Idlep3 and Flip90-31 cultivars revealed a high yield potential and the existence of a significant difference according to the morphological parameters which explain a significant inter-genotypic variation, the PC1 (F1) and PC2 (F2) scores are calculated as 36.87 and 21.93% of the total variance, respectively. According to the ascending hierarchical clustering, the analysis revealed five major groups with differentiation of seed types (*Macrosperma* and *Microsperma*).

Cytogenetic results show regularity between mitosis and meiosis. The karyotypes are symmetrical. A positive correlation is demonstrated between the level of heterochromatin and the number of NOR. from bands C and N. Our results are original, dismaying the determination of marker chromosomes 1,2,3,4, while chromosomes 5,6,7 do not have any. Also note, the presence of satellites and type B chromosomes (euchromatic and heterochromatic), in this case, could be explained as a manifestation of their adaptation. In addition, we observed meiotic abnormalities and the existence of variability by studying the biometric characters of pollens of different cultivars, which reflects the great diversity.

Polymorphism of the protein banding pattern (84%) revealed inter-genotypic variability. The gel obtained showed forty bands ranging from 13 to 21 with a molecular weight of 10 to 120 KDa. The Idlep3 genotype is characterized by specific bands, followed by the Flip90-31 cultivar.

A large genetic variability characterizes lentil genotypes. The number of alleles per locus ranges from 2 (SSR317-1) to 6 (SSR19,SSR 151) and the PIC index ranges from 0.42 to 0.75. The frequency of the most common allele at each locus ranges from 42% (SSR317-1) to 75% (SSR28, SSR19). Based on the 44% genetic similarity coefficients, the dendrogram analysis revealed a large diversity observed among the cultivars, and it separates the cultivars into five groups. Note that there is no relationship between the geographical origin of the cultivars and the genetic distance.

The genetic relationship discovered in this study could form the basis of future systematic lentil breeding programs.

The Idlep3,Dahra and Flipe90-31 cultivars show the highest yields and are characterized by specific bands (or specific markers), which suggests that they are the most suitable cultivars. Therefore, we can offer them to agronomists to use them in lentil crosses for plant breeding

Keywords: B chromosomes ,C bands, Karyotype, Marker chromosomes, N bands, *Lens culinaris*, NORs, Polymorphism, Satellites, SDS-PAGE, SSR.

الملخص

العدس (*Lens culinaris*) هو أحد المحاصيل البقولية الغذائية الرئيسية المزروعة في الجزائر و الهدف من هذا العمل هو تقييم التباين الجيني لـ 12 صنفا وراثيًا من خلال الأساليب الزراعية المورفولوجية والخلوية والكيميائية الحيوية والجزئية.

يتم تنفيذ العديد من الأعمال على مستويات مختلفة (النبات ، البذور ، الخلية ، الكروموزوم ، البروتين والحمض النووي). يتكون هذا العمل من دراسة التوصيف المورفولوجي الزراعي الذي تم إجراؤه على 15 معيارًا كميًا ، وإنشاء دراسة وراثية خلوية مفصلة (تحليل النمط النووي ، المناطق المنضمة للنويات NORs ، النطاقات N و النطاقات C ، الانقسام الاختزالي ودراسة حبوب الطلع) ، تحليل الكيمياء الحيوية لتسليط الضوء على محتوى البروتين بواسطة تقنية PAGE-SDS. في الوقت نفسه ، تم إجراء التوصيف الجزيئي باستخدام 7 علامات مقترحة ميكروساتيليت.

كشفت الأصناف الجينية Idlep3 و Flip90-31 عن إمكانات إنتاجية عالية ووجود فرق كبير وفقًا للمعايير المورفولوجية التي تفسر تباينًا كبيرًا بين الأنماط الجينية ، وتم حساب درجات (F1) PC1 و (F2)PC2 على أنها 36.87 و 21.93٪ من التباين الكلي على التوالي. وفقًا للتسلسل الهرمي التصاعدي، كشف التحليل عن خمس مجموعات رئيسية مع تمايز أنواع البذور (*Microsperma* و *Macrosperma*).

تظهر النتائج الوراثة الخلوية الانتظام بين الانقسام والاختزال. الأنماط النووية متناظرة. تم إثبات وجود علاقة إيجابية بين مستوى الهيتروكروماتين وعدد NOR. من النطاقات C و N. نتاجنا أصلية ، مما يؤدي إلى تحديد كروموزومات العلامة 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، في حين أن الكروموسومات 5 ، 6 ، 7 لا تحتوي عليها. لاحظ أيضًا أن وجود ساتيليت والكروموزومات من النوع B (متماثل اللون وغير متجانس اللون) ، في هذه الحالة ، يمكن تفسيره على أنه مظهر من مظاهر تكيفها. كما لاحظنا وجود شذوذ انتصافي ووجود تنوع من خلال دراسة الخصائص الحيوية لحبوب اللقاح لأصناف وراثية مختلفة مما يعكس التنوع الكبير.

كشفت تعدد الأشكال البروتيني (84٪) عن تباين بين الأصناف الجينية. أظهر الهلام الذي تم الحصول عليه أربعين نطاقًا تتراوح من 13 إلى 21 بوزن جزيئي يتراوح من 10 إلى 120 كيلو دالتون. يتميز الصنف الجيني Idlep3 بنطاقات محددة ، يليها الصنف الجيني Flip90-31.

هناك تنوع جيني كبير يميز الأصناف الجينية للعدس. يتراوح عدد الأليلات لكل موضع من 2 (SSR317-1) إلى 6 (SSR19 ، SSR151) ويتراوح مؤشر PIC من 0.42 إلى 0.75. يتراوح تواتر الأليل الأكثر شيوعًا في كل موضع من 42٪ (SSR317-1) إلى 75٪ (SSR19 ، SSR28). بناءً على معاملات التشابه الوراثي البالغة 44٪ ، كشف تحليل مخطط الأسنان عن تنوع كبير لوحظ بين الطرز الجينية ، وقام بفصل الأصناف الجينية إلى خمس مجموعات. لاحظ أنه لا توجد علاقة بين الأصل الجغرافي للأصناف الجينية والمسافة الجينية.

يمكن أن تشكل العلاقة الجينية المكتشفة في هذه الدراسة أساس برامج تربية العدس المنهجية في المستقبل. تُظهر الأصناف الجينية Dahra ، Idlep3 و Flipe90-31 أعلى إنتاجية وتتميز بنطاقات محددة (أو علامات محددة) ، مما يشير إلى أنها الأصناف الجينية الأنسب الأكثر ملاءمة. لذلك يمكننا أن نقدمها للمهندسين الزراعيين لاستخدامها في تهجين العدس لتربية النباتات

الكلمات المفتاحية: نطاقات C ، نطاقات N ، النمط النووي ، كروموزومات العلامة ، كروموزومات B ، *Lens culinaris* ، NORs ، تعدد الأشكال ، ميكروساتيليت ، SDS-PAGE ، SSR.

Liste des figures

Figure 01 : Structure de la plante de lentille : (image originale dans Saxena, 2009).....	07
Figure 02 : Production mondiale moyenne de la lentille par continent pendant les années 2012 et 2013 (FAOSTAT, 2016).....	09
Figure 03 : Zones d'aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC,2013).....	11
Figure 04 : Evolution annuelle des superficies (million ha), productions (million tonnes) et rendement (Kg/ha) de la lentille en Algérie entre 1961 et 2016 (FAOSTAT, 2017).....	12
Figure 05 : structure d'un chromosome.....	16
Figure 06 : Structure de l'ADN.....	17
Figure 07 : Localisation de l'ADN satellite et l'ADN répétitif dans un chromosome.....	19
Figure 08 : les différents types des aberrations (ou mutations) chromosomiques).....	20
Figure 09 : Les Différents stades de la méiose : (a) Zygotène, (b) Pachytène, (c) Diplotène, (d) Métaphase I, (e-f) Anaphase I, (g) Télophase I, (h) Prophase II, (i) Métaphase II, Anaphase II, (k) Télophase II (Deysson, 1976).....	23
Figure 10 : Grain de pollen de génotype « Métropole » de l'espèce <i>Lens culinaris</i> prise par un photo microscope Leica DM 4000 B Led.(Hammadi,2019).....	26
Figure 11 : Structure de grain de pollen Observée au microscope électronique.....	28
Figure 12 : Grain de pollen de génotype « Dahra » de <i>Lens culinaris</i> sort des loges des anthères des étamines (microscope Leica DM 4000 B Led).....	30
Figure 13 : (a) Pollen de forme arrondie avec pore (s)(pore), (b) avec sillon(s)(colpe) , (c) avec pore et sillon(s) (colpore).....	31
Figure 14 : les types des grains de pollen :(a) :pollen de forme arrondie sans ballonnets (b) :avec ballonnets(inaperture).....	32
Figure15 :des grains de pollens chez différents végétaux	32
Figure 16 : Identification des grains de pollens chez différents végétaux.....	33
Figure 17 :Représentation schématique de la microsporogénèse chez les angiospermes. Orange : noyau diploïde, jaune : noyau haploïde.....	34
Figure 18 : Cytocinèse, mode de dépôt de la callose et forme des tétrades chez les angiospermes (Ressayre et <i>al.</i> , 2002).....	35
Figure 19 : Les graines des génotypes étudiés de la lentille cultivée introduites dans différentes techniques.....	36
Figure 20 : Microscope photonique Leica DM 4000 B Led.....	41
Figure 21 : Marqueur de poids moléculaire (pic19) pris comme référence pour la quantification d'ADN.....	49
Figure 22 :Hauteur de la plante de lentille (30 jour, 60 jour, à la maturité).....	53
Figure 23 : Surface foliaire des génotypes étudiée.....	53
Figure24 :Nombre des branches (primaires, secondaire).....	55
Figure 25 : Nombre des folioles par feuille.....	55
Figure 26 : Jours jusqu'à floraison des génotypes de lentille.....	58
Figure 27 : Nombre des jours jusqu'a maturité.....	58
Figure 28 :Nombre des gousses /plante.....	58
Figure 29 : Nombre des graines /plante.....	58
Figure30 : Rendement biologique /plante.....	59
Figure 31 : Poids de 1000 graines.....	59

Figure 32 : L'indice de récolte.....	59
Figure 33 : Pois des graines /plante.....	59
Figure 34 : Cercle de corrélation des variables issues de l'analyse des 12 cultivares.....	62
Figure 35 . Représentation graphique de la répartition des individus eux deux niveaux.....	65
Figure 36 :Une représentation conjointe des individus étudiés et des métriques eux deux niveaux.....	65
Figure 37 :Dendrogramme des paramètres agro-morphologiques de 12 cultivares.....	66
Figure 38 : Mitose et méiose pollinique : (a, b, c) chez <i>Lens culinaris</i>	73
Figure 39 : Caryotype de l'espèce <i>Lens culinaris</i> Medik cultivares(Syrie229,Dahra).....	78
Figure 40 : Caryotype de l'espèce <i>Lens culinaris</i> Medik génotype Flip90-31,Métropole)...	78
Figure 41 : Caryotype de l'espèce <i>Lens culinaris</i> Medik génotype Idlep1,Idlep3).....	79
Figure 42 : Plaques de métaphases marquées par les bandes C.....	82
Figure 43 : Caryotypes marqués par des bandes C des génotypes de <i>Lens culinaris</i>	84
Figure 44 : Détection des deux types d'hétérochromatine (constitutive et facultative) chez le génotype Dahra.....	87
Figure 45 : Caryotype en N-banding des génotypes (Métropole,Flip90-31 et Syrie229).....	90
Figure 46 : Caryotype en (N- banding) de l'espèce <i>Lens culinaris</i> Medik génotype (Idlep1,Idlep3,Dahra).....	92
Figure 47 : Caryotype en (N- banding) de l'espèce <i>Lens culinaris</i> Medik génotype (Nile45,Ibla,Redjes,Idlep2).....	93
Figure 48 : Analyse comparative des chromosomes du génome <i>Lens culinaris</i> , marqués par les bandes N.....	96
Figure 49 :Schéma montrant la localisation de l'hétérochromatine (bandes C et N) et des organisateurs nucléolaires (N.O.R) sur les chromosomes marqueurs.....	97
Figure 50 : Les différentes étapes de la division méiotique des cellules mères polliniques de 4 génotypes de l'espèce <i>Lens culinaris</i> observés au microscope photonique(X100).....	100
Figure51a :Principales types de bivalents observés en Métaphase I observé au microscope Photonique (X100).....	101
Figure 51b : Les anomalies associées aux méioses polliniques observéesau microscope photonique (X100) chez les génotypes « Idleb3 », « Idleb4», « Dahra », « Syrie 229 », « Redjes » de l'espèce <i>Lens culinaris</i> .m :micronoyaux , B :Chromosomes B.....	101
Figure 52 : Pollens observés au microscope photonique (X10) chez les génotypes étudiée. (c)-(e) représentent les anthères avec ses pollens.....	103
Figure 53 : Pourcentage des grains colorés de différents génotypes chez la lentille <i>Lensculinaris</i>	104
Figure 54 : Mesures (L) Longueur (E) largeur des grains de pollen. (x100).....	105
Figure 55 : Pollen observé au microscope photonique (X100), (a) vue équatoriale de génotype Dahra, (b) vue polaire de génotype Balkane 755.....	106
Figure 56 : (a) Types de tétrades (d'après la référence. Ressayre et al., 2002).(b) Tétrades tétraogonales et rhomboïdales de l'espèce <i>Lens culinaris</i> observée au microscope photonique(X100).....	108
Figure 57 :Test de quatre amorces (SSR 317-2-SSR 130 - SSR151-SSR33) sur les génotypes de <i>Lens</i> . M : marqueur de taille 50 pb.....	119
Figure 58 :Profil électrophorétique de l'amorce SSR19 sur gel de polyacrylamidechez 12 génotypes de la lentille après l'amplification par PCR.....	121
Figure59 : Profil électrophorétique del'amorce SR323 sur gel de polyacrylamide chez 12 génotypes dela lentille après l'amplification par PCR.....	121

Figure 62 : Dendrogramme généré sur la base des données SSR des 12génotypes de la lentille.....	122
Figure 60 :Profil électrophorétique de l’amorce SSR48 sur gel de polyacrylamide chez 12 génotypes de la lentille après l'amplification par PCR.....	123
Figure 61 : Profil électrophorétique de l’amorce SSR199 sur gel de polyacrylamide chez 12 génotypes de la lentille après l'amplification par PCR.....	123

Liste des tableaux

Tableau 01 : Listes des génotypes et origines du l'espèce <i>Lens culinaris</i> Medik.....	36
Tableau 02 : Méthodes d`analyses de l'hétérochromatine et de localisation des N.O.R.....	42
Tableau03 : Composition du mélange réactionnel de l'amplification selon la technique master mixte.....	50
Tableau04 : Programme PCR réalisé Pour l'amplification dans le cas d'amorce « SSR ».....	51
Tableau 05 : Caractéristiques des amorces étudiées et des microsatellites à amplifier, Aladdin Hamwiah <i>et al</i> , (2009).....	51
Tableau 06 : Nomenclature chromosomique proposée par Levan <i>et al</i> . (1964).....	53
Tableau 07 : Les formes de pollen selon le rapport P/E (Erdtman, 1952).....	54
Tableau 08 : les axes (1.2).....	60
Tableau 9. Matrice de corrélation.....	63
Tableau 10. L'efficacité des variables sur les deux principaux axes.....	62
Tableau 11. Les caractères morphométriques des chromosomes chez les génotypes du <i>Len scularis</i>	76
Tableau 12 : Nombre et localisation des bandes C sur les chromosomes de génotypes riches en heterochromatine de <i>Lens culinaris</i>	85
Tableu13: Étude de quelques caractères chez le <i>Lens culinaris</i>	86
Tableau 14 : Nombre et localisation des NOR chez les 12 génotypes.....	89
Tableau 15 : Données morphométriques des grains de pollen des génotypes de <i>Lens culinaris</i>	107
Tableau 16 : Informations sur les marqueurs microsatellites (SSR) ainsi que leurs allèles respectifs, leur hétérozygotie et leur valeur de contenu d'information polymorphe (PIC).....	120

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
ACP : Analyse en Composante Principale
AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism
APS: Amonium PurSulfate
ARNm: L'acide ribonucléique messenger
B : Chromosome B.
BSA : Bovin Serum Albumine
BC: Bande centromérique.
BI: Bande intercalaire.
BT: Bande télomérique.
BET: Bromure d'Ethidium
CBB :bleu brillant de coomassie
CAH : Classification Ascendante Hiérarchique
CMP : Cellules mères de pollen
CS : Construction secondaire.
CNCC : Centre National de Contrôle et Certifications des Semences et des Plants
CRbt :Centre de recherche en Biotechnologie
CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
dNTP : 2'-désoxyribonucléoside 5'-triphosphate
EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
FAO: Food and agriculture organization
FISH : Hybridation in situ.
Frq : Fréquence allélique
HP :Hauteur de la plante
ICARDA : Centre international de recherche agronomique dans les zones arides
INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
ISSR: Inter Simple Sequence Repeat
ITGC :institut technique des grandes cultures.
IR :Indice de recolte
kb: kilo base
MgCl₂ : chlorure e Magnésium
Na Cl : Chlorure de sodium
Na⁺ : Ion sodium
NBrP :Nombre des branches primaire
NBrS :Nombre des branches secondaire
NJF : Nombre des jours a floraison
NJM : Nombre des jours a maturite
NOR : Région organisatrice nucléolaire.
Ngo/P : Nombre des gousses/plante
NG/P :Nombre des graines/plante
PAGE : PolyAcrylamid Gel Elestrophoresis
PCR : Polymerase chain Reaction (Réaction de polymérisation en chaîne)
pb :Paire de base
PH : Potentiel hydrogène
PIC: Polymorphism Information Content
PSBMV : le virus de la mosaïque transmise par les graines de pois
PMG : pois de mille graines
RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA
RBIO/P : Rendement biologique /plante
RFLP: Restriction Fragment Lenth Poymorphism
Rpm : Rotation par minute
SF :Surface Foliare
SDS-PAGE: Sodium Dodécyl Sulfate- PolyAcrylamid Gel Elestrophoresis

SNP: Single Nucleotide Polymorphism

SSR: Simple Sequence Repeats

S : Satellite.

Subsp : Sous l'espèce.

Taq : *Thermus aquaticus* (bactérie des sources chaudes)

TBE : Tris-Borate-EDTA

TEMED: Tétraméthyléthylènediam

UV : Ultra violet

UPGMA: Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic Averages

V : Volt

µm :Micro mètre.

Sommaire

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse	1
Introduction.....	
Chapitre I : Revue bibliographique	
1. Revue bibliographique.....	4
1.1. Historique et origine de lentille.....	4
1.2. Classifications génétique et botanique.....	4
1.3. Noms communs.....	6
1.4. Description générale sur la plante.....	6
1.5. Valeur nutritive et utilisation.....	7
1.5.1. Valeur nutritive.....	7
1.5.2. Utilisation de la lentille cultivée	8
1.6. Production et répartition géographique.....	8
1.6.1. Répartition mondiale de lentille	8
1.6.2. Production et répartition en Algérie.....	9
1.7. Techniques de culture.....	12
1.7.1. Exigences relatives au climat et au sol.....	12
1.7.2. Temps de semis.....	12
1.7.3. Exigences en matière de fertilisation et d'engrais.....	13
1.7.4. Gestion des lentilles.....	13
1.7.5. Récolte.....	13
1.7.6. Maladies et ravageurs.....	13
1.7.8. Pratiques culturelles.....	14
1.7.9. Rendement des semences.....	14
1.8. Caractéristiques cytogénétiques.....	15
1.8.1. Mitose somatique.....	15
1.8.2. Définitions	15
1.8.2.1 Génome	15
1.8.2.2. Chromosome	15
1.8.2.3. Caryotype.....	17

1.8.2.4. Réalisation du caryotype	17
1.8.5. Structure du chromosome	17
1.8.5.1. Chromatine.....	17
1.8.5.1.1. Euchromatine.....	17
1.8.5.1.2. Hétérochromatine.....	18
1.8.6. Rôles attribués à l'hétérochromatine.....	18
1.8.7. Différents types d'ADN.....	19
1.8.7.1. L'ADN Satellitaire.....	20
1.8.7.2. L'ADN répétitive ou répété.....	20
1.9. Comportement méiotique.....	21
1.9.1. Étapes de la Méiose.....	21
1.9.1.1. Pont chromosomique.....	22
1.9.1.2 Chromosomes retardataires.....	22
1.9.1.4 Chromosomes B.....	22
1.9.1.5. La recombinaison méiotique.....	23
1.9.2. Les mutations chromosomiques.....	23
1.9.2.1. Anomalies de type nombre.....	23
1.9.2.2. Anomalies de type structure.....	24
1.10. Données palynologiques.....	26
1.10.1. Palynologie.....	26
1.10.2. Intérêt de la palynologie.....	26
1.10.3. Pollen.....	27
1.10.3.1. Structure de grain de pollen.....	27
1.10.3.2. Classification des grains de pollen.....	29
1.10.3.3. Les différentes formes du grain de pollen.....	30
1.10.3.4. La viabilité des grains de pollen.....	31
1.10.4. Relation entre la méiose et la palynologie.....	32
1.10.5. Détermination du type apertural lors de la microsporogénèse.....	32
1.11. Les principaux types de marqueuses	34
1.11.1. Les marqueurs morphologiques	34
1.11.2. Les marqueurs cytogénétiques.....	34
1.11.3. Les marqueurs biochimiques (isozyme, protéine)	35
1.11.4. Les marqueurs moléculaires	35

Chapitre II : Matériel et Méthode

2. Matériel et méthodes	36
2.1. Matériel végétal.....	36
2.2. Techniques utilisées	37
2.2.1. Étude morphologique.....	37

2.2.2. Paramètres morphologiques	37
2.3.Étude cytogénétique	38
2.3.1.Méthode classique de denombrement chromosomique.....	38
2.3.2.Méthodes d`analyses de l`hétérochromatine et de localisation des N.O.R	40
2.3.2.1. Technique de C-banding	40
2.3.2.2. Technique de N-banding.....	40
2.3.3. Le comportement méiotique.....	40
2.3.4.Étude palynologique	43
2.3.4.1. Prélèvement des grains de pollen.....	43
2.3.4.2. Observation et mesure de la morphologie des grains de pollen	43
2.3.4.3. Test de viabilité et mesure des grains de pollen.....	43
2.4.Étude biochimique.....	44
2.4.1. Extraction de protéines.....	44
2.4.2. Estimation des protéines.....	44
2.4.3. Technique de SDS – PAGE.....	44
2.5. Étude moléculaire.....	45
2.5.1. Prélèvements.....	45
2.5.2. Extraction d`ADN génomique.....	45
2.5.3. Quantification de l`ADN	45
2.5.4. Préparation du gel agarose pour tester L`ADN et les amorces	46
2.5.4.1. Préparation de gel d agarose 1.5%.....	46
2.5.4.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR	46
2.5.5. Électrophorèse sur gel d`acrylamide	48
2.5.5.1. Préparation du gel	48
2.5.5.2. Révélation du gel	49
2.5.5.3. Dépôt des échantillons et migration	49
2.6. Analyse statistique des résultats.....	50
2.6.1. Résultats agro-morphologiques.....	50
2.6.2. Résultats cytogénétiques	50
2.6.3. Résultats biochimiques.....	50
2.6.4. Résultats moléculaires.....	51
1. Distance génétique	51
2. Dendrogramme	51

Chapitre III Résultats et discussion

3. Résultats et discussion.....	52
3.1. Analyses agro-morphologique.....	52
3.1.1. Les paramètres morphologiques.....	52

3.1.2. Paramètres agronomiques.....	54
3.1.2. Analyse de la variabilité morphologique.....	60
3.1.3. 1.Matrice de corrélation.....	60
Discussion.....	67
Conclusion.....	71
.	
3.2. Analyses cytogénétique.....	72
3.2.1. Dénombrement chromosomique.....	72
Discussion.....	75
3.2.2. Organisation et distribution de l'hétérochromatine par le C-banding	81
Discussion.....	86
3.2.3. les organisateurs nucléolaires (N.O.R.).....	89
Discussion	94
3.2.6. Analyse du comportement méiotique.....	99
Discussion.....	102
3.2.7. Viabilité et caractères morphologiques du pollen.....	103
Discussion.....	108
Conclusion	110
3.3. Analyses biochimique.....	112
3.4. Analyses e moléculaire.....	119
3.4.1. Extraction de l'ADN génomique et test de qualité.....	119
3.4.2. Amplification des amorces SSR.....	119
3.4.3. Distance génétique entre les génotypes.....	122
Discussion.....	124
Conclusion.....	126
Synthèse des Travaux et Perspectives.....	127
Références bibliographiques.....	132
Annexe	

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse

Publications Internationales

HAMIDA HAMMADI, DOUNIA HAMMOUDA-BOUSBIA, GHANIA CHAIB, ANFEL TIR. 2021. Genetic diversity in several genotypes of Algerian lentil using biochemical markers. **BIODIVERSITAS** . ISSN: 1412-033X, Volume 22, Number 6, E-ISSN: 2085-4722, Pages: 3494-2500. *biodiversitas.mipa.uns.ac.id*, SCOPUS,

HAMIDA HAMMADI, DOUNIA HAMMOUDA-BOUSBIA. 2022. Comparative analysis of chromosomes of *Lens culinaris* Medik. by cytogenetic marker, **South Asian Journal of Experimental Biology** (sous press).

Communications Nationales

HAMMADI Hamida, HAMMOUDA Dounia.(2020). Analyse de la variabilité génétique de quelques géotypes de *Lens culinaris* Medik Sélectionné en Algérie basée sur SDS-PAGE technique. **1st International conference on biodiversity in service of biotechnologies.** University center of Mila, Algeria 9- 10 Mars. <http://virtuelcampus.univ-msila.dz>.

HAMMADI Hamida HAMMOUDA Dounia.(2021). Analyse du comportement méiotique et étude palynologique de quelques géotypes de lentille cultivée (*Lens culinaris* MEDIK.). **1er Séminaire National sur les Ressources Naturelles face aux Contraintes d'Usage et du Changement Climatique (SENACUC)** Le 4 Juillet - Mila (Google Meet). Centre-Uni-Mila. <http://www.centre-univ-mila.dz>

HAMMADI Hamida, HAMMOUDA Dounia. (2021). Comparative study of karyomorphology in six genotypes of *Lens culinaris* MEDIK.. Le **1er Séminaire National sur les Substances Naturelles, Biotechnologie et Innovations (SNBI 2021)** 26 & 27 Octobre .Online participation (via webinaire).

Communications Internationales

HAMMADI Hamida, HAMMOUDA Dounia.(2021). Heterochromatic distribution and localization of nucleolar organizers (N.O.R) in *Lens culinaris* Medik. **International Seminar on Biodiversity, Valorization and Conservation of Urban and Forest Ecosystems:** (In support of sustainable development) 28 and 29 April . . <http://virtuelcampus.univ-msila.dz>.

HAMMADI Hamida, HAMMOUDA Dounia. (2021). Genetic variation in algerian lentil (*lens culinaris* medik.) genotypes by morpho-agronomic traits. Le **1 Séminaire international sur les innovations technologiques au service de l'agriculture durable (SIITA ,2021).** Le 18-19/octobre/2021.

Projet PRFU/ Intitulé/ Organisation et valorisation des ressources phylogénétiques: Cas de quelques espèces d'intérêt agro-économique et thérapeutiques : **(Membre de projet).**

DOI:10.1UN250120180016



Introduction

Introduction

La famille des Légumineuses est l'une des plus importantes familles parmi les eudicotylédones. Cette famille fournit le plus grand nombre d'espèces utiles à l'homme, qu'elles soient alimentaires, industrielles ou médicinales.

Les légumineuses alimentaires représentent de par la superficie qu'elles occupent, une place importante dans le système agraire et l'agroéconomie de nombreux pays du monde (Bacha et Ouane, 2003). A côté de leur importance économique, agronomique et écologique, les légumineuses (fabacées), constituent un enjeu à caractère stratégique pour plusieurs pays.

La richesse des légumineuses en protéines permet de corriger dans une certaine mesure les carences en protéines animales, ainsi que le déséquilibre alimentaire des populations qui ont tendance à se nourrir exclusivement de céréales. Selon Obaton (1980) un hectare de légumineuses alimentaires produit un tonne de protéines, soit 10 fois plus qu'une production d'un élevage à viande sur la même surface.

En Algérie, les légumineuses alimentaires ou "légumes secs" couvrent à heure actuelle (campagne 2014-2015) une superficie de 79 600 hectares, donnant une production de 832 000 quintaux pour des besoins estimés à 2,8 millions de quintaux, soit un taux de couverture de 30%. Le reste des besoins, soit 1,9 millions de quintaux est importé pour une valeur de 234 millions de dollars. A travers le programme sectoriel de leur développement pour la période (2016/2021), il s'agit de remédier à cet état, en visant un accroissement de la superficie occupée par les légumineuses alimentaires, qui passerait de 85 000 à 210 000 hectares et une production toutes espèces confondues qui devrait couvrir 100% des besoins (FAO., 2016).

Actuellement, l'Algérie se retrouve dans un état critique face à la flambée des prix des légumes et la diminution de ces deniers dans le marché algérien, et donc face à ces problèmes Il est important de diversifier et enrichir le marché par des différentes légumes, ceci parmi les solutions idéales et ainsi dans le but d'intégrer la culture des lentilles.

La culture de la lentille est favorisée par le Ministère Algérien de l'Agriculture depuis les années 2007-2008 (FAO, 2006). , elle est classée en 3^{ème} culture légumineuse après le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), et le petit pois (*Pisum sativum* L.) (FAO, 2015).

Cette espèce est subdivisée en deux sous espèces selon la taille de la graine : (i) Sous espèce *Macrosperma* est prédominante, principalement en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique, (ii) Sous espèce *Microsperma* domine en Asie, en Egypte, et en Ethiopie (Brink et Belay, 2006).

La lentille (*Lens culinaris*) tient une part très importante des travaux accomplis dans divers domaines tel que : l'agronomie, la physiologie, l'entomologie, la phytopathologie, et la moléculaire (Kumar *et al.* 2001; Galasso *et al.* 2001 ; Gaffarzadch *et al.* ,2007 ; Hamwieh *et al.*, 2009 ,Tuba et Sakar,2010 ; Idrissi *et al.*,2012 ; Zaccardelli *et al.*, 2012 ; Alghamdi *et al.*, 2014; Erdogan ,2015 ; Hammouda et Khalfallah,2015; Khazaei *et al.*, 2016; Hammadi *et al.*,2018 ; Gaad *et al.*,2018). Mais peu de travaux cytogénétiques sont réalisés chez cette espèce.

Les ressources phyto-génétiques constituent un matériel pour répondre aux besoins nutritionnels et médicaux de l'humanité. La connaissance de la diversité génétique et des relations entre les génotypes est importante pour comprendre la variabilité génétique disponible et son utilisation potentielle dans le programme de sélection (Zaccardelli *et al.*, 2012 , Khazaei *et al.*, 2016) . Différentes techniques sont utilisées pour étudier cette diversité génétique, telle que, les marqueurs morphologiques, cytogénétiques, biochimiques et moléculaires. Tous ces marqueurs permettent la mesure de la variabilité génétique des plantes.

Dans le cadre d'un projet de recherche portant sur les ressources génétiques de la lentille cultivée, mené au labo(02) de faculté des sciences de l'université Constantine 1, laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies végétales d'une part et le centre de biotechnologie (CRBt) d'autre part, nous nous sommes intéressés à l'étude de la variabilité génétique de 12 cultivars appartenant à l'espèce *Lens culinaris* Médik ($2n=2x=14$), par des approches morphologiques, cytogénétiques, biochimiques et moléculaires.

Il s'agit d'abord l'étude :

- des caractères quantitatifs par traitement des paramètres agro-morphologiques.
- du caryotype par la détermination et la caractérisation de ces chromosomes.
- de l'organisation de l'hétérochromatine constitutive par l'appréciation de son taux dans le génome, et la localisation des organisateurs nucléolaires (N.O.R).
- du comportement méiotique et l'analyse palynologique et la relation entre les deux.
- analyse des polymorphismes biochimique et moléculaire.

Une réflexion sur les impacts de cette étude dans le domaine agronomique sera étudiée

Outre l'introduction et la conclusion, ce travail sera présenté en trois chapitres :

- Chapitre I : consacré à une synthèse bibliographique des connaissances actuelles.
- Chapitre II : le matériel végétal et les techniques d'analyses appliquées telles , l'analyse agro morphologique , la coloration classique, le marquage en C-banding et N-banding, ,le comportement méiotique et l'analyse palynologique , et les techniques de SDS-PAGE et SSR.
- Chapitre III: Résultats et Discussion : On y exposera les différents résultats obtenus, interprétations et comparaisons à d'autres travaux.

Ce manuscrit se termine par une discussion générale, et les perspectives dégagées de ces travaux.



Chapitre I

Revue Bibliographique

1. Revue bibliographique

1.1. Historique et origine de lentille

La lentille (*Lens culinaris* Medik.) est une légumineuse de l'ancien monde et a probablement été l'une des premières espèces végétales à être domestiquée avec le blé et l'orge (Chahota *et al.*, 2007 ; Abraham, 2015). Les vestiges archéologiques les plus anciens proviennent de grottes de Grèce, datées de 11 000 av. J C., et de Syrie, datées de 8 500 à 7 500 av.JC.

Des études archéologiques ont montré que les lentilles ont été domestiquées dans le Croissant fertile du Proche-Orient, qui coïncide avec l'actuelle région Turquie-Syrie-Irak (Zohary, 1972). Au 6ème millénaire avant JC, avec la révolution néolithique, cette culture était courante dans la vallée du Nil, tout le bassin méditerranéen, et s'étendait à l'Europe centrale et au sous-continent indien (Cubero, 1984). À partir de l'âge du bronze, les lentilles étaient cultivées partout où le blé et l'orge étaient cultivés dans le domaine en expansion de l'agriculture de type méditerranéen (Henelt, 2001). Les lentilles ont probablement atteint leur répartition actuelle dans l'Ancien Monde il y a environ 3000 ans (Harlan, 1992). En raison de son ancienne domestication, une grande diversité au sein de l'espèce *Lens culinaris* s'est exprimée au cours des millénaires dans une myriade de races locales différentes (Erskine and Sarker, 2004; Erskine *et al.*, 2009). De nombreux types locaux de lentilles ont survécu car ils se caractérisent par une grande adaptabilité au microclimat de sites spécifiques (Piergiovanni, 2000). La lentille est aujourd'hui cultivées partout dans le monde : sous continent indien, Moyen-Orient, Afrique du Nord l'Europe du sud, le Nord et le Sud d'Amérique et en Australie (Chahota *et al.* , 2007, Kumar *et al.*,2015).

L'ancêtre du *L. culinaris* est le *L. orientalis* (Ladizinsky *et al.*, 1984), la lentille a acquis son nom scientifique (*Lens culinaris*) en 1787 par le botaniste Allemand Medikus (Brink et Belay, 2006).

1.2. Classifications génétique et botanique

La lentille (*Lens culinaris*.) est une espèce diploïde ($2n=14$) avec une taille de génome haploïde de 4063 Mb (Khazaei *et al.*, 2016). Sous famille des papilionacées, tribu des Viciées, groupe d'*Euvicia* et au genre *Lens*.

La taxonomie du *Lens* est comme suite (Cokkizgin et Shtaya, 2013) :

Règne : Plantae

Sous règne : Tracheobionta

Super division : Spermophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous classe : Rosidae

Ordre : Fabales

Famille : *Fabaceae*

Genre : *Lens*

La plupart des génotypes de l'espèce sauvage *Lens orientalis* ($2n=2x=14$) s'hybrident librement avec le *Lens culinaris* Medik ($2n=2x=14$), (Mehra *et al.* 1986 ; Jh *et al.* 2015) et ces deux espèces sont isolées des autres sur le plan génétique. Le *Lens culinaris* Medik peut aussi s'hybrider avec les autres espèces du genre *Lens*, mais ces croisements se caractérisent par une fréquence élevée d'embryons avortés, d'embryons albinos, de plantules albinos et de réarrangements chromosomiques entraînant la stérilité des semis hybrides atteignant la maturité (Muehlbauer *et al.* 2011).

Lors d'une révision récente du genre *Lens*, des espèces ont été reconnues sur la base de caractères morphologiques de la capacité à s'hybrider, et de données cytogénétiques, biochimiques et moléculaires (Cokkizgin et Shtaya, 2013) :

- *Lens culinaris* Medikus.
- *L. orientalis* (Boiss.) Hand.-Maz., ancêtre du *L. culinaris*.
- *L. nigricans* (M. Bieb.) Grand.
- *L. ervoides* (Bring.) Grand.
- *L. odemensis* Ladiz.
- *L. lamottei* Czefranova.
- *L. tomentosus* Ladiz.

Wang *et al.* (2015) ont utilisé le génotypage par séquençage pour placer *L. culinaris*, *L. tomentosus* et *L. orientalis* dans le pool génétique primaire, *L. lamottei* et *L. odemensis* dans le pool génétique secondaire, et *L. ervoides* et *L. nigricans*, respectivement, dans les pools de gènes tertiaires et quaternaires. La lentille cultivée est classée en deux groupes (Figure 1).

Macrosperma : fleurs grandes, blanches, rarement bleues, gousses grandes, généralement plates, graines grosses, aplaties, cotylédons généralement jaunes, parfois

orange. Prédominant principalement en Afrique du Nord, en Europe et en Amérique, (diamètre > 6mm).

Microsperma : fleurs petites, bleu-violet à blanches ou roses, gousses petites, convexes, graines petites, convexes, cotylédons rouges, orange ou jaunes ; le Groupe domine en Asie, en Egypte et en Ethiopie (diamètre < 6mm) (Brink et Belay, 2006).

1.3. Noms communs

La lentille est connue sous différents noms dans différentes parties du monde. Les noms les plus courants sont lentil (anglais), adas (arabe), mercimek (Turquie), messer (Éthiopie), masser ou massur (Inde), heramame (japonais). D'autres noms mentionnés dans la littérature sont mangu ou margu (persan), masura, renuka, mangalaya (sanskrit) (Muehlbauer *et al.* 2011).

1.4. Description générale sur la plante

Il s'agit d'une plante annuelle autogame, dont la hauteur de la plante est comprise entre 15 à 75cm, généralement varie selon les génotypes et les conditions de culture, (Erskine *et al.*, 2009 ; Bacchi *et al.*, 2010). Ses feuilles, alternes, composées pennées, comptent de 10 à 14 folioles opposées, oblongues, et sont terminées par une vrille généralement simple ou bifide. À la base elles sont munies de stipules dentées. Les fleurs, à corolle papilionacée typique de la sous-famille des Faboideae, sont de couleur blanche ou bleu pâle et groupées par petites grappes de deux à quatre. Le calice est régulier, à cinq dents étroites et relativement longues. La floraison estivale intervient entre mai et juillet.

Les fruits sont des gousses aplaties, courtes, contenant deux graines aplaties en forme caractéristique de disque faiblement bombé. Selon leur variété et leur race, cependant, les graines de lentilles peuvent varier en couleur du rouge-orange au jaune, vert, brun ou noir (Toklu *et al.*, 2009). Les cotylédons peuvent être rouges, orange, jaunes ou verts, blanchissant au jaune (Yadav *et al.*, 2007). Lorsque les températures sont optimales, les graines de lentilles germent en 5 à 6 jours et la floraison débute entre la 6^{ème} et la 7^{ème} semaine après le semis, le cycle de croissance est de 80 à 110 jours pour les cultivars à cycle court et de 125 à 130 jours pour les cultivars à cycle long (Begiga, 2006).

Les gousses, aplaties sont isolées ou disposée en paire et apparaissent à l'aisselle du 11, 12, ou 13 nœud et des nœuds suivant. Chaque gousse possède un court pédicelle et renferme une ou deux petite graine en forme de loupe (Bacchi *et al.*, 2010) (Figure 1).

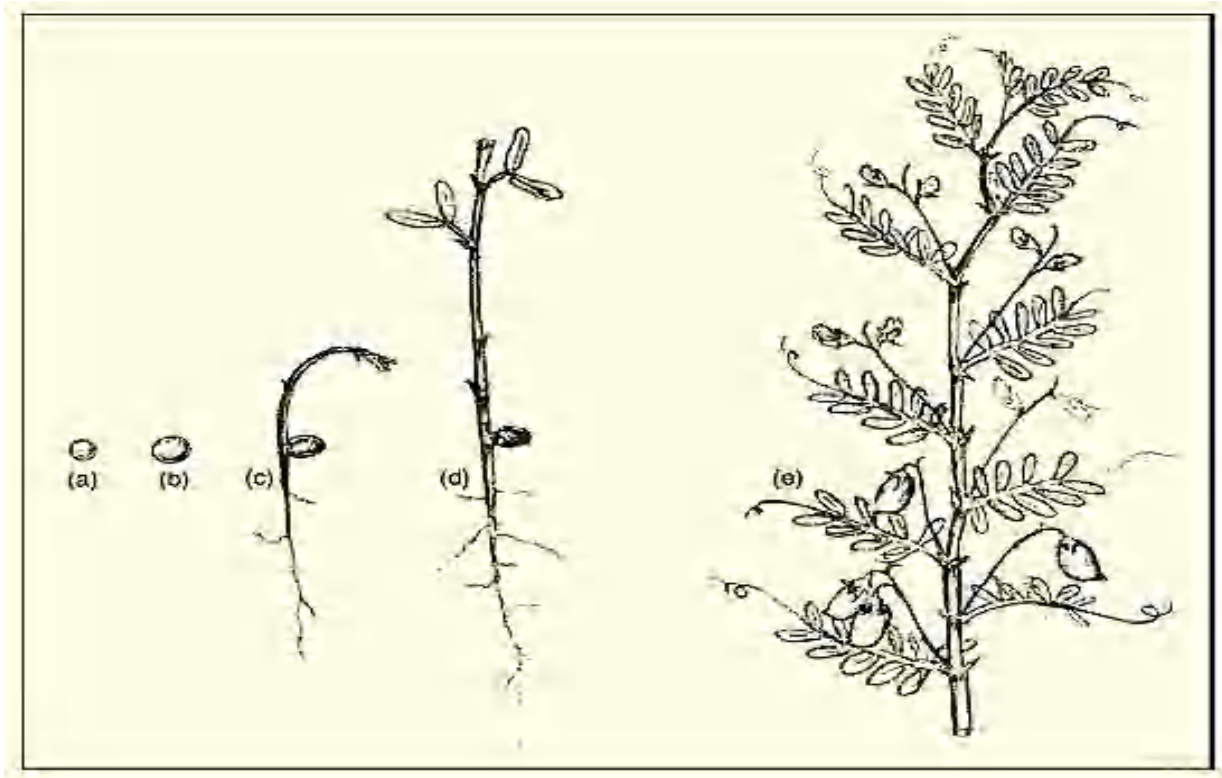


Figure 1 : Structure de la plante de lentille : (a) graine sèche ; (b) graines imbibées d'humidité; (c) un semis nouvellement émergé montrant une germination hypogée; (d) une jeune plantule présentant deux feuilles bifoliées ; (e) branche avec des feuilles, des fleurs et des gousses de lentille microsperma (image originale dans Saxena, 2009).

Les lentilles sont classées selon la couleur du cotylédon et de la couleur des graines en :

- Lentilles rouges et vertes sont cultivées et consommées principalement, Environ 75% de la production mondiale est constituée de lentilles rouges.

- Les lentilles vertes ont des cotylédons jaunes et des graines vert pâle.

- Les lentilles rouges ont un cotylédon orange et une couche de graine foncée (Cubero *et al.*, 2009).

1.5. Valeur nutritive et utilisation

1.5.1. Valeur nutritive

La lentille sont faibles en gras et en sodium, riches en protéines et sont une excellente source de fibres solubles et insolubles, de glucides complexes, de vitamines et de minéraux, en particulier les vitamines B, potassium et phosphore (Yadav *et al.*, 2007). Avec environ 25% de protéines, les lentilles sont le légume avec le plus haut niveau de protéines après le soya (Thavarajah *et al.*, 2011) et elles sont également une très bonne

source de fibres abaissant le cholestérol (Ruisi *et al.*,2015). 100 g de graines séchées contiennent 340-346 g de calories, 12% d'humidité, 20,2 g de protéines, 0,6 g de matières grasses, 65,0 g de glucides totaux, 4 g de fibres, 68 mg de Ca, 325 mg de P, 7,0 mg de Fe, 29 mg de Na , 780 mg de K, 0,46 mg Thiamine, 0,33 mg de riboflavine et 1,3 mg de niacine(Erskine *et al.*,2009).

1.5.2. Utilisation de la lentille cultivée

La consommation de lentilles offre des avantages à la fois nutritionnels et sanitaires aux consommateurs. Les avantages pour la santé comprennent la réduction des maladies coronariennes, la prévention des carences en fer et en zinc et la stabilisation de la glycémie (Erskine *et al.*, 1990).

Les lentilles sont consommées principalement sous forme de graines (après cuisson) pour la consommation humaine .Ils peuvent être utilisés comme accompagnement (purée, entière et combinée avec des légumes), dans les salades, les soupes et les ragoûts. L'une des vitrines les plus remarquables de la lentille est le dhal indien (Erskine *et al.*, 1990) .

Les lentilles sont préparées selon plusieurs méthodes, notamment les méthodes de trempage, d'ébullition, de germination/germination, de fermentation, de friture et de chaleur sèche. D'autres façons d'en tirer profit sont les lentilles transformées, les collations à base de lentilles et les utilisations médicinales (Raghuvanshi & Singh 2009). La paille de lentille est également un aliment pour animaux apprécié en raison de sa faible teneur en cellulose (Erskine *et al.*, 1990). D'autre part, les parties végétatives de la lentille peuvent être utilisées comme engrais vert (Kara, 2008).

1.6. Production et répartition géographique

1.6.1. Répartition mondiale de lentille

La production mondiale de lentilles en 2016 était de 6,3 Mt sur une superficie cultivée estimée à 4,52 millions d'hectares (FAOSTAT, 2016) et le Canada, l'Inde, la Turquie et l'Australie sont les principaux producteurs de lentilles au monde. Le Canada est le plus grand exportateur et producteur de lentilles. La province de la Saskatchewan a produit à elle seule plus de 3,2 Mt de lentilles en 2016 (Statistique Canada, 2016). La superficie en lentilles est passée de moins de 600 ha en 1970 (McVicar *et al.*, 2010) à 2,18 millions d'ha au Canada en 2016 (Statistique Canada, 2016). Le Canada a exporté des lentilles vers plus de 100 pays pour une valeur d'environ 2,5 milliards de dollars canadiens (Saskatchewan Agriculture Exports, 2016). La lentille cotylédon rouge est la

principale classe de production et de commercialisation de lentilles dans le monde (Pulse Canada, 2016) (Figure 2).

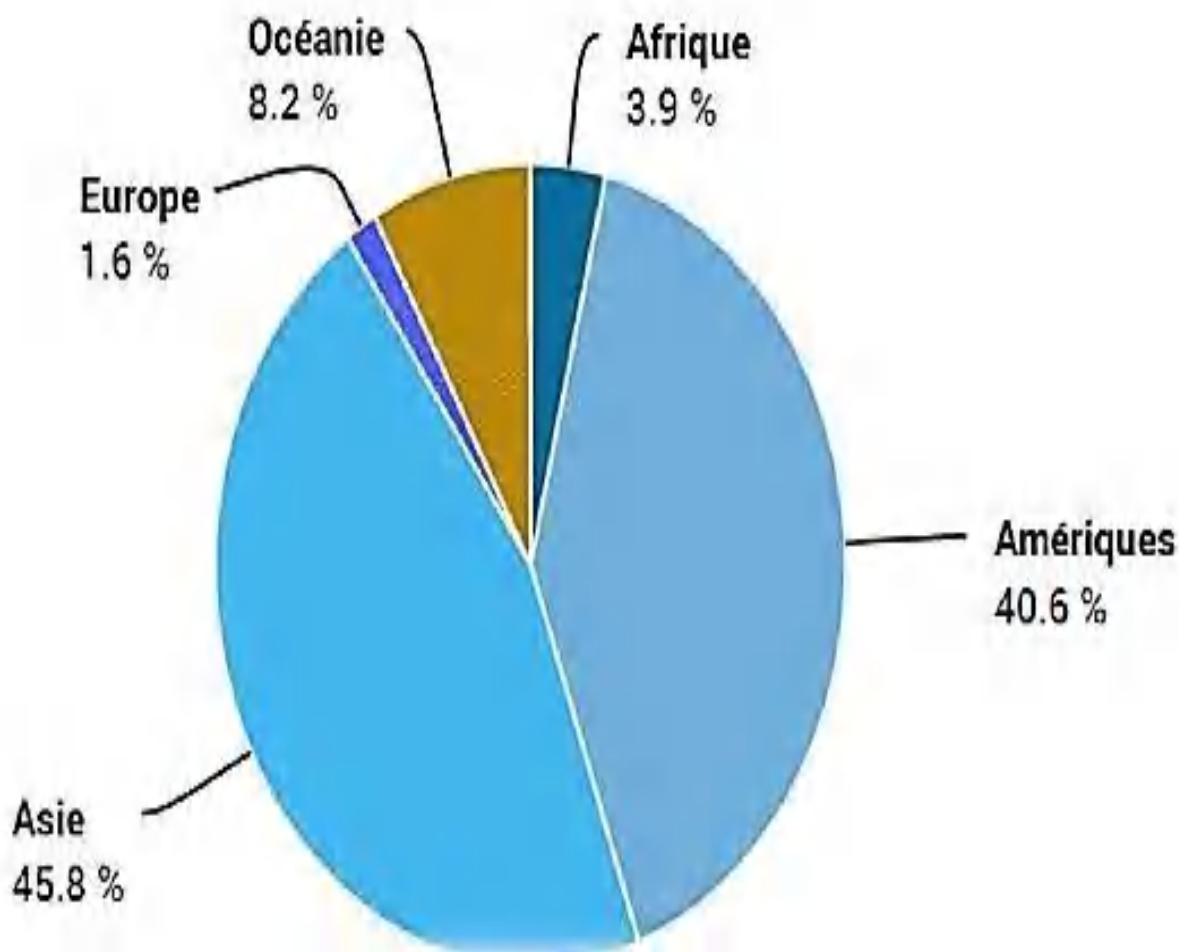


Figure 2 : Production mondiale moyenne de la lentille par continent pendant les années 2012 et 2013 (FAOSTAT, 2016).

1.6.2. Production et répartition en Algérie

En Algérie la lentille a été cultivée avant 1830 dans les jardins des fellahs (surtout en Kabylie), jusqu'à 1940 une étude a révélé que les lentilles rencontrées en Afrique du nord appartiennent à deux sous espèces : la lentille petite verte du puy (*Lens exulenta* Moench sp :micropermavra et *Dupuyensisbarul*) a été la première des variétés européenne introduites en grandes cultures en Algérie dans certaines régions de culture de lentille large blonde et verte de puy ont coexisté et des croisements naturels se sont produits qui ont donné naissance à la « lentille large verte d'Algérie » à partir de cette

dernière, il y a une sélection et une amélioration de la « lentille verte d'Algérie » (Vandenberg et Slinkard, 1990). En Algérie, la culture des lentilles n'occupe que 1.5% de la totalité des terres réservées aux légumineuses alimentaires (Ait Abdellah *et al.*, 2011) ; elle s'étale sur de grandes surfaces dans les hautes plaines (Tiaret, Saida, Sétif) et les plaines intérieures (Bouira, Médéa, Mila)(Figure 3).Ainsi dans la région de Constantine, les productions de lentilles ont progressivement évoluées entre 2006 et 2013 ou l'on a pu noter des collectes brutes maximales (15523,04 Qx). La figure 4 décrit l'évolution des superficies cultivées et la production de la lentille depuis l'indépendance jusqu'au 2016.

Plusieurs variétés sont cultivées parmi lesquelles on cite :

✓ Le large blond Métropole : elle est isolée en 1942 en France, elle est de couleur verdâtre et de bonne qualité culinaire.

✓ Le large blonde de Chili : elle est isolée en 1952 au Chili, les graines sont larges de couleur verdâtre et de bonne qualité culinaire.

Le large verte d'Algérie : elle est isolée en 1950 à Tiaret, de bonne qualité culinaire : a été cultivée avant 1830 dans les jardins des fellahs (surtout en Kabylie), jusqu'à 1940 une étude a révélé que les lentilles rencontrées en Afrique du nord appartiennent à deux sous espèces: la lentille petite verte de puy (*Lens erosperma* vra. Dupuyensis Barul) a été la première des variétés européenne introduites en grande culture en Algérie. Dans certaines régions des cultures de petite lentille large blonde et verte de puy ont coexisté et des croisements naturels se sont produits qui ont donnée naissance à la «lentille large vert d'Algérie », à partir de cette dernière, il y a eu une sélection et une amélioration de la lentille verte d'Algérie» (Vandenberg et Slinkard, 1990).

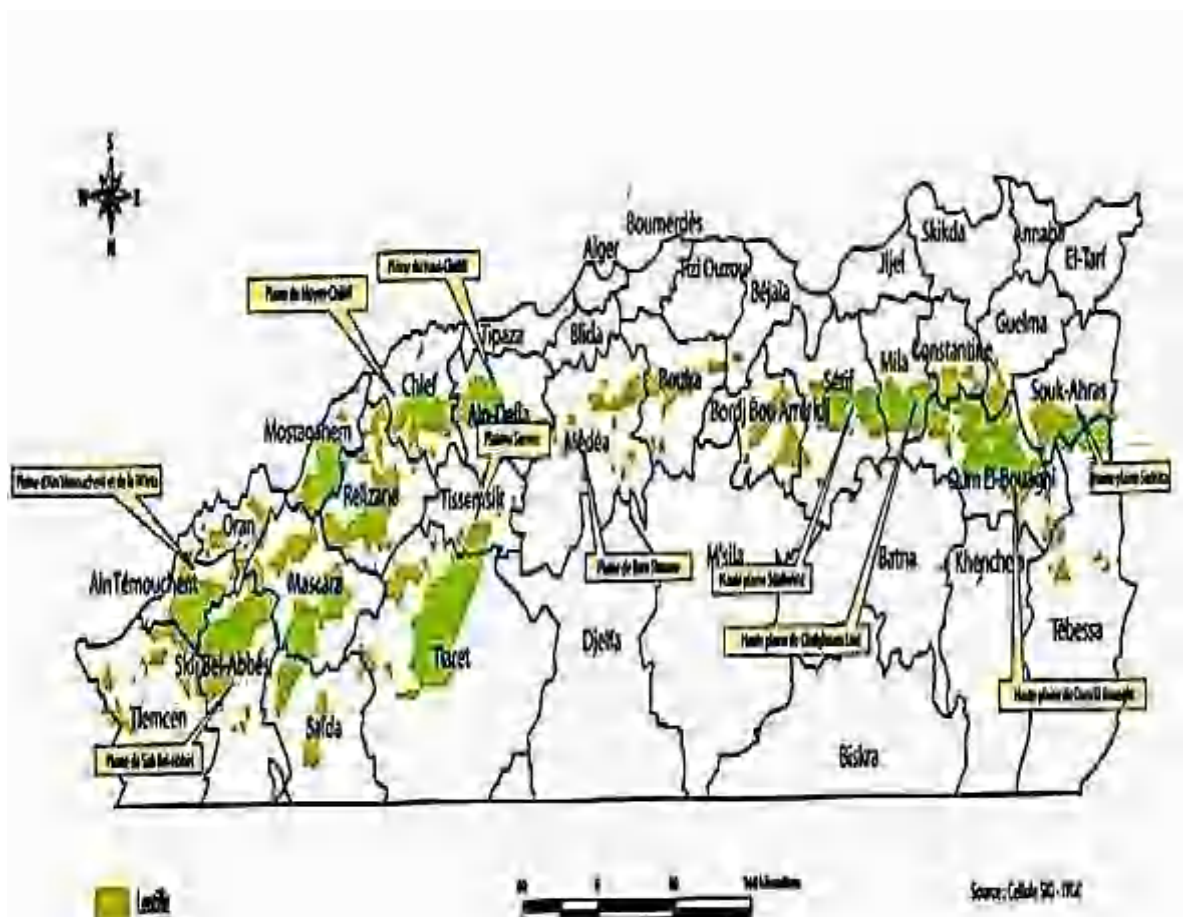


Figure 3 : Zones d’aptitude de la culture de la lentille en Algérie (ITGC, 2013).

- ✓ La Syrie 229 : c’est une sélection locale sur population introduite de Syrie, les graines de cette variété sont arrondies de couleur vert-jaune, elle est de très bonne qualité culinaire.
- ✓ La Balkan 755 : elle est une sélection locale sur population introduite dans la région de Sersou, ses graines sont larges de couleur marron, elle est aussi de bonne qualité culinaire (ITGC, 2013).

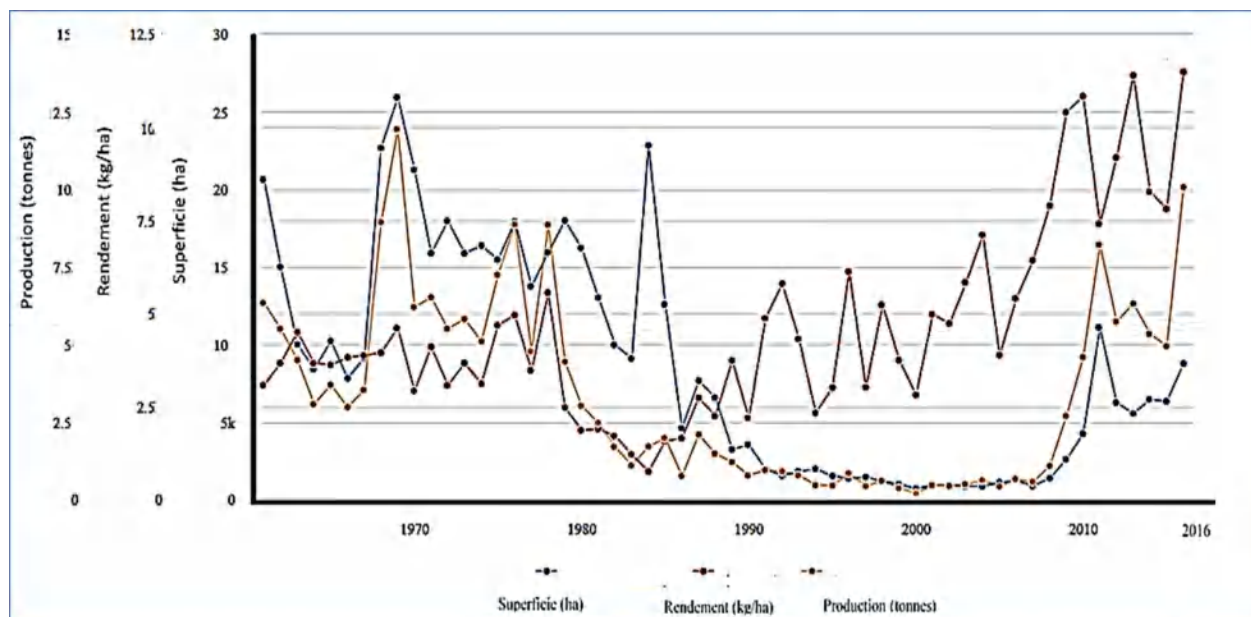


Figure 4: Evolution annuelle des superficies (million ha), productions (million tonnes) et rendement (Kg/ha) de la lentille en Algérie entre 1961 et 2016 (FAOSTAT, 2017) in Gaad, (2018).

1.7. Techniques de culture

Il est généralement admis que les stress abiotiques sont considérés comme la principale cause de la chute du rendement agricole.

Les pertes potentielles de rendement sont estimées à 17% dues à la sécheresse, 20% à la salinité, 40% à la température élevée, 15% à la basse température et 8% à d'autres facteurs (Rehman *et al.*, 2009).

1.7.1. Exigences relatives au climat et au sol

La lentille est l'une des légumineuses les moins sélectives en termes de climat et de caractéristiques du sol. Il peut être cultivé jusqu'à 3000 mètres d'altitude. D'autre part, le rendement en graines par surface diminue lorsque l'altitude augmente (Whyte *et al.*, 1953). La lentille est une plante bien adaptée qui pousse dans un large éventail de types de sols. Cependant, les sols à texture lourde entraînent une réduction du rendement, alors que les sols limono-sableux sont les plus adaptés à la croissance des lentilles (Ozdemir, 2002).

1.7.2. Temps de semis

La lentille est une culture d'hiver généralement cultivée à l'automne et récoltée en été et certaines variétés peuvent également être semées au printemps. Cependant, un semis tardif diminuera le rendement et augmentera la teneur en protéines (Sehirali, 1988). Les

températures de congélation inférieures à -25 °C endommagent les plantes (Ozdemir, 2002) de sorte que la lentille ne doit pas être cultivée à des températures très basses.

1.7.3. Exigences en matière de fertilisation et d'engrais

Les agriculteurs n'utilisent généralement pas d'engrais azotés pour la production de lentilles. Cela est dû à la capacité de la lentille à fixer l'azote atmosphérique. Il est rapporté que la lentille peut fixer 46 à 192 kg N par ha (Shah *et al.* 2003). Cependant, afin de favoriser l'activité bactérienne, l'application de 1 kg/j d'azote et de 2,5 kg/j de phosphore est recommandée pendant la saison de croissance, et l'application d'engrais doit être transmise à l'analyse du sol (Cokkizgin *et al.*, 2005) .

1.7.4. Gestion des lentilles

Le désherbage est la procédure de gestion la plus importante. Dans de nombreux pays, des herbicides sont utilisés.

1.7.5. Récolte

Bien que la lentille soit une plante de jours longs, des types neutres sont également disponibles (Hawtin *et al.* 1980). Pour cette raison, la récolte peut être effectuée à la fin du printemps et au début de l'été. Dans de nombreux pays, les lentilles sont récoltées manuellement, mais la récolte mécanique est également possible et pour cette raison, des variétés à croissance verticale sont disponibles.

1.7.6. Maladies et ravageurs

Plusieurs maladies affectent la lentille entraînant des pertes de rendement. Les maladies fongiques courantes de la lentille sont la fusariose causée par *Fusarium oxysporum f. sp. Lentis*, rouille causée par *Uromyces fabae* et ascochytose causée par *Ascochyta lentis*. Les maladies bactériennes causées par *Mycobacterium insidiosum* affectent également les lentilles. La lentille est également affectée par des plantes à fleurs parasites comme *Cuscuta sp.* et *Orobanche sp.* Plusieurs maladies virales affectent la lentille, notamment le virus de la mosaïque du pois, le virus de la mosaïque jaune du haricot et le virus de la mosaïque transmise par les graines de pois (PSbMV). Parmi eux, le PSbMV est potentiellement dangereux pour la lentille (Muehlbauer *et al.*, 1995). Les nématodes affectent également la lentille . Les ravageurs les plus importants qui affectent les lentilles et causent des pertes économiques sont la chenille gram (*Heliothis obsoleta*), les fourmis blanches (*Cloterme sp.*), le ver-gris gram (*Ochropleura flammata*), le charançon (*Callosobruchus analis*) et le coléoptère du haricot (*Bruchus ervi ve Bruchus lentis*) (I.T.G.C., 2013).

1.7.8. Pratiques culturelles

Le rendement le plus élevé peut être obtenu avec un taux de semis de 300 graines par m², mais cette valeur peut varier en fonction du climat et des conditions du sol (Togay *et al.*, 2008). La rotation des cultures et l'utilisation de semences hybrides ou améliorées auront un effet positif sur le rendement des lentilles. Une irrigation excessive a un effet négatif sur les lentilles en provoquant la verse. Cependant, pendant les printemps secs, une irrigation supplémentaire doit être effectuée afin d'éviter les pertes de rendement.

1.7.9. Rendement des semences

Plusieurs facteurs affectent le rendement en graines de lentilles, notamment le climat local, les conditions du sol et les caractéristiques génétiques. Il est rapporté que le rendement en graines de lentilles variait de 1057 à 2880 kg ha⁻¹ (Bicer & Sakar, 2010).

1.8. Caractéristiques cytogénétiques

La cytogénétique a joué un rôle essentiel dans les études du chromosome la structure, le comportement et l'évolution de nombreuses espèces végétales.

1.8.1. Mitose somatique

Le passage d'une génération d'êtres vivants à une autre génération est assuré par une série de phénomènes biologiques assez simples. Quel que soit l'espèce, Cette multiplication des individus nécessite une multiplication des cellules. Les cellules peuvent subir soit la mitose soit la méiose, deux modes de division cellulaire qui ont des bases communes mais aussi des particularités et même des oppositions (Hallouet et Borry, 2009). La mitose est un processus critique pour tous les organismes eucaryotes (organismes avec un noyau cellulaire) et fournit une base pour la reproduction asexuée.

- Le matériel génétique est partagé entre les cellules filles durant la division nucléaire (caryocinèse), le résultat est la production de deux noyaux fils contenant chacun une composition chromosomique identique à celle de la cellule mère.
- Elle se produit normalement dans presque toutes les cellules somatiques.
- La division est faite par un cycle cellulaire.
- Tous les produits portent la même information génétique.
- Les produits mitotiques sont en général capables de subir de nouvelles mitoses.

1.8.2. Définitions

1.8.2.1 Génome

Le génome est la combinaison des mots « gène et chromosome ». C'est l'ensemble de l'information génétique d'un organisme contenu dans chacune de ses cellules sous la forme de chromosomes. (Camatchou,2005). Le support matériel du génome est l'ADN. Autrement, dit c'est le nombre de base ($x=n$) haploïde des chromosomes. Le génome de la lentille est constitué de 14 chromosomes (7 paires).

1.8.2.2. Chromosome

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

Les chromosomes se classifient en quatre types suivant leur forme qui est déterminée par la position du centromère (Figure 5) (Khalfallah, 1990).

-Chromosome métacentrique (m) : le centromère est position médiane, et la valeur du rapport BL/BC est comprise entre 1 et 1.7. On parle de métacentriques sensu stricto (M) lorsque le rapport est exactement égal à 1 et dont le centromère se trouve alors au point médiane.

-Chromosome submétacentrique (sm) : le centromère est situé dans la région submédiane et la valeur du rapport BL/BC va de 1.7 à 3.0.

-Chromosome subtélocentrique (st) : le centromère est situé dans la région subterminal et le rapport BL/BC varie de 3,0 à 7,0.

-Chromosome acrocentrique (t) : le centromère est dans la région terminale et les valeurs du rapport BL/BC vont de 7,0 à l'infini. Si le centromère se trouve au Point terminal strict, on parle de chromosome télocentrique (T).

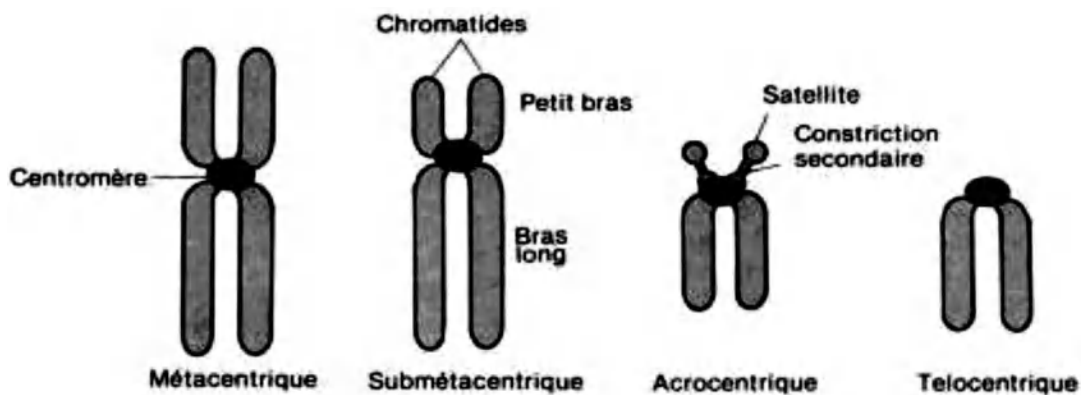


Figure 5 : Présentation schématique des différents types de chromosome.

1.8.2.3. Caryotype

C'est la représentation obtenue par microphotographie de l'aspect morphologique de l'ensemble des chromosomes du noyau en métaphase, après ordonnancement par paires selon la taille (Malan et Romana, 2012). Il est constitué d'un caryogramme et d'un idiogramme. Le caryotype est spécifique d'une espèce donnée, et il existe sous deux types : symétrique et asymétrique. On réalise des caryotypes dans le but de détecter des aberrations chromosomiques ou d'identifier certains aspects du génome de l'individu.

1.8.2.4. Réalisation du caryotype

Le cycle cellulaire est stoppé durant la métaphase de la mitose, alors que les chromosomes sont condensés. Après traitement chimique et coloration, les chromosomes sont regroupés par paires puis ordonnés des plus grands aux plus petits avant d'être photographiés sous microscopie (Malan S et Romana I., 2012).

1.8.5. Structure du chromosome

1.8.5.1. Chromatine

C'est la substance chimique constitutive des chromosomes. Dans les cellules eucaryotes, le matériel génétique est organisé en une structure complexe constituée d'ADN et de protéines et il est localisé dans le noyau. Cette structure est appelée chromatine. C'est donc la chromatine qui porte le message héréditaire (Atlas., 2006). Elle est organisée en régions plus ou moins condensées, appelées territoires chromatinien qui interviennent dans l'expression des gènes et la stabilité des chromosomes. Deux types structuraux et fonctionnels de la chromatine sont définis (Figure 6).

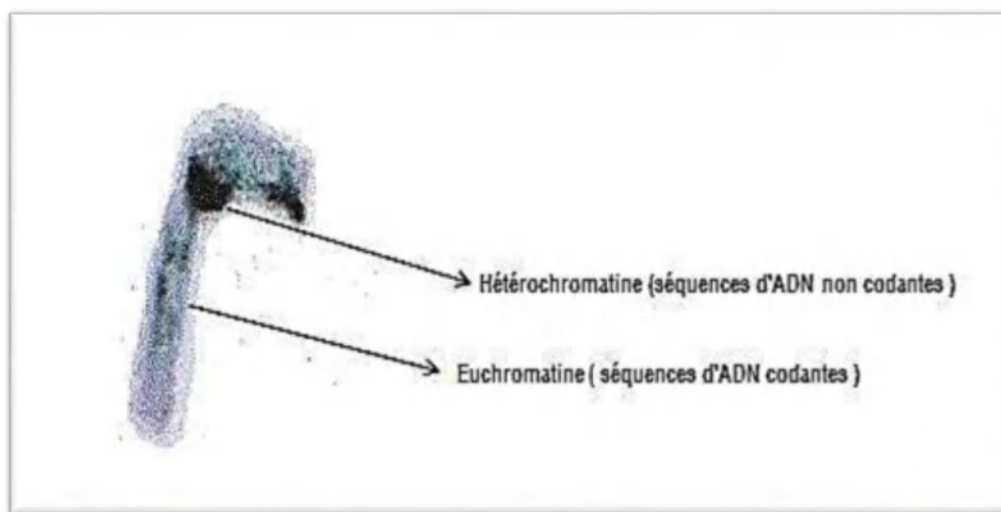


Figure 6 : structure d'un chromosome.

1.8.5.1.1. Euchromatine

Elle est riche en gènes et répartie à l'intérieur du nucléoplasme, correspond à l'état de la chromatine décondensée pendant l'interphase, elle est aussi permissive à la transcription de la séquence d'ADN en ARN fonctionnel. L'euchromatine se compacte lors des divisions cellulaires, coïncidant avec l'arrêt de la synthèse des (ARNm) pendant la mitose (Hammouda,2013).

1.8.5.1.2. Hétérochromatine

C'est la chromatine qui reste à l'état condensé tout au long du cycle Cellulaire et qui est localisée principalement en périphérie du noyau et du nucléole. D'autres études montrent que l'hétérochromatine possède un fort taux de méthylation de la lysine 9 et de l'histone H3 chez les plantes (Samouelian *et al.* 2009).

- **L'hétérochromatine constitutive**

Contient peu de gènes, formés principalement de séquences répétées et dont les plus grandes régions sont situées à proximité des centromères et des télomères (Grewal S et Elgin S., 2007). Cette hétérochromatine constitutive est très riche en séquences hautement et moyennement répétées du génome (Grewal S et Elgin S., 2007). Elle contient aussi un ADN tout à fait particulier, appelé ADN satellite (Hammouda, 1999). L'HC constitutive est fortement colorée par la technique des (bandes C), ce qui pourrait résulter de la renaturation très rapide de l'ADN satellite après dénaturation (Atlas., 2006).

- **L'hétérochromatine facultative**

Se localise au niveau des régions codantes pouvant adopter les caractéristiques structurales et fonctionnelles de l'hétérochromatine (Grewal S et Elgin S., 2007). L'HC facultative, n'étant pas particulièrement enrichie en ADN satellite, ne présente pas de polymorphisme (Atlas., 2006).

1.8.6. Rôles attribués à l'hétérochromatine

L'hétérochromatine est réfractaire à la transcription, à la recombinaison et à la réparation (Grewal S et Elgin S., 2007), en outre, l'hétérochromatine participe à la réplication et la ségrégation des chromosomes. Elle permet le maintien de la structure du chromosome et protège les télomères contre leur dégradation (Garcia B *et al*, 2004). L'hétérochromatine joue un rôle tout à fait essentiel dans l'adaptation et l'évolution des espèces végétales ainsi que dans l'organisation et la fonction du génome et le déroulement de la méiose (attraction des homologues, régulation du Crossing-over, formation des chiasmas) (Siljak Y *et* Cartier D., 1986).

La présence d'épaisses bandes hétérochromatiques dans les régions télomériques chez le seigle qui peuvent être impliquées dans des translocations observées chez les hybrides «blé-seigle». Ces translocations (blé-seigle) sont importantes dans la sélection végétale (Hammouda D., 2013, 2017).

1.8.7. Différents types d'ADN

L'ADN, constitué de millions de nucléotides dont l'enchaînement précis détermine l'information génétique de chaque organisme, cette information est localisée dans les

chromosomes de chaque noyau cellulaire. C'est uniquement au cours de la division cellulaire qu'il est possible d'observer au microscope des chromosomes individualisés dont le nombre, la taille et la forme sont constants et caractéristiques pour toutes les cellules somatiques d'une espèce donnée et qui se regroupent en paires de chromosomes homologues.

L'ADN génomique est principalement composé d'ADN codant et d'ADN non codant. Les séquences de codage sont connues sous le nom de gènes. Des milliers de gènes sont situés sur les chromosomes (Shapiro J.A *et al.*, 2005)(Figure7).

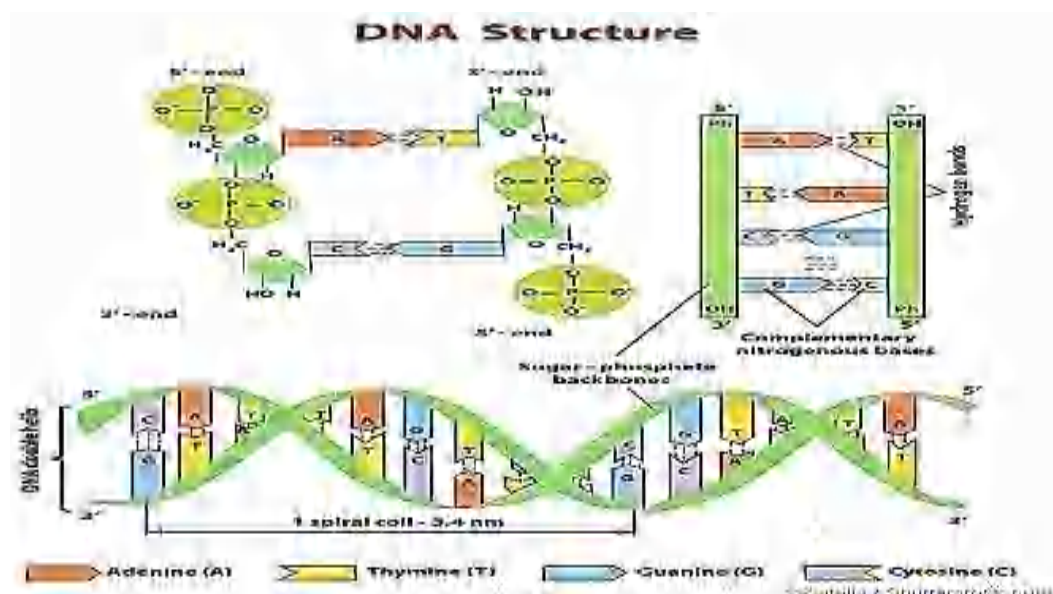


Figure 7 : Structure de l'ADN.

1.8.7.1. L'ADN Satellitaire

Longue région d'ADN hautement répétitif formée de courtes séquences de 1 à 500 paires de bases répétées en tandem jusqu'à plusieurs milliers de fois, situé surtout dans les centromères et les télomères. Ces répétitions en tandem comprennent l'ADN satellite, (Mamecier Demounem A., 2012). L'ADN satellite comprend de longues séries de répétitions d'ADN plus ou moins complexes et non transcrites et qui constituent la majeure partie des régions hétérochromatiques des génomes. L'ADN satellite est un type d'ADN répétitif très répété non codant, c'est-à-dire ne code pas pour les protéines et ne transmet pas d'informations génétiques fonctionnelles. Il contribue à l'organisation chromosomique (Shapiro J.A *et al.*, 2005).

1.8.7.2. L'ADN répétitive ou répété

L'ADN répétitive occupe une fraction importante du génome totale de nombreux organismes c'est-à-dire il est localisé dans tout le génome. Cet ADN ne code pas les protéines et appartient à la catégorie de l'ADN non codant du génome. IL existe trois types principaux d'ADN répétitive nommées répétitions terminales, répétitions en tandem, et répétitions intercalées (Shapiro J.A *et al.*, 2005 , Hammouda D, 2013) (Figure 8).

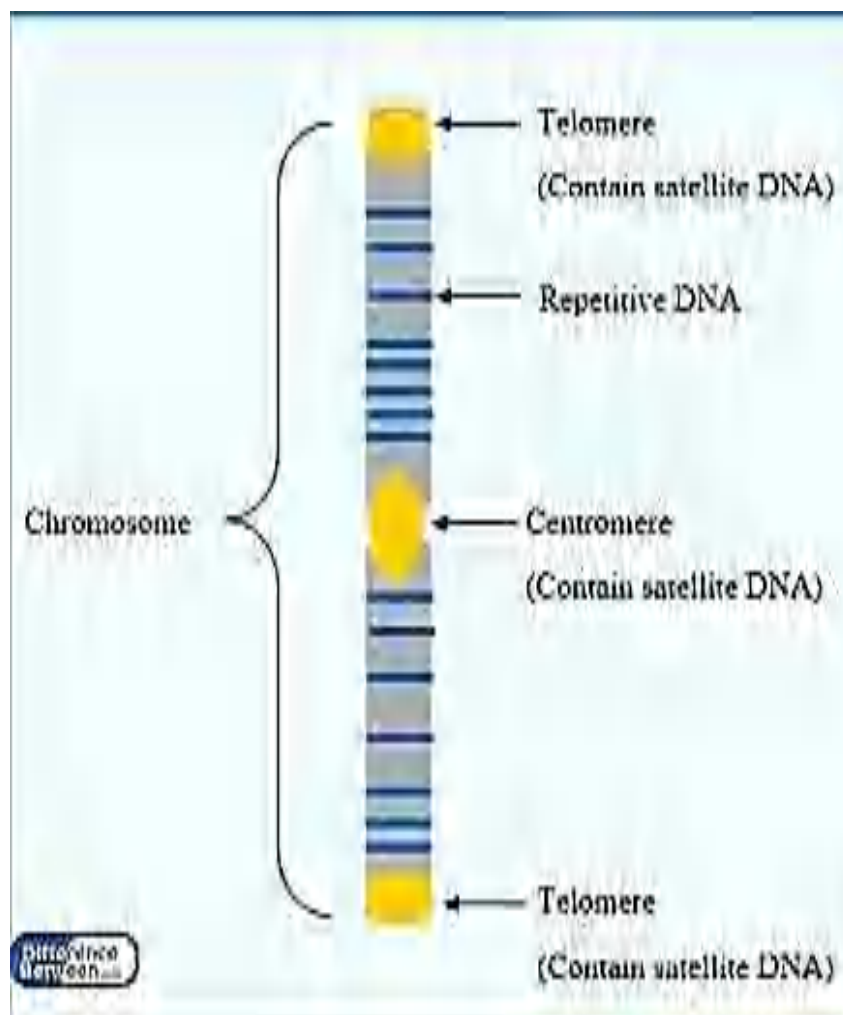


Figure 8 : Localisation de l'ADN satellite et l'ADN répétitif dans un chromosome .

1.9. Comportement méiotique

1.9.1. Étapes de la Méiose et anomalies

La méiose est un mode de division cellulaire particulier qui constitue la contrepartie nécessaire de la fécondation : à la suite de deux divisions successives, une cellule diploïde ($2n$ chromosomes) donne naissance à un groupe de quatre cellules filles (tétrade) haploïdes (n chromosomes). Cette réduction chromatique compense exactement le doublement du nombre de chromosomes qui résulte de la fécondation et assure la permanence du stock chromosomique au cours des générations successives. Au point de vue cytologique, la méiose consiste en la succession de deux méioses (réductionnelle et équationnelle).

1.9.1.1. Division hétérotypique ou réductionnelle (méiose I)

C'est une division au cours de laquelle le nombre des chromosomes est réduit de moitié. Elle commence par une prophase longue au cours de laquelle les chromosomes homologues s'accolent. D'autre part, la télophase peut n'être qu'ébauchée ou même totalement absente (Deysson, 1976).

1. Prophase I:

Cette phase est divisée en cinq stades successifs (Wettstein et al., 1984, Zickler & Kleckner, 1999):

a/ Stade leptotène

Dans le noyau un peu gonflé apparaissent des chromosomes grêles, à peine spiralés et ne présentant pas de clivage longitudinal visible. Souvent, ces chromosomes convergent vers un pôle du noyau (disposition dite en bouquet).

b/ Stade zygotène

Cette étape est caractérisée par l'appariement des chromosomes homologues qui s'alignent directement l'un en face de l'autre et se tiennent ensemble en plusieurs points sur leur longueur (synapsis) qui facilite la fusion en maintenant ensemble les chromosomes alignés. (Figure 09 a).

Chaque paire de chromosomes ainsi accolées est appelé **un bivalent (ou tétrade)**.

Qui peuvent se présenter sous différentes formes de bivalents : **bivalents en anneaux, bivalents droits, et bivalents en V**. Ces bivalents forment ensuite, la plaque équatoriale.

c/ Stade Pachytène

Les chromosomes homologues de chaque paire deviennent très enroulés, plus courts et plus épais. La fin de ce stade est souvent appelée strepsiptère où les chromosomes commencent à se cliver (Figure 09 b).

d/ Stade diplotène

Les chromosomes recombinants homologues commencent à se séparer mais restent joints aux points où le croisement a eu lieu, ils restent attachés en endroits où on a une structure en forme de croix appelée **chiasma**, formée par un phénomène particulier nommé **crossing-over** (**Figure 09 c**).

e/ Stade diacinèse

Séparation des chromosomes homologues. Les chromosomes peuvent être condensés au maximum, ils deviennent très courts et donc plus maniables pour la suite des mouvements qu'ils vont subir. Au cours de ce stade, le nucléole puis la membrane nucléaire disparaissent

(**Hamant, Ma, & Cande, 2006; Pawlowski & Cande, 2005**) et le fuseau se forme.

2.Métaphase I

Les paires de chromosomes homologues s'alignent à la plaque équatoriale, guidés par les microtubules du fuseau. C'est le hasard qui détermine lequel des deux homologues se place d'un côté ou de l'autre de la plaque (**Figure 09 d**).

3.Anaphase I

Les chromosomes homologues migrent vers les pôles du fuseau (**Figure 09 e-f**).

4.Télophase I

Lorsque les chromosomes sont parvenus à chaque pôle, de nouvelles membranes nucléaires se différencient mais les chromosomes se modifient peu et conservent en général leur individualité (**Figure 09 g**). Une cytotélière se produit parfois.

1.9.1.2. Division homéotypique ou équationnelle (méiose II)

C'est une méiose qui suit immédiatement la division réductionnelle et maintient le nombre haploïde des chromosomes.

1.Prophase II

Cette phase est courte. Les filaments de chromatine formant les chromatides sœurs d'un chromosome se condensent (**Figure 09 h**).

2.Métaphase II

Les chromosomes sont à l'équateur de la cellule. Les chromatides sœurs ne sont pas collées sur toute leur longueur contrairement à ce qu'on observe à la mitose (**Figure 09 i**).

3.Anaphase II

Les centromères se divisent et les chromatides soeurs se séparent et migrent vers les pôles opposés (**Figure 09 j**).

4. Télaphase II

Les chromatides se décondensent pour former quatre tétra spores (**Figure 09 k**).

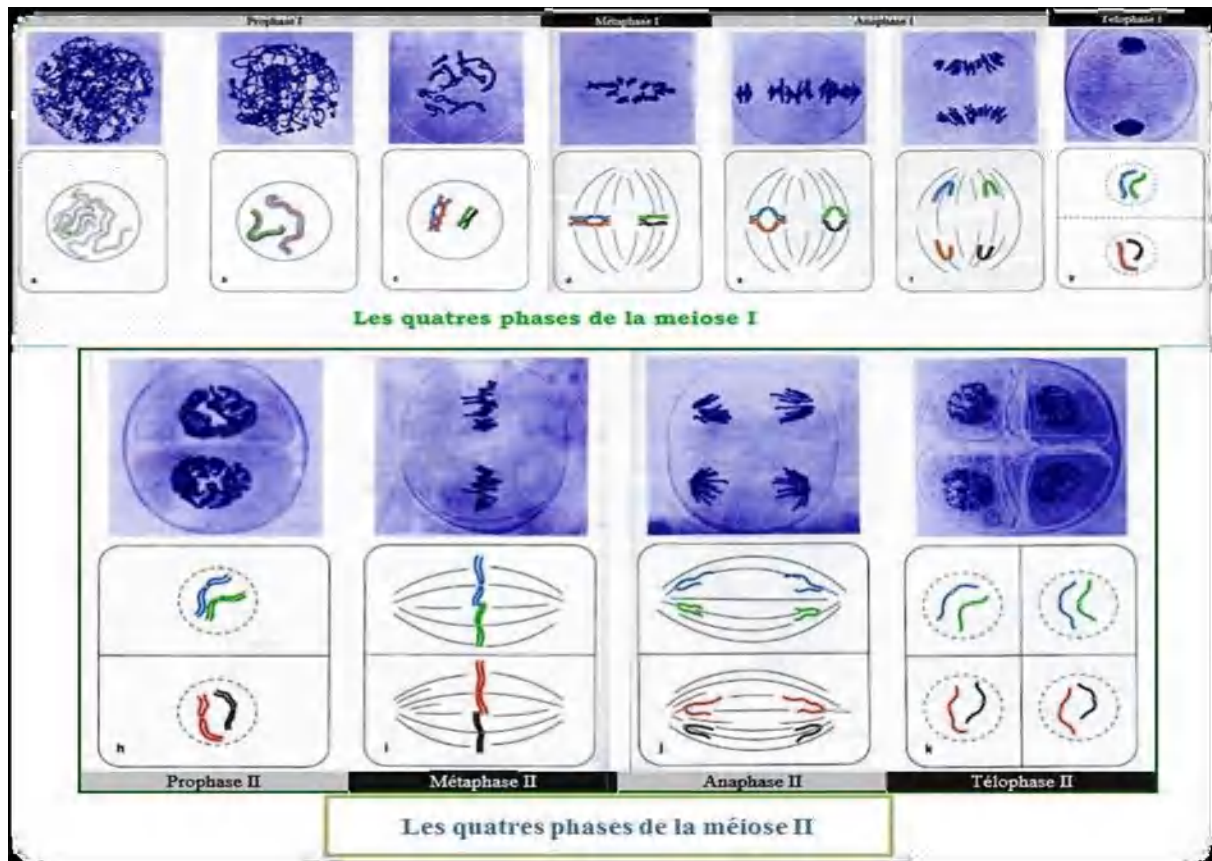


Figure 09 : Les Différents stades de la méiose : (a) Zygotène, (b) Pachytène, (c) Diplotène, (d) Métaphase I, (e-f) Anaphase I, (g) Télaphase I, (h) Prophase II, (i) Métaphase II, (j) Anaphase II, (k) Télaphase II (Deysson, 1976).

<https://www.google.com/search?q=les+quatre+phases+de+la+m%C3%A9iose>.

- Parmi les anomalies méiotiques qui peuvent être observées l'or d'une étude, nous citons :

1.9.1.3. Pont chromosomique

Le pont chromosomique dans les lignes des cellules mères de pollen (CMP) consanguines Provoquées par des réarrangements chromosomiques ou par collage chromosomique est reporté par Defani et *al.*, 1995. Ces ponts sont principalement causés par des mutations de types inversions paracentriques hétérozygotes, ou sont

également causés par la rupture et la fusion des chromatides. Les irrégularités dans l'appariement chromosomique contribuent à la production de chromosomes et de micronoyaux retardataires (Defani *et al.*, 1995).

1.9.1.4. Chromosomes retardataires

Un chromosome est marqué comme un retardataire s'il était localisé à une anaphase tardive assez loin derrière les chromosomes correctement séparés qu'il ne chevauche pas avec eux. Il est important de noter qu'il n'y a pas une définition standardisée de l'anaphase. Certains considèrent qu'un chromosome est un retardataire seulement s'il reste immobilisé dans l'interzone, non inclus dans le noyau de la fille, devenant un micronoyau. D'autres, définissent un retard par sa position anaphase par rapport aux chromosomes non lâches, indépendamment de son destin ultime, des retardataires qui sont devenus des micronoyaux, la majorité inhibait la cytokinèse et donc conduisait probablement à la production de cellules avec des compléments chromosomiques diploïdes plutôt que des cellules aneuploïdes (Marie *et al.*, 2007).

1.9.1.5. Micronoyau

Un micronoyau est un petit noyau qui se forme à partir d'un chromosome retardataire ou d'un fragment de chromosome qui ne s'intègre pas dans le noyau principal. Ces chromosomes isolés dans l'espace où les fragments de chromosomes se condensent, également, formant un petit noyau rond entouré par sa propre membrane nucléaire.

Il a été rapporté que la cytokinèse peut générer directement certaines perturbations structurelles (rupture du chromosome, rupture de l'enveloppe nucléaire) en raison du piégeage de la chromatine à partir des chromosomes retardataires ou des ponts chromosomiques dans le sillon du clivage (Marie *et al.*, 2007).

1.9.1.6. Chromosomes B

Les chromosomes B sont nommés les chromosomes surnuméraires ou mes extra-chromosomes, typiquement ils ont peu d'effet sur le phénotype d'un individu (Jones et Hoben 2008), ils sont présentes dans 15% des espèces eucaryotes (Maria Teruel *et al.*, 2009) et leur nombre varie d'une espèce à l'autre de zéro à plusieurs (Jonathan 2007).

Des études de biologie moléculaire ont montré que la majorité des chromosomes B contient l'ADN répétitif, en outre l'ADN ribosomique, l'ADN centromérique et télomérique, ainsi que les transposons qui sont fréquemment présents chez les chromosomes surnuméraires (Camatchou, 2005).

1.9.1.7. La recombinaison méiotique

La formation d'échanges chromosomiques, autrement appelés crossing-overs, est un processus crucial dans la méiose. En effet, la recombinaison méiotique est primordiale en permettant la création de la diversité et contribuent aussi à l'évolution des espèces par le biais brassage des allèles paternels et maternel et en établissant des connexions physiques (les chiasmata) entre les chromosomes homologues afin de maintenir leur attachement jusqu'à leur ségrégation, et ainsi permettre une séparation correcte des bivalents. Ils sont visualisables en microscopie optique sous forme d'une structure appelée chiasma

1.9.2. Les mutations chromosomiques

Les mutations chromosomiques : correspondent à des cassures ou des remaniements de chromosome. Ces mutations chromosomiques sont visibles au niveau du caryotype. Ces mutations sont deux types: Anomalies de nombre et anomalies de structure.

1.9.2.1. Anomalies de type nombre

- **Euploïdie**

Une euploïdie caractérise une cellule qui possède deux ou plusieurs lots complets de chromosomes ($2x$, $3x$, $4x$ nx) un changement dans le nombre de chromosomes implique tout le stocke chromosomique. Cette euploïdie peut aboutir à la polyploïdisation (plusieurs niveaux), Ou polyploïdie qui est fréquente chez les plantes, particulièrement les angiospermes (Wolfe 2001).

- **Aneuploïdie**

C'est un phénomène cytologique qui peut être défini par l'existence de plus de deux chromosomes homologues par paire chromosomique (hyper diploïdie) ou par l'absence d'un ou des deux chromosomes dans une paire homologues (hypo diploïdie). Dans le cas d'une disjonction normale, les chromatides d'un chromosome se séparent à chaque pôle cellulaire pendant la division mitotique, mais parfois, une mauvaise ségrégation chromosomique peut se produire et amener à l'observation du phénomène de l'aneuploïdie.

- **La non-disjonction**

Quand les chromatides d'un chromosome ne se séparent pas correctement et ainsi, le chromosome entier migre à un seul pôle. Cette ségrégation anormale va produire deux cellules descendantes aneuploïdes. Une des cellules va avoir un chromosome supplémentaire est appelée cellule hyperploïde. L'autre cellule va avoir un chromosome en moins et appelée cellule hypoploïde (Turleau et Prieur, 2000).

- **La perte de chromosomes**

Quand un chromosome ou une chromatide reste en arrière, à l'équateur, et ne migre pas au pôle correspondant. C'est le phénomène de retard dans l'ascension anaphasique. Dans le premier cas, deux cellules sœurs hypoploïdes vont être produites. Dans le second cas, une cellule sera diploïde et l'autre hypoploïde.

1.9 .2.2. Anomalies de type structure

Les anomalies de structure sont la conséquence de cassures chromosomiques suivies par un ou plusieurs recollements anormaux. Par définition les trisomies et les monosomies partielles.

Résultent de remaniements de structure. Les anomalies de structure peuvent affecter un chromosome ou deux chromosomes homologues ou non homologues, parfois davantage. Elles peuvent être équilibrées ou non équilibrées (Figure 10).

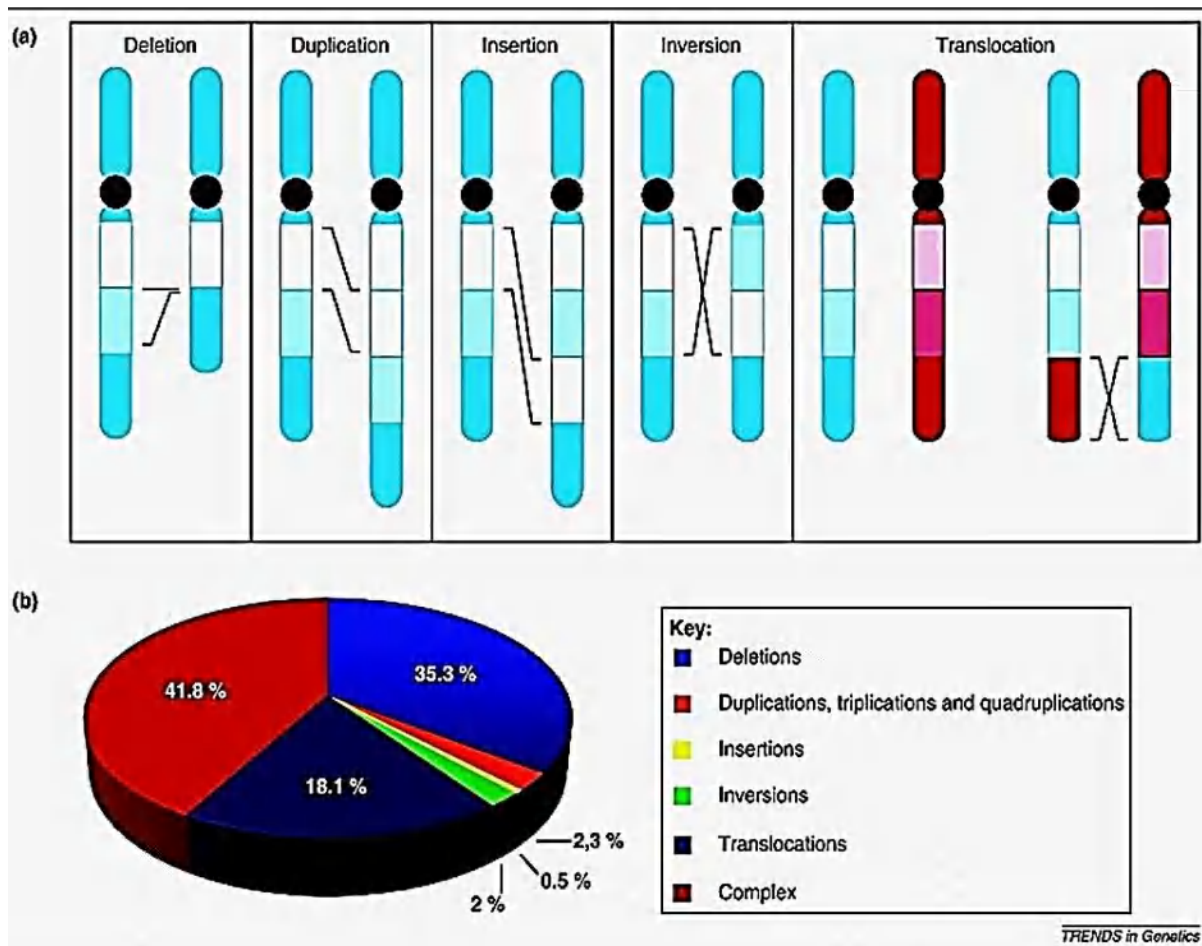


Figure 10: les différents types des aberrations (ou mutations) chromosomiques).

a. Délétions

Elles résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminale), ou de deux cassures sur un même bras chromosomique avec perte du segment intercalaire (délétion intercalaire). Les délétions terminales supposent un mécanisme de restitution d'un télomère pour assurer la stabilisation du chromosome (Turleau et Prieur,2000).

b. Duplications

Sont des variations structurales qui correspondent à des fragments génomiques présents en une seule copie dans un génome et qui sont présents en plusieurs copies dans un autre génome.

c. Inversions

Elles sont dues à deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire. Elles sont dites péricentriques si le centromère est compris dans le segment intermédiaire. Elles sont dites paracentriques si les deux cassures se sont produites sur le même bras chromosomique.

d- insertion

Les insertions se traduisent par le transfert d'un segment intercalaire à l'intérieur d'un autre bras chromosomique.

e- Translocations-réiproques

Ces translocations sont dues à des échanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes, les points de cassure s'étant produit ailleurs que dans les régions juxta centromériques des acrocentriques.

Les translocations par échange de bras entiers sont des cas particuliers de translocation réiproque.

1.10. Données palynologiques**1.10.1. Palynologie**

La palynologie est l'étude de la forme et des caractéristiques morphologiques des grains de pollen. Cette discipline permet de déterminer la plante qui produit le pollen (Maghini *et al.*,2013).

1.10.2. Intérêt de la palynologie

Wodehouse (1928) indique que dans certaines familles, les grains de pollen de toutes les espèces sont très semblables (Poacées, Brassicacées) alors que dans d'autres familles, le pollen est plus diversifié (Astéracées, Fabacées). L'étude de la morphologie

pollinique est «un bon secours pour tester et analyser l'espèce, unité fondamentale de la systématique» et permettre ainsi la compréhension de la phylogénie des espèces. Ce sont particulièrement l'architecture extrêmement variée de l'exine, ainsi que le nombre et le type d'ouvertures, qui constituent les principales caractéristiques permettant de déterminer, avec plus ou moins de précision, la position systématique du grain de pollen (Milne, 2005). Suivant les espèces retrouvées, on peut donc avoir des informations sur le climat et l'environnement qui existaient à cette époque ; on reconstitue donc le paléoclimat et le paléo-environnement.

1.10.3. Pollen

Pollen (mot latin) est la poussière le plus souvent jaune, très fine, renfermée dans les loges des anthères des étamines avant la fécondation (Renault-Miskovsky et Petzold, 1992).

Le grain de pollen est le gamétophyte mâle qui assure la transmission génétique mâle dans la reproduction sexuée des végétaux supérieurs ou spermaphytes (Figure 11).

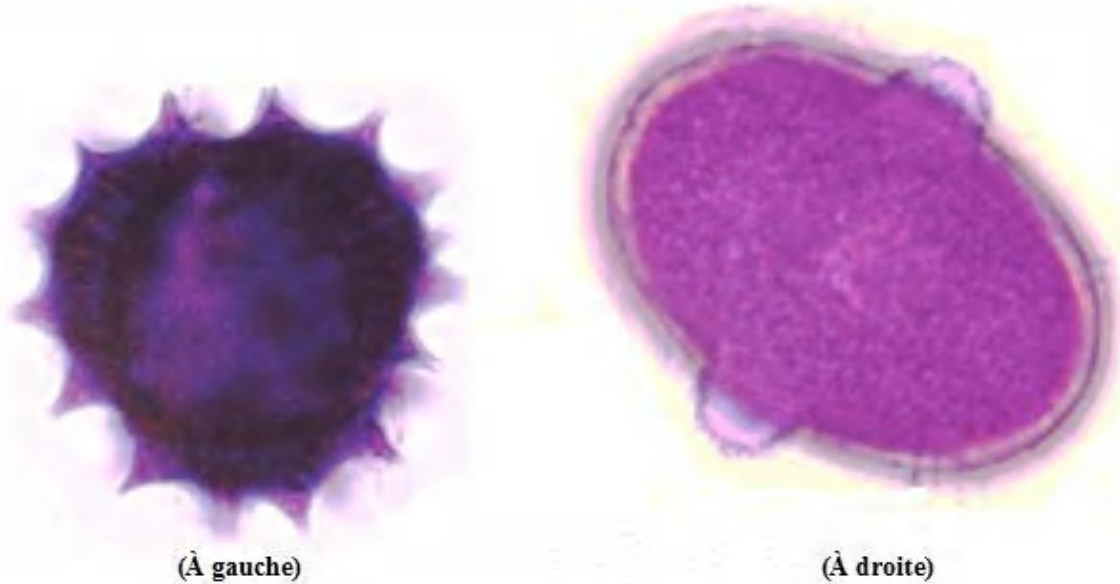


Figure 11 : Grain de pollen de génotype « Métropole » de l'espèce *Lens culinaris* (à droite) et un grain de pollen étranger (à gauche) prises en une photo microscope Leica DM 4000 B Led.(Hammadi,20019).

1.10.3.1. Structure de grain de pollen

Un pollen est constitué de plusieurs cellules destinées à intervenir dans la fécondation des organes femelles, Ces cellules sont enfermées dans une enveloppe protectrice constituée schématiquement de deux parties l'intine et l'exine (Edlund *et al.*, 2004) (Figure 12) .

- L'intine

De nature pectocellulosique, n'est pas structurée son prolongement donne la paroi du tube pollinique .

- L'exine

Formée de sporopollénine (matière organique terpénique polymérisée) qui n'est détruite que

par oxydation. Elle est très résistante aux dégradations d'origine chimique, physique ou microbienne. Elle assure une protection mécanique de matériel génétique inclus dans le pollen, et une certaine imperméabilité (Kress et Stone, 1982 in Aimeur, 2004).

Cette enveloppe comporte une ou plusieurs (ouvertures ou apertures) de forme caractéristiques (pores ou sillons) qui permettent le passage du tube pollinique lors de la germination du pollen sur le stigmate de la fleur femelle et servent de porte d'entrée pour

l'eau ou d'autres substances (Furness et Rudall ,2004).

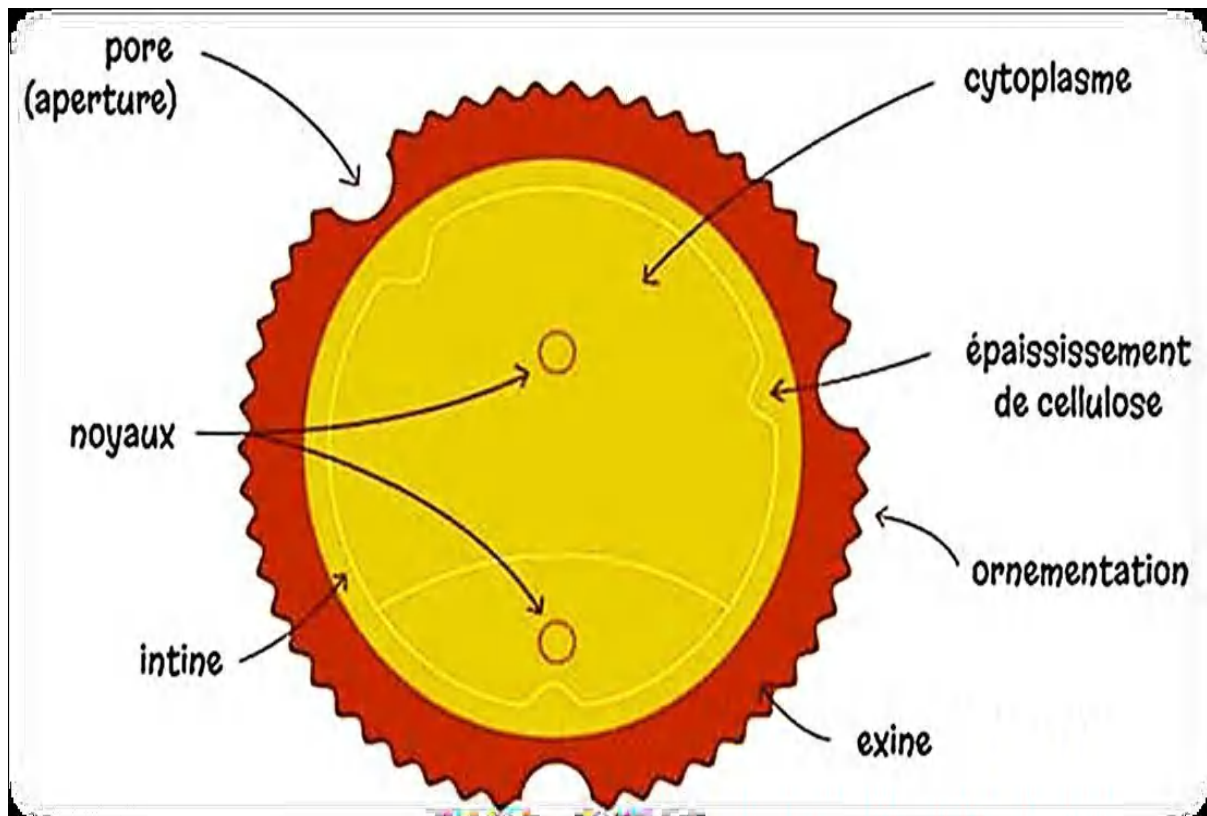


Figure 12: Structure de grain de pollen Observée au microscope électronique .

Ce tube assurera la fécondation en transportant les gamètes mâles jusqu'à l'ovule, permettant ainsi la formation d'une graine (figure 13). En général, sa surface est porteuse d'une ornementation spécifique. « L'ornementation de l'exine varie selon les espèces. Elle va permettre d'identifier à quel végétal appartient le grain de pollen, elle n'est visible qu'au microscope électronique.

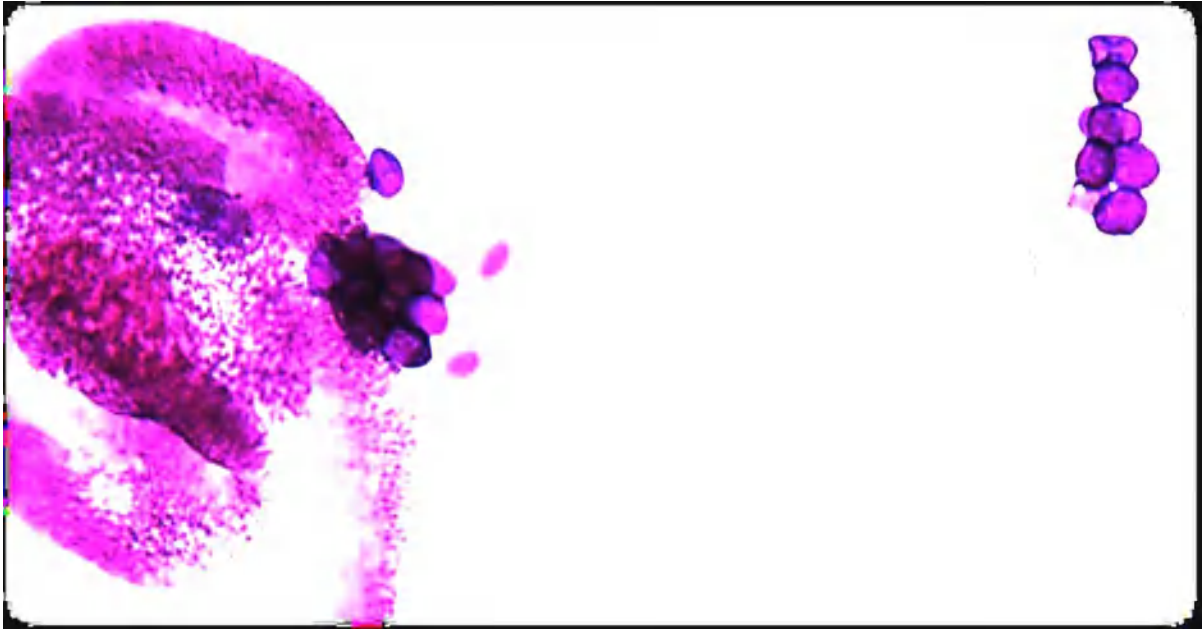


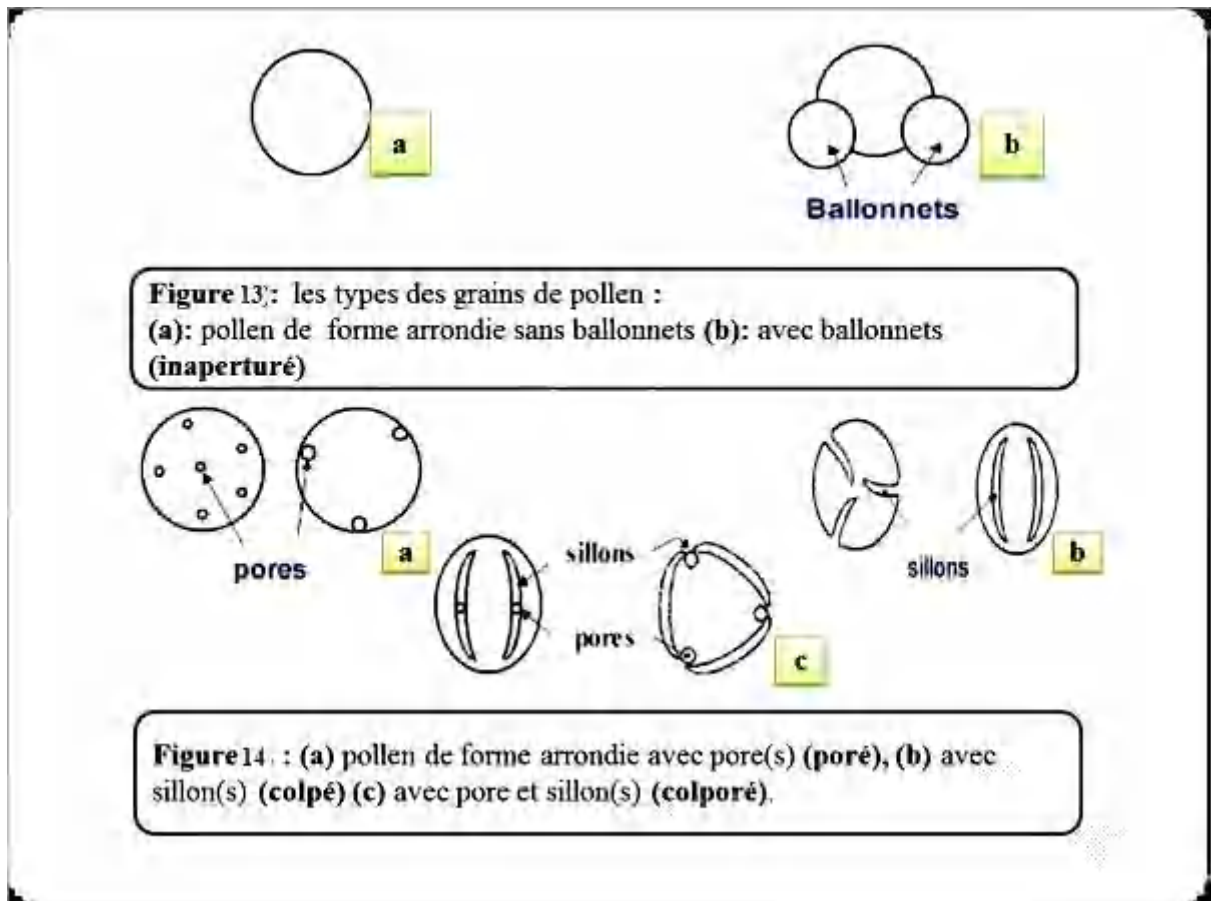
Figure 13 : Grain de pollen de génotype « Dahra » de *Lens culinaris* sort des loges des anthères des étamines (microscope Leica DM 4000 B Led).(Hammadi ,2019).

1.10.3.2. Classification des grains de pollen

Parmi les paramètres qui permettent de classer les grains de pollens, nous citons :

La présence ou non de pores ou de sillons :

- Sans ouvertures (ni pore ni sillon) : pollen inaperturé (Figure 14).
- Pores seules (petites ouvertures circulaire).
- Sillons seules (ouverture très allongée).
- Sillons et pores peuvent coexister : pollen colporé (Figure 15).
- L'aspect de la surface (ornementation et structure de l'exine).
- La taille et allongement peuvent aussi être pris en compte.



1.10.3.3. Les différentes formes du grain de pollen

Chaque pollen est caractéristique d'une espèce, il est donc possible à partir d'un pollen observé au microscope de retrouver l'espèce de végétal à fleur qui l'a produite. Les pollens s'identifient grâce à la forme de leurs grains et à la texture de leur surface. Les grains de pollens sont sphériques ou ovales, généralement jaunes, voire foncés, parfois rougeâtres ou verdâtres.

L'illustration ci-dessous permet d'identifier les caractéristiques des pollens au microscope (Figure 16).

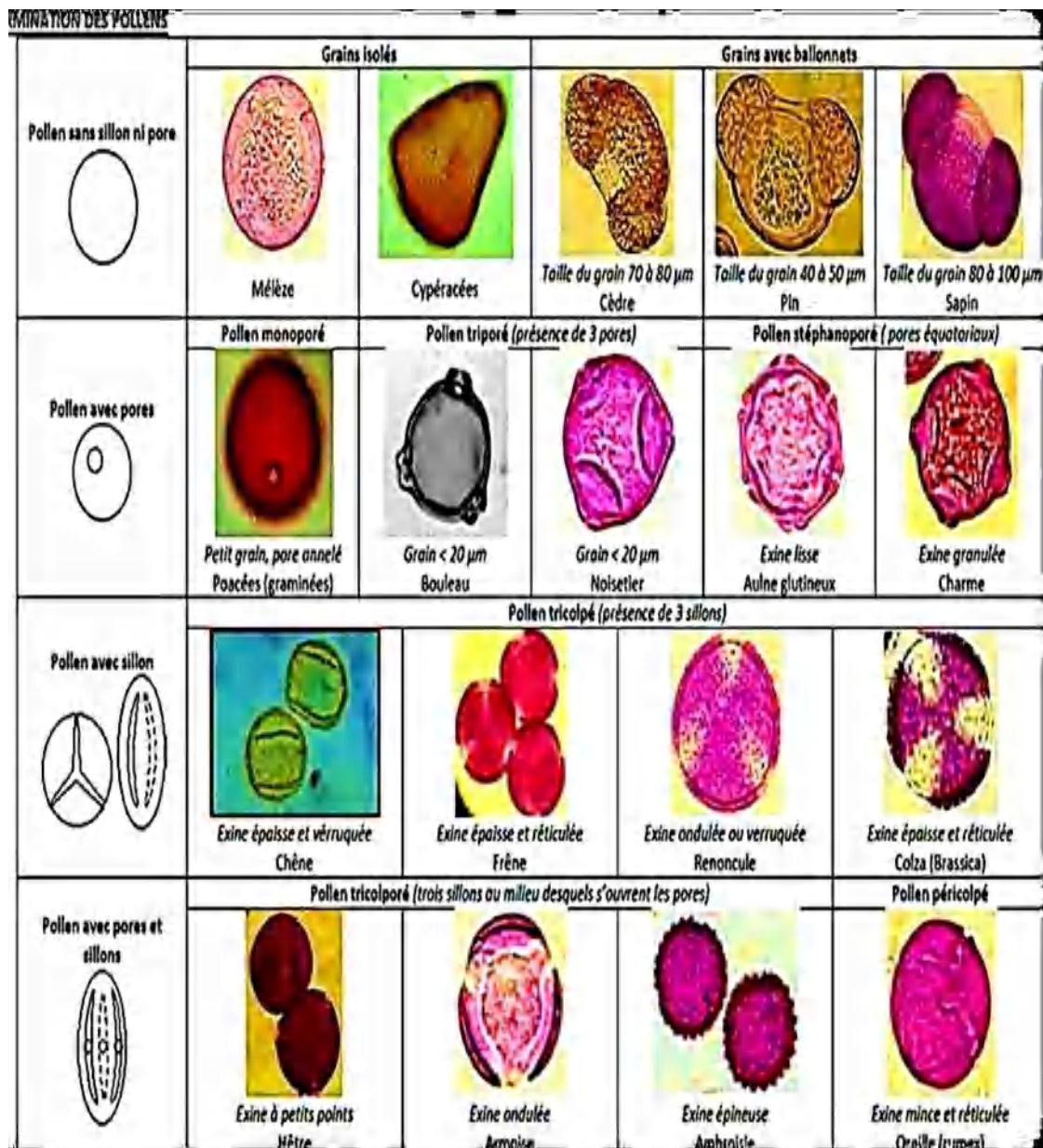


Figure 16 : Identification des grains de pollens chez différents végétaux

file:///C:/Users/Acer/Downloads/identification_des_pollens.pdf.

1.10.3.4. La viabilité des grains de pollen

C'est la capacité du pollen à germer. Son évaluation à partir d'un pollen fraîchement récolté ou encore conservé, est conseillée avant son utilisation pour la pollinisation. Elle contribue aussi à sélectionner le meilleur type de pollen car provenant de mâles génétiquement différents et possédant des degrés variables de viabilité (Djerbi, 1994).

1.10.4. Relation entre la méiose et la palynologie

La microsporogénèse, ou méiose mâle des angiospermes, comprend l'ensemble des étapes permettant de passer d'une cellule mère diploïde à quatre microspores haploïdes, par l'intermédiaire de la méiose (Figure 16).

Avant de se diviser, la cellule mère s'entoure d'une paroi de callose, suivie, alors la première

et la deuxième division de méiose. Des parois de callose se forment entre les microspores, qui restent assemblées dans des tétrades avant que la callose ne soit dégradée à la fin de la microsporogénèse, libérant ainsi les microspores, qui constituent les futurs grains de pollen.

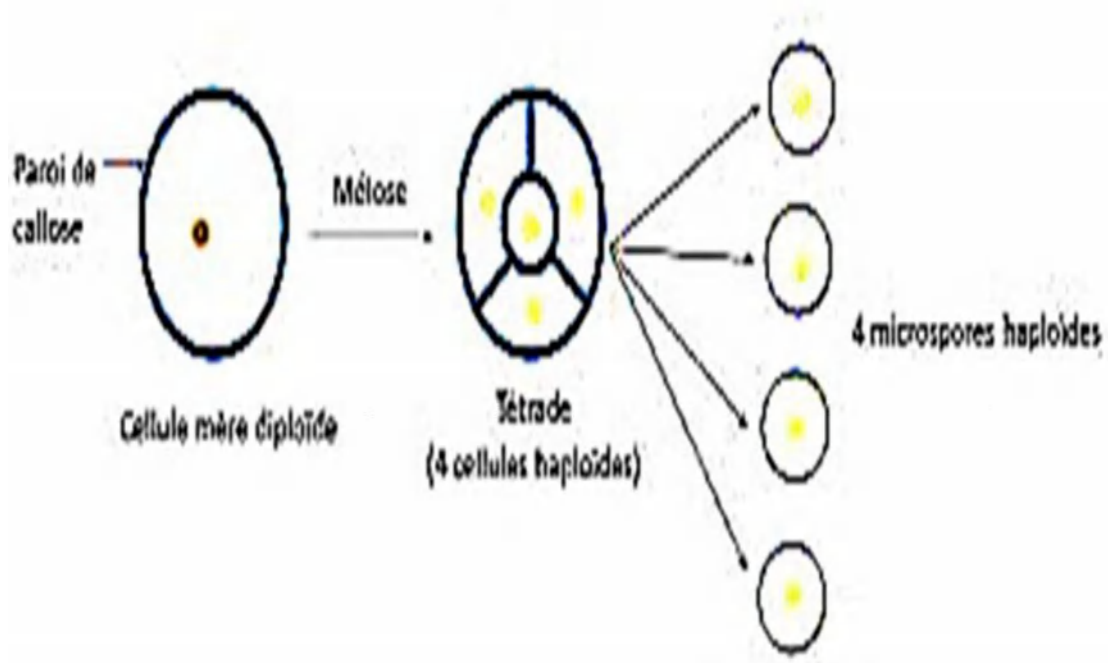


Figure 17 : Représentation schématique de la microsporogénèse chez les angiospermes. **Orange** : noyau diploïde, **jaune** : noyau haploïde.

1.10.5. Détermination du type apertural lors de la microsporogénèse

Il a été proposé depuis un certain temps que les apertures se forment au niveau des derniers points de contact entre les microspores. Cette hypothèse repose notamment sur l'observation de tétrades figées, où on voit nettement des sortes de ponts entre les microspores. Ces ponts correspondent à la position des futures apertures.

Lors de la microsporogénèse, des parois de callose se forment entre les microspores, mais ces parois (ou plans) peuvent se former de manière successive ou simultanée. Dans le cas d'une cytokinèse successive.

Une première paroi se forme après la première caryocinèse, puis une deuxième paroi après la deuxième caryocinèse. Dans le cas d'une cytotocinèse simultanée .

Toutes les parois se forment en même temps, après la deuxième caryocinèse. Le mode de dépôt de la callose lors de la cytotocinèse peut être centripète ou centrifuge, et la croissance de la callose peut se faire le long des plans de division, ou le long des bordures de la tétrade.

Enfin, il existe diverses formes de tétrades, tels que, les tétrades tétraédriques, tétraogonales, rhomboïdales et décussées .

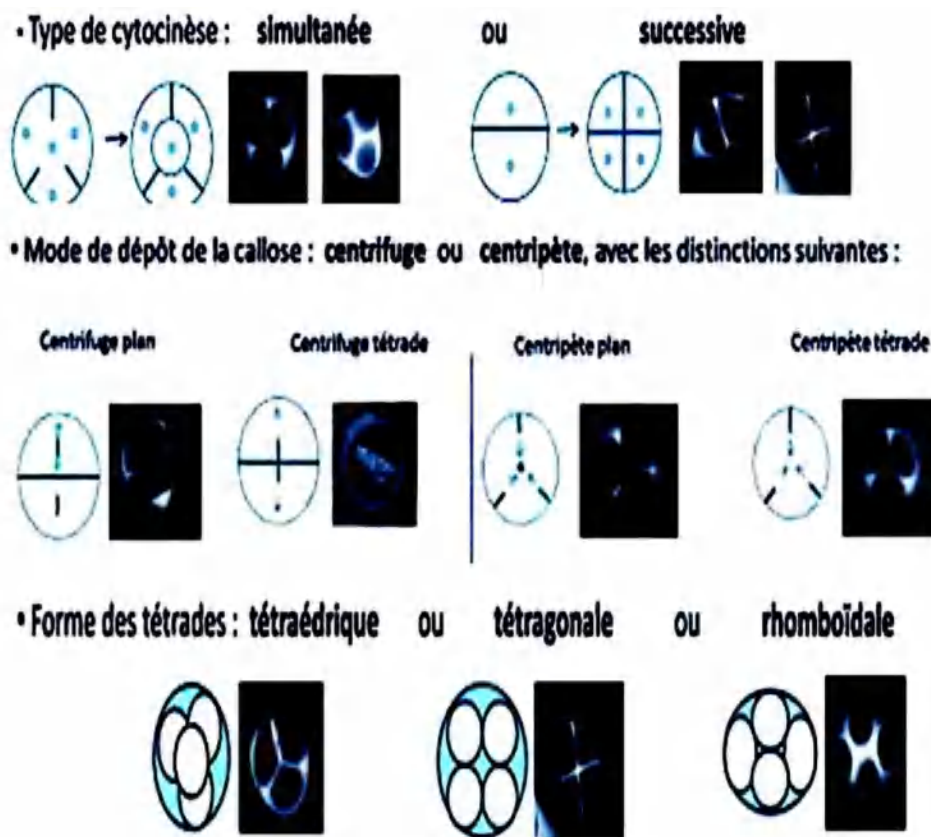


Figure 18 : Cytocinèse, mode de dépôt de la callose et forme des tétrades chez les angiospermes (Ressayre *et al.*, 2002) .

1.11. Les principaux types de marqueurs

Il existe plusieurs types de marqueurs à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs cytogénétique, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires

1.11.1. Les marqueurs morphologiques

En sélection classique, les sélectionneurs recherchent des marqueurs simples du génome des plantes pour suivre les variations de différents caractères d'intérêt agronomique. Les marqueurs morphologiques ont été retenus dans un premier temps parce qu'ils présentaient l'avantage d'être immédiatement disponibles et nécessitent seulement un équipement simple. Ils représentent des variations de type qualitatif (couleur..), morphologiques (forme), des résistances à des maladies ou des ravageurs. Ces critères sont utilisés pour décrire et identifier les lignées et les variétés chez les végétaux. Cependant, ces marqueurs sont peu polymorphes et en général dominants, ils ont fréquemment une base génétique complexe, sont limités en nombre et leur expression est souvent fortement influencée par l'environnement. (Roy et *al*,2012).

1.11.2. Les marqueurs cytogénétiques

- **Marquage par C-banding**

Le C-banding est une technique de marquage qu'on a appliquée dans notre étude pour identifier les caryotypes des génotypes étudiés.

La technique C-banding a été mise en place après les travaux de Pardue et Galle qui ont rapportés que l'hétérochromatine constitutive peut être colorée spécifiquement par la solution de Giemsa. Le Giemsa ne colore que les zones condensées, permet de faire apparaître des bandes caractéristiques pour chaque chromosome. On obtient alors un caryotype de l'individu étudié ou une carte de tous les chromosomes identifiés, par les bandes caractéristiques (Hammouda, 2013), car chaque chromosome possède un taux d'hétérochromatine qui lui différencie des autres. Le marquage de l'hétérochromatine constitutive se fait par une réaction de coloration différentielle de l'hétérochromatine et l'euchromatine (Hammouda,2017).

- **Marquage par N-banding**

Les régions organisatrices du nucléole colorées par la méthode Ag-NOR occupent des positions bien définies dans les chromosomes ou par la technique N-banding, parfois visibles comme une constriction secondaire, mais leur nombre varie d'un organisme à un autre. Ils participent à la formation et au fonctionnement des nucléoles dans les noyaux interphasiques, qui contiennent l'ARN et les protéines ribosomiques (Hammouda *et al.*, 2017). Les NOR correspondent aux séquences d'ADN qui contiennent de l'hétérochromatine portant des gènes qui codent l'ARN r (Hammouda et Khalfallah N., 2008).

Chez les eucaryotes, les unités d'ADNr sont généralement regroupées au sein de régions chromosomiques les NOR « Nucleolar Organizer Region » (AYOUB N., 2009).

1.11.3. Les marqueurs biochimiques (isozyme, protéine)

Les protéines d'une cellule végétale peuvent facilement être extraites et analysées. Les marqueurs biochimiques les plus utilisés sont les isozymes. Ils correspondent aux différentes formes d'une même enzyme et permettent de déterminer la présence de l'allèle correspondant à chacune de ces formes. Dans ce sens, ce sont des révélateurs du polymorphisme entre individus pour les séquences codantes du génome (Tullu *et al.*, 2011, Erdogan ,2015,Hammadi *et al.*,2021).

1.11.4. Les marqueurs moléculaires

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte (Hamwieh *et al.*, 2009).

Ces marqueurs sont les plus étudiés, ils représentent des séquences codantes ou non, présentant un polymorphisme selon les individus. Par les techniques de biologie moléculaire, plusieurs outils ont été développés, permettant d'obtenir directement à partir des marqueurs polymorphes de l'ADN des plantes. Les plus utilisés sont les marqueurs RFLP, RAPD, AFLP et les microsatellites (SSR) (,El-Nahas *et al.*, 2011, Kaur *et al.*, 2011,Zaccardelli *et al.*,2012 , Kushwaha *et al.*, 2015).

Grâce aux marqueurs génétiques, il devient possible :

- d'établir l'empreinte génétique d'un individu, c'est-à-dire de décrire et définir des individus et des variétés en vue de leur inscription, de leur protection et de leur classification
- de mettre en évidence et suivre les gènes impliqués dans l'expression de caractères d'intérêt agronomique ou technologique.



Chapitre II

Matériel et Méthode

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel végétal

Le matériel d'étude est constitué de 12 cultivars (Figure19), de lentille cultivée *Lens culinaris* Medik ($2n=2x=14$). Ces cultivars sont fournis par l'institut technique de grandes cultures (I.T.G.C) d'Elkhroub et (I.T.G.C) de Sétif et de Mila et CNCC (centre national de contrôle et de certification des semences). Les caractéristiques de chaque génotype et son origine sont décrites dans le tableau suivant :

Tableau 01 : Listes des cultivars et origines du l'espèce *Lens culinaris* Medik.

Espece	Cultivars (lignées/varietes)	Generation	Origine	Source
<i>Microsperma</i>	Serie229	F5	ICARDA	ITGC El Khroube
	Idlep 4	/	ICARDA	CNCC El Khroub
	Dahra	F6	Local selection(Tieret)	ITGC Setif
	Idlep1	F5	ICARDA	ITGC Mila
	Idlep2	F6	ICARDA	CNCC El Khroube
	Idlep3	F6	ICARDA	ITGC Setif
<i>Macrosperma</i>	Flip90-31	F6	ICARDA	ITGC El Khroube
	Balkane775	/	ICARDA	CNCC El Khroube
	Metropole	F5	Isolated in 1941, France	ITGC El Khroube
	Nil45	/	ICARDA (syrie)	CNCC El Khroube
	Ibla	F5	ICARDA	CNCC El Khroube
	Redjes	/	Selection locale	ITGC Mila



Figure 19 : Les cultivares du *Lens culinaris* Medik introduites dans différentes techniques.

2.2. Techniques utilisées

1.2.2. Étude morphologique

Les essais de culture sont réalisés pendant la période s'étendant du 2017/2018. Le semis est réalisé avec quatre répétitions durant la première semaine de Décembre dans des pots de 20 cm de diamètre et 40 cm de hauteur à une profondeur de 2 à 2.5 cm. Les pots contiennent du sol qui a été stérilisé et mélangé avec de la tourbe pour avoir une bonne structure (à raison de $\frac{1}{4}$ pour la tourbe et $\frac{3}{4}$ pour le sol). Les pots sont remplis de façon homogène. Quatre plantes par pot sont maintenues propres par des désherbages manuels chaque fois que nécessaire.

2.2.2. Paramètres morphologiques

Les caractères étudiés ont été retenus selon le descripteur de la lentille de l'IPGRI (1985) et les caractères indiqués par l'UPOV (2013).

Les différents paramètres morphologiques sont suivis et mesurés tout au long du cycle de développement de la plante jusqu'à la récolte. ces paramètres mesurés sont :

- Hauteur de la plante (HP)

La hauteur de la plante a été mesurée en centimètres entre la base de la plante et la pointe de la plante aux différentes phases (1 mois, 2 mois et à la maturité).

-Surface foliaire (SF)

La surface foliaire a été mesurée à l'aide d'un compteur de surface foliaire. Les données ont été prélevées au hasard sur des feuilles de plantes sélectionnées sur le même stade et le même niveau, puis la moyenne a été calculée.

-Nombre de branches primaires /plante(NBrP)

Le nombre de branches primaires a été compté émergeant de la base végétale au moment de 1 mois.

-Nombre de branches secondaires /plante(NBrS)

Le nombre total de branches secondaires émergeant des branches primaires a été compté au moment de 2 mois.

-Nombre de folioles/Feuille (Nfo/F)

Le nombre total de folioles/Feuille ont été comptés sur cinq plantes choisies au hasard de chaque génotype et moyennés.

-Nombre des jours jusqu'à floraison(NJF)

Date de floraison ont été notés en termes de jours pris entre la date de semis et de floraison dans chaque cultivar.

-Nombres des jour a maturité (NJM)

Les jours de maturité ont été enregistrés en termes de nombre de jours pris entre la date de semis et la maturité.

-Nombre de gousses/plante(Ngo/P)

Au moment de la maturité, le nombre de gousses/plante a été compté sur cinq plantes choisies au hasard de chaque cultivare et moyenné.

-Nombre de graines/ plante (NG/P)

Le nombre total de graines par plante a été compté à partir de cinq plantes choisies au hasard de chaque cultivare et moyenné.

- Poids de 1000 graines(PMG)

Mille graines ont été comptées et pesées en grammes de chaque cultivare.

- Rendement biologique/plante (RBIO/P)

Pour le rendement biologique par plante, cinq cultivares ont été choisis au hasard, pesés individuellement et moyennés.

-pois des graines/ plante(PG)

Le poids du nombre total de graines/plante a été enregistré en grammes pour chacune des cinq plantes sélectionnées au hasard à l'aide de la balance électronique.

-Indice de récolte (IR)

L'indice de récolte a été déterminé en utilisant la formule donnée par Donald (1962).

$$\text{Indice de récolte (\%)} = \frac{\text{Rendement économique}}{\text{Rendement biologique}} \times 100$$

Où, Rendement économique = Rendement des semences
Rendement biologique = Rendement des semences + Rendement des plantes.

2.3. Étude cytogénétique**2.3.1. Méthode classique de denombrement chromosomique**

Nous avons utilisé la technique de coloration classique décrite par Shafique et al. (1992). Cette méthode comporte les étapes suivantes :

- Scarification des graines

Une incision est pratiquée du côté opposé à l'embryon soit par une lame de rasoir, soit par du papier verre.

- Stérilisation

Les graines sont stérilisées dans un mélange d'eau de javel (12°) et d'eau distillée (1:1) pendant 10 minutes suivi d'un rinçage à l'eau distillée.

-Germination

Les graines sont imbibées pendant 30mn pour la Lentille. Les graines sont mises à germées dans des boîtes de pétri, tapissées de papier filtre imbibée d'eau distillé dans la lumière et à température ambiante.

-Prélèvement

Nous avons déterminé la période durant laquelle le coefficient mitotique est le plus élevé, il est situé entre 3 jours et 7 jours, ou les racicules atteignent une longueur de 0.5 à 1 cm.

-Prétraitement :

Il se fait par trempage des tissus en division dans un agent mitoclassique, cette opération vise un double objectif :

- a- Bloquer les divisions mitotiques au stade métaphase.
- b- Contracter les chromosomes.

Il existe, parallèlement à la colchicine et l'eau glaciale, d'autres agents mitoclassiques tel que α -bromonaphtalène, 8-hydroxyquinoleine.

Nous avons effectués un prétraitement à la 8-hydroxyquinoleine. La durée de ce prétraitement pour *Lens culinaris* Medik : à une durée de 2h30 à 3h15.

-Fixation

Les fixateurs détruits toute vie cellulaire, ils doivent avoir une action rapide pour bloquer toute évolution des divisions cellulaires et permettent de conserver l'intégrité structurale des chromosomes. La fixation s'effectue dans une solution éthanol acide acétique (3V-1V) pendant 48h au réfrigérateur.

-Stockage

Les points racinaires sont conservés au réfrigérateur à éthanol 70% ". Certains fixateurs comme le **Carnoy** peuvent également être utilisé comme solution de stockage.

-Hydrolyse

Cette étape est nécessaire pour obtenir un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle en trempant les racines dans une solution 1N HCl à 60 °C pendant 20 minutes

-Coloration :

La coloration est réalisée par le réactif de Schiff pendant 20 minutes à l'obscurité et à Température ambiante, la réaction spécifique entre les groupements aldéhydes libérés lors de l'hydrolyse et la fushine basique donne une coloration rouge aux chromosomes.

-Écrasement :

L'écrasement des demi-pointes se fait entre lame et lamelle dans une goutte de l'océtoorceine, cette étape assure une bonne dispersion des chromosomes.

-Observation et photographies :

L'observation et la prise des photos de meilleures plaques métaphasiques s'effectuent sous l'objectif 900 d'une photo microscope de type Leica DM 4000.

-Établissement du caryotype

Le caryotype est établi à partir de photographies de 5 plaques métaphasiques provenant de plusieurs individus. Les plaques sont rigoureusement sélectionnées afin d'éviter les erreurs possibles dues aux différents degrés de spiralisation des chromosomes. La différence de longueur des chromosomes ne doit pas dépasser d'une lame à une autre, le seuil de 10 % (Bentzer et al. 1971).

2.3.2. Méthodes d'analyses de l'hétérochromatine et de localisation des N.O.R

2.3.2.1. Technique de C-banding

Nous avons appliqué la méthode décrite par Gaffarzadeh-Namazi et al. (2007) avec des modifications introduites dans les étapes Dénaturation et renaturation de l'ADN (Hammouda, 2013). Les meilleures préparations incolores sont soumises aux étapes suivantes (voir tableau 2).

2.3.2.2. Technique de N-banding

Nous avons suivi le protocole de (Hammouda, 2008) pour réaliser la technique du N-banding dans le but de détecter les régions organisatrices nucléolaires (N.O.R) (voir tableau 5).

2.3.3. Le comportement méiotique

1. Prélèvements des boutons floraux

L'étude des appariements chromosomiques en méiose est faite en prophase I et en métaphase I dans les cellules mères polliniques (CMP). La technique décrite par Jahier. (1992) permet un étalement parfait des associations chromosomiques aux stades zygotène et pachytène.

2. Fixation

Les jeunes boutons floraux sains de différents génotypes sont fixés entre 9h00

Et 10h00 dans la solution (éthanol-chloroforme-acide acétique 6 :3:1; V/V) pendant 24h, ce fixateur détruit toute vie cellulaire, ils doivent avoir une action rapide pour

bloquer toute évolution et des divisions cellulaires et permettent de conserver l'intégrité structurale des chromosomes.

2. Stockage

Les jeunes boutons floraux sont conservés à l'éthanol à 70% à 4°C dans le réfrigérateur durant une année.

3. Coloration

La coloration des boutons floraux se fait dans le carmin acétique à 2%.

4. Écrasement

L'écrasement des boutons floraux se fait entre lame et lamelle dans une goutte de l'acide acétique à 2%, cette étape assure une bonne dispersion des chromosomes. sont disséquées sous une loupe binoculaire puis recouvertes avec une lamelle. Après avoir passer la lame sur une flamme pour un léger chauffage, on procède à l'étalement proprement dit en exerçant une forte pression avec le pouce sur la lamelle.

5. Montage :

Le montage est effectué après dissection des anthères sous loupe binoculaire.

6. Observation et photographie

Les lames fixées sont observées puis photographiées par un photomicroscope Leica DM 4000 B Led. Sous l'objectif (x10).



Figure 20 : Microscope photonique Leica DM 4000 B Led

Tableau 02 : Les différentes étapes des deux techniques de marquage C-banding et N-banding.

Techniques Étapes	C-banding (analyse du taux d'hétérochromatine)	N-banding (localisation des N.O.R)
Délamellation	Le décolllement des lames se fait a l'azote liquide à -196c°.	Un décolllement des lames qui ont été conservées, par de l'azote liquide à (-196°) puis rincées à l'éthanol.
Hydrolyse		Les lames sont trempées dans de l'acide acétique 45% à 60°C pendant 10 mn puis séchées une nuit à l'air.
Dénaturation	se fait dans l'hydroxyde de barium 11,68g/ 200 ml chauffé jusqu' à 80 c° et puis refroidie rapidement jusqu' à 45c° pendant 5mn.	Les lames sont plongées dans une solution tampon NaH ² PO ₄ (1 M) à pH = 4,2 et une température à ± 94°C pendant 2 à 3 mn (et renaturation).
Rinçage	Les lames sont rincées à l'eau de robinet pendant 45mn ensuite avec l'eau distillée pendant 10 mn.	
Renaturation	Les lames sont transférées dans une solution fraîche de tampon(Sorensen) 2XSSC à pH= 7 et une température de 60c° pendant 30 mn.	
Coloration	Les lames sont plongées dans une solution de tampon phosphate à pH=6,8 et 4% de Giemsa pendant 13 mn	se fait dans un tampon phosphate : Na ² HPO ₄ + KH ² PO ₄ et de l'H ² O à un pH = 6,8 et 3% de Giemsa pendant 15 min.
Montage	les lames sont laissées sécher une nuit puis fixées par un produit de montage « DPX Montant for hystology »	les lames sont laissées sécher une nuit puis fixées par un produit de montage « DPX Montant for hystology ».

2.3.4. Étude palynologique

2.3.4.1. Prélèvement des grains de pollen

Le prélèvement des boutons floraux est effectué au stade de gonflement le matin. Les fleurs utilisées pour extraire le pollen sont celles dont la position est toujours la même. Les anthères peuvent être prélevées sur des échantillons conservés en herbier ou bien sur des fleurs fraîchement cueillies. Une fois les anthères prélevées, une simple agitation peut faire libérer les grains de pollen avant l'anthèse afin d'éviter tout risque de contamination par un pollen étranger.

2.3.4.2. Observation et mesure de la morphologie des grains de pollen

La méthode de Wodehouse (1935) est utilisée pour s'assurer de l'abondance relative des grains de pollen et de leur état dans chaque échantillon prélevé.

Le pollen est lavé plusieurs fois dans l'alcool absolu directement sur la lame, puis monté dans la gélatine glycinée colorée par la fuschine.

Les préparations du pollen montées dans la gélatine glycinée se conservent de façon durable, mais il est fortement déconseillé d'entreprendre les mesures avant la stabilisation définitive du volume des grains de pollen. Il est connu que les grains de pollen continuent à gonfler dans le milieu de montage pendant un certain temps. Ce temps de maturation peut varier d'une espèce à l'autre et dans les meilleurs des cas, il faut attendre au moins 4 semaines avant de commencer les mesures (Siljak-Yakovlev 1986).

➤ Les caractères mesurés sont :

- Longueur et largeur du sillon,
- Longueur et largeur de pore,
- et la taille de grain de pollen.

Les observations ont été effectuées au microscope photonique LEICA DM 4000 B LED à l'objectif (x 10) pour les mesures et à l'objectif à immersion (x100) pour la forme. Les mesures sont effectuées avec un logiciel Méta Morph MM AF 1.8.

2.3.4.3. Test de viabilité et mesure des grains de pollen

La viabilité est analysée sur du pollen prélevé avant l'anthèse en saupoudrant délicatement des lames par agitation des étamines. Les grains de pollen des fleurs sont mis entre lame et lamelle dans une goutte de carmin acétique. Ce dernier colore le pollen fertile en rose (structure normale) et le pollen non viable (considéré comme avorter car dépourvu du cytoplasme) reste transparent. Ce test est surtout utilisé pour observer la présence ou l'absence du pollen avorté, souvent plus petit et plus léger que le pollen normal.

L'observation a porté sur 200 grains de pollen par fleur. La viabilité pollinique est exprimée en pourcentage (V%) par le rapport du nombre de grains de pollen viables (NGPV) sur le nombre total de grains de pollen viables et non viables.

(NGPT) : $V\% = 100 \times (NGPV / NGPT)$.

2.4. Étude biochimique

2.4.1. Extraction de protéines

Les graines de cultivares de lentilles ont été broyées en une poudre fine. Pour effectuer l'analyse SDS-PAGE, 400 µL de tampon d'extraction de protéines (0,05 M Tris-HCl, pH 8, 0,02% de SDS, 30,3% d'urée et 1% de β-mercaptoéthanol) ont été ajoutés au tube Eppendorf après avoir placé 10 mg d'échantillon de graines. Les tubes ont été bien mélangés au vortex et centrifugés à 13 000 tr / min à température ambiante pendant 10 min. Les protéines brutes extraites ont ensuite été obtenues sous la forme d'un surnageant clair et stockées à -20 ° C.

2.4.2. Estimation des protéines

D'extraits a été mesurée immédiatement et directement à partir du surnageant par un test de liaison de colorant comme décrit par Bradford(1976). Une courbe standard d'absorbance à 595 nm versus 10 à 80 µg de BSA a également été dessinée et à partir de cette courbe, la quantité de protéine dans l'échantillon a été calculée et finalement exprimée en mg par g de graine. La répétition de la même expérience a été effectuée 3 fois afin de vérifier la reproductibilité de la méthode.

2.4.3. Technique de SDS – PAGE

Les échantillons de protéines sont soumis à SDS-PAGE unidimensionnel dans une plaque de gel de 1 mm d'épaisseur (4% de gel d'empilement = 2,5 cm de hauteur et 10% gel de résolution = 5,5 cm de hauteur). La taille totale du gel était de 8 à 7,3 cm. L'électrophorèse a été réalisée dans le tampon discontinu système dans un appareil d'électrophorèse vertical (Apelex) selon la méthode de (Laemmli, 1979).

Les échantillons de protéines ont été chargés dans chaque puits du gel par micro-pipette 25 µL. Dans un puits du même gel, poids moléculaire des protéines marqueur. L'échelle de protéines teintées Thermo Scientific™ PageRuler™ est ajouté dans l'échantillon de protéine comme colorant de suivi pour voir le mouvement de la protéine dans le gel. Le gel est exécuté en mode courant constant de 10 mA, puis, il est coloré pendant une nuit dans 0,025% de bleu brillant de Coomassie (CBB) R-250. Lavé soigneusement l'excès de SDS qui pourrait précipiter sur la surface une solution de coloration suffisante pour

couvrir le gel uniformément d'incubation pendant 16 heures pour tacher et rincer à l'eau. La décoloration dans de l'eau et de l'acide acétique à 5% pendant un jour ou deux jusqu'à ce que le fond du gel disparaisse, ce qui permet une meilleure résolution.

2.5. Étude moléculaire

2.5.1. Prélèvements

La présente expérience est réalisée au centre de recherche en biotechnologie CRBT. 12 cultivars de lentilles (*Lens culinaris* M.) sont plantés dans des pots. Après un mois de culture de l'espèce de *Lens culinaris*, Des échantillons de feuilles fraîches sont excisés à l'aide d'une lame stérile et immédiatement transférés dans une glacière, les conditions aseptiques maintenues. Les feuilles sont récoltées et stockées à -80°C en attendant leur utilisation ultérieure.

2.5.2. Extraction d'ADN génomique

Le protocole suivi pour extraire l'ADN de 12 cultivars de la lentille (ICARDA, 2014). Modifié par Gaad *et al.*, (2018). Un broyage de la feuille de lentille a été effectué à l'aide l'azote liquide permet l'écrasement totale de la feuille.

-Chauffer le tampon d'extraction (CTAB) dans le bain marie 30 min à 65°C

-Ajouter 1500 μL de CTAB a chaque échantillon est ajouté avec le broyat ce qui permet la lyse membranaire et la séparation des protéines des acides nucléiques et minimise l'activité de l'ADNase en augmentant le pH à 8. Le mélange est distribué dans des tubes de 2mL puis incubé à 65°C pendant 45- 60 min avec agitation toutes les 15 min. Ensuite, 500 μL du chloroforme/isoamyl alcool sont ajoutés au mélange CTAB/ broyat puis l'ensemble est agité vigoureusement pendant 15 min ensuite centrifuger les tube à une vitesse de 13000 rpm pendant 15 min à une température ambiante.

Après le surnageant (1ml) est récupéré, dans des tubes Eppendorf de 2mL, puis 666 μL de l'isopropanol sont ajoutés afin de permettre la précipitation d'ADN 30. Le mélange est incubé au moins 30 min à température ambiante puis centrifugé à 13000 rpm pendant 10 min à 4°C afin de récupérer le culot d'ADN. Pour laver le culot d'ADN, 1mL d'éthanol est ajouté dans chaque tube Le culot obtenu est lavé dans de l'éthanol 70 % pour éliminer toute trace d'isopropanol et de NaCl.

2.5.3. Quantification de l'ADN

- Ajouter 1 μL d'ARN ase aux échantillons, et incubé pendant 30 min à température ambiante.

- nettoyer des points de dépôt du nanodrope avec l'eau ultra-pure calibres la solution 0.5XTE (tampon d'extraction), puis déposer 1 μ L de chaque échantillon.
- utiliser le logiciel du nanodrope pour déterminer la quantité et la qualité de l'ADN.
- le surnageant est éliminé et le culot est séché sous vide à température ambiante puis dissout dans 100 μ L de 0.5X TE. « L'ADN stock » est conservé à 4°C.

2.5.4. Préparation du gel agarose pour tester L'ADN et les amorces

2.5.4.1. Préparation de gel d'agarose 1.5%

Pour préparer un gel d'agarose sur lequel vont migrer nos extraits d'ADN, une solution d'agarose est préparée selon la capacité de la cuve (50, 90,130, 300 ml). Le mélange sera fondu, refroidi puis coulé sur un porte gel.

Lorsque la solution atteint une température avoisinante 65°C, elle est coulée dans la cuve à électrophorèse. Un peigne est placé à l'extrémité de la cuve pour permettre la formation des puits dans lesquels sera déposée la solution d'ADN. Un temps de 30 minutes est nécessaire pour la polymérisation du gel. Mélanger 1 μ L de marqueur colore bleu de bromophinol avec 4 μ L du résultat PCR puis déposer les échantillons dans les puits de gel .ajouter 5 μ L de marqueur de poids moléculaire (50pb ladder).brancher la cuve a un générateur de tension (100v).environ 20-30 min de temps de migration.la lecture se fait dans le system d imagerie(GelDoc). Permet d'en déduire la quantité d'acides nucléiques déposée et d'estimer un facteur de dilution afin d'obtenir une concentration finale d'ADN de 20 ng/ μ L. En effet, à la suite de l'électrophorèse en gel d'agarose, une dilution est réalisée à partir de la solution « ADN stock ». La solution « ADN dilué » obtenue va servir pour réaliser une amplification en chaîne par polymérase (PCR). (Préparation de gel voir annexe).

2.5.4.2. Réaction de Polymérisation en Chaîne ou PCR

La réaction d'amplification est possible grâce à un mélange réactionnel de volume 10 μ l, contenant en plus de l'extrait d'ADN, des amorces complémentaires spécifiques, la Taq polymérase, les quatre désoxyribonucléotides triphosphates, une solution tampon (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂S₀₄, MgC₁₂ (15mM), (pH8.7) et l'eau pure, avec un volume d'ADN utiliser 1 μ l . La réaction se réalise dans un thermocycleur muni d'un écran tactile qui permet d'entrer le programme approprié à chaque amorce.

Tableau 03 : Composition du mélange réactionnel de l'amplification selon la technique master mixte.

SSR. Composantes	Volumes pour une seule réaction	Volumes pour 40 réactions
Eau distillé stérile	5.67µl	226.8 µl
tompon X10	1 µl	40 µl
dNTP mixés (2mM)	1 µl	40µl
Amorce (10pmol/µl)	1 µl	40 µl
Taq polymérase (5U/µl)	0.03 µl	1.2 µl
MgCl ₂	0.3 µl	12 µl
Total	9 µl	453,6 µl

Il faut noter qu'un risque d'erreur de 5% $((36 \times 5)/100) = 1.8$ est pris en compte lors du pipetage des volumes des différents composants. On aura alors $36 + 2,4 = 40$ au lieu de 36 réactions.

Le programme PCR consiste à la répétition de trois étapes successives, au temps et à température différents. Ces trois étapes qui constituent un cycle qui se répète trente fois sont la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

- La dénaturation de l'ADN nécessite une haute température de 95°C pour permettre aux deux brins de se séparer.
- L'hybridation spécifique des deux amorces sur leurs séquences complémentaires se fait à une température qui dépend du GC % de des amorces.
- L'élongation à une température de 72°C pendant 1 minute s'effectue par la Taq polymérase qui synthétise les brins d'ADN complémentaires en ajoutant des desoxynucléotides triphosphates aux extrémités 3'OH des amorces.

Programme PCR réalisé Pour l'amplification dans le cas d'amorce « SSR » :

- 95°C pour 5 minutes : dénaturation initiale
- 95°C pour 60 secondes : dénaturation
- 53°C ,50°C ,51°C 58°C ,56°C, 57°C, 49°C ou 55°C pour 60 secondes : hybridation pour 30 cycles
- 72°C pour 5 minutes : élongation finale

A la fin de la réaction, le produit amplifié peut être conservé pendant un certain temps dans le thermocycleur à 4°C avant de l'analyser par électrophorèse sur gel d'acrylamide.

Tableau 04 : Programme PCR réalisé Pour l’amplification dans le cas des amorce « SSR » :

Température °C	Temps (sec)	Répétitions
95°C	300	1X
95°C	60	30X
	60	
72°C	60	
72°C	300	1X
4°C	infini	

Tableau 05 : Caractéristiques des amorces étudiées et des microsatellites à amplifier. Aladdin Hamwiah *et al.*(2009).

N	SSR	Forward	Reverse	(Tm) used for PCR(°C)	Xpected size(pb)
1	SSR 19	GACTCATACTTGTCTTAGCAG	GAACGGAGCGGTCACATTAG	58	250-280
2	SSR 48	CATGGTGGAATAGTGATGGC	CTCCATACACCACTCATTCAC	57	165-200
3	SSR 199	GTGTGCATGGTGTGTG	CCATCCCCCTCTATC	51	182-250
4	SSR 317-1	GTGGGTGTAATTATTGCTAC	GTATCAAACCTTATGGTGAAATC	53	308
5	SSR 323	AGTGACAACAAAATGTGAGT	GTACCTAGTTTCATCATTG	51	250-300
6	SSR 212-1	GACTCATTGTTGTACCC	GCGAGAAGAATGGTTG	50	175-210
7	SSR 151	GGTAGGTGAGATAGTTG	GGAGCAAGAAGAAGCAG	51	160-200

2.5.5. Électrophorèse sur gel d’acrylamide

2.5.5.1. Préparation du gel

Pour préparer un gel d’acrylamide sur lequel vont migrer nos extraits d’ADN, Il faut préparer une solution d’acrylamide 40 %. Ce gel possède un pouvoir résolutif de 10 paires de bases. L’ADN peut être aussi séparé en utilisant l’électrophorèse sur gel d’agarose, mais cette dernière n’est pas adaptée à la séparation de petits fragments.

La solution mère d’acrylamide est utilisée pour préparer une solution finale concentrée à 6% pour les plaques des 24 puits. Deux plaques en verre sont superposées et maintenues par des pinces puis séparées par deux séparateurs placés sur les bordures verticales. La solution de gel est versée entre ces deux plaques à un rythme lent et uniforme pour éviter la formation de bulles d’air. Ces dernières constituent un frein lors de la migration de l’ADN et leur présence en grand nombre rend le gel inutilisable. Pour éliminer les bulles une seringue peut être utilisée, l’idée est d’attirer les bulles vers l’extrémité des plaques de verre. Un peigne est introduit à l’extrémité des plaques et permet la formation des puits. La polymérisation du gel dure environ une heure. Une fois qu’il est solidifié, les plaques sont déposées sur un portoir. (Préparation de gel voir annexe)

2.5.5.2. Révélation du gel

Après la migration qui se fait à 300 volts, le gel sera fixé, coloré et développé dans des solutions de fixe stop 6 min, coloration 3 ml formaldéhyde 7 min, rinçage quelque seconde et développement 4 ml formaldéhyde (annexe). La taille des fragments d'ADN sera estimée à l'aide du marqueur moléculaire pic 19.

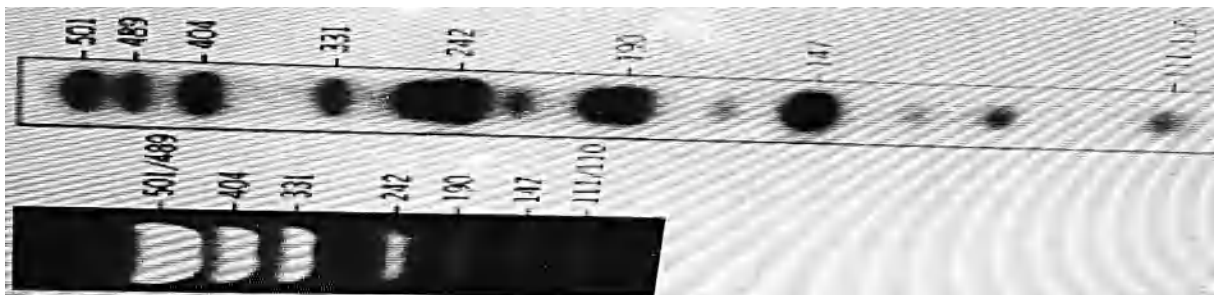


Figure 21 : Marqueur de poids moléculaire (pic19) pris comme référence pour la quantification d'ADN.

2.5.5.3. Dépôt des échantillons et migration

Un volume de 10 µl du produit d'amplification est mélangé avec 5 µl de bleu d'acrylamide. Un volume de 5 µl du mélange est ensuite déposé dans les puits du gel. Le premier puits est réservé au marqueur de taille est le voltage de migration de 300V. Après la migration, le gel est récupéré et exposé aux UV afin de visualiser les bandes d'ADN.

2.6. Analyse statistique des résultats

Les analyses statistiques sont traitées en fonction de chaque type d'étude

2.6.1. Résultats agro-morphologiques

Pour les données agro-morphologiques le logiciel XLSTAT version 2014 a été utilisé pour statistique analyse comme l'analyse de variance à un facteur (ANOVA). Principal analyse de composants (PCA) et cluster hiérarchique analyse (CHA) (Eriksson *et al.*, 1999).

2.6.2. Résultats cytogénétiques

Pour les données cytogénétiques, on a utilise :

-Les chromosomes sont ensuite dénombrés, mesurés, appariés et alignés de la plus grande paire à la plus petite (Levan *et al.*, 1964).

Les idiogrammes sont construits d'après les mesures suivantes :

- Longueurs des bras courts (BC) et des bras longs (BL)
- Longueur totale de chaque chromosome $LT = BC + BL$

- Valeur moyenne des rapports bras longs / bras courts $R = BL / BC$
- Indice centromérique pour chaque paire chromosomique $Ic \% = (BC / BL) \times 100$
- Indice d'asymétrie du caryotype $Ias = (\frac{BL}{LT} \times 100) / \frac{BL}{LT}$

Toutes les mesures sont résumées dans le tableau 5.

Tableau 06 : Nomenclature chromosomique proposée par Levan et *al.* (1964)

Position du centromère	D	R	Ic	Type chromosomique
Position médiane	00.0	1.0	50.0	Métacentrique <i>s.s.</i> (M)
Région médiane	00.0-02.5	1.0-1.7	50.0-37.5	Métacentrique (m)
Région submédiane	02.5-05.0	1.7-3.0	37.5-25.0	Submétacentrique (sm)
Région subterminale	05.0-07.0	3.0-7.0	25.0-12.5	Subtélocentrique (st)
Région terminale	07.0-10.0	7.0-∞	12.5-00.0	Acrocentrique (t)
Position terminale	10.0	∞	00.0	Télocentrique (T)

D : bras long (BL) – bras court (BC) ; **R** : bras long (BL)/ bras court (BC) **Ic** : indice centromérique (bras court/ longueur total du chromosome x100) **M** : métacentrique ; **m** : métacentrique sensu largo, **sm** : Submétacentrique, **st** : subtélocentrique, **t** : acrocentrique, **T** : télocentrique, **s.s.**: sensu stricto.

-La détermination des caractères morphologiques des grains de pollen a été faite suivant à la technique d'acétolyse d'Erdtman (1952) modifiée par Siljak-Yakovlev (1986). Les mesures sont effectuées sur un échantillon de 50 grains de pollen .

Tableau 07 : Les formes de pollen selon le rapport P/E (Erdtman, 1952).

Formes de pollen	P/E X 100
PROBLATE	<50
OBLATE	50-75
SUBSPHEROIDAL	75-133
SUBOBLATA	75-88
OBLATE SPHEROIDAL	88-100
PROLATE SPHEROIDAL	100-114
SUBPROLATE	114-133
PROLATE	133-200
PERPROLATE	>200

2.6.3. Résultats biochimiques

Les gels ont été photographiés et scannés à l'aide de Bio-Rad, Système Gel-DocTM XR + fabriqué aux États-Unis. L'analyse détaillée des protéines a été faite par le logiciel Image LabTM (version 5.0). La matrice de similarité ainsi générée a été utilisée pour construire le dendrogramme en utilisant XLATAT version 2014.

2.6.4. Résultats moléculaires

1. Distance génétique

La distance génétique entre les différents génotypes de lentille a été déterminée par le Logiciel Power Marker v3.25. Il s'agit d'un ensemble complet de méthodes statistiques pour l'analyse de différentes données génétiques de marquage, spécialement conçu pour les SSR .

2. Dendrogramme

NTSYSpc version 2.11T a été utilisé pour construire un arbre «dendrogramme » phylogénétique à partir des distances génétiques calculées à partir des données initiales. Ce logiciel permet de classer les accessions selon la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Using Method Average) (Benzecri., 1973), à partir de la matrice de distances génétiques.

A decorative border resembling a scroll, with a vertical strip on the left and rounded corners on the right, framing the chapter title.

Chapitre III

Résultats et Discussion

3.1. Analyse agro-morphologique

3.1.1. Les paramètres morphologiques

Dans un premier temps, on a mesuré ensemble la hauteur de la plante (HP) à différentes phases (1 mois, 2 mois et à la maturité) (Figure 22).

3.1.1.1. Hauteur de la plante (HP)

D'après la figure (22), les résultats obtenus pour la hauteur de la plante (HP) varient entre 4.93 et 7.36 cm au stade du 1^{er} mois, le cultivare **Idlep2** présente la hauteur maximale et le cultivare **Idlep3** présente la hauteur minimale, le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre (5.96 à 7.1 cm).

Au stade du 2^{ème} mois, les résultats obtenus varient entre 15.16 et 24 cm, le cultivare **Ibla** présente la hauteur maximale et le cultivare **Nil45** présente la hauteur minimale, le reste des cultivares présentent des valeurs intermédiaires pour ce paramètre (23.16 à 17.83 cm).

À la phase de maturité, les résultats obtenus varient entre 23.66 et 33.83 cm, le cultivare **Ibla** présente la hauteur maximale et le cultivare **Nil45** présente la hauteur minimale, le reste des cultivares présentent des valeurs intermédiaires pour ce paramètre (25.33 à 33.66 cm).

L'analyse de la variance de hauteur de plante (HP) (Annexe) a révélé des différences significatives au 1^{er} mois et hautement significatives au 2^{ème} mois et à la phase de maturité entre les différents géotypes étudiés ce qui implique une hétérogénéité importante de ce caractère entre les différents cultivares (** F = 3.115 à $\alpha = 0, 01$). (***) F = 5.951 à $\alpha = 0, 001$). (***) F = 12.717 à $\alpha = 0, 001$) en respectivement.

3.1.1.2. Surface foliaire (SF)

La figure (23) montre que les valeurs enregistrées de surface foliaire pour les cultivares varient entre 4.99 et 8,15 cm², le cultivare **Redjes** présente la surface foliaire maximale (8,15 cm²) et le cultivare **Idlep3** présente la surface foliaire minimale (4.99 cm²) le reste des cultivares présentent des valeurs intermédiaires pour ce paramètre (5.65 à 7.75 cm²).

L'analyse de variance de surface foliaire (SF) (Annexe 1) a révélé une différence significative élevée entre les cultivares étudiés pour ce caractère (** F = 3.602 à $\alpha = 0, 01$).

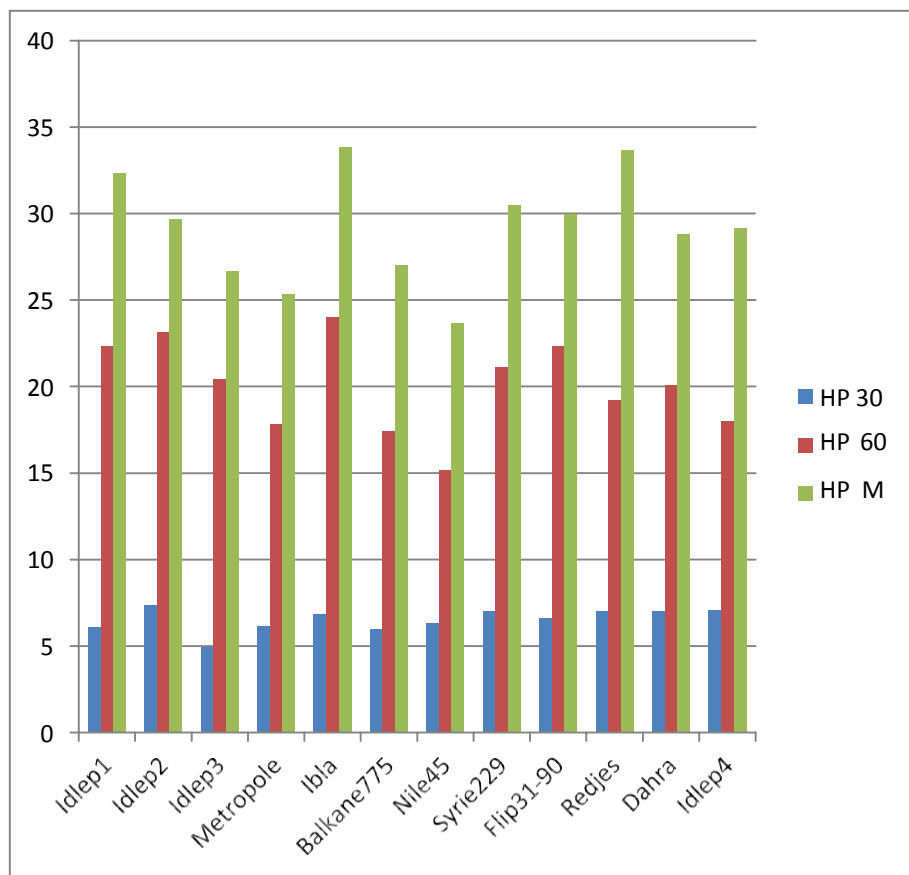


Figure 22 : Hauteur de la plante de lentille (30 jour, 60 jour, à la maturité) .

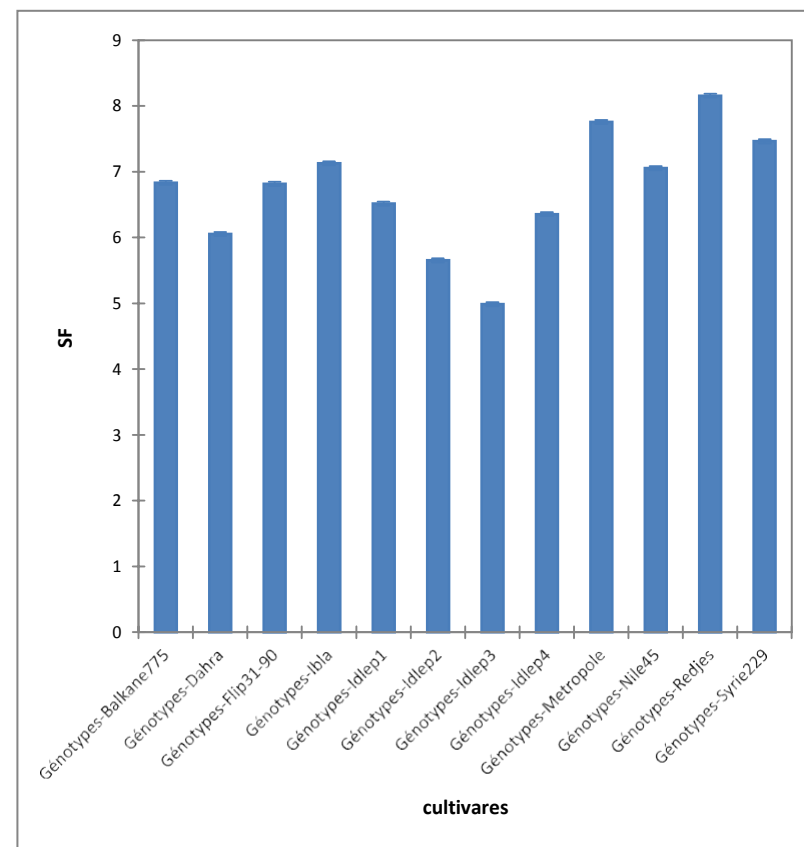


Figure 23 : Surface foliaire des génotypes étudiés.

3.1.1.3. Nombre des branches primaires/ plante(NBrP)

La figure(24) montre les données du paramètre nombre des branches primaires/ plante qui variaient entre 1 et 2.33 branche/plante, le cultivare **Ibla** présente le nombre de branche maximale (2.33 branche/ plant) et les cultivares **Idlep1**, **Idlep2** présentent le nombre minimum de branches primaires (1 branches/ plant), le reste des cultivares présentent des valeurs intermédiaires pour ce paramètre (1.33 à 2 branches/ plant).

Les données d'analyse de variance ne montrent aucunes différences significatives entre les cultivares étudiés pour ce paramètre au seuil 5%(Annexe).

3.1.1.4. Nombre de branches secondaires/ plante(NBrS)

Selon la figure(24) les données de ce paramètre variaient entre 1.66 et 3.66 branches. Le plus grand nombre de branches secondaire est observé pour les cultivares **Flip90-31** et **Idlep3** (3.66 branches /plante), tandis que le nombre minimal des branches secondaire est enregistré pour les cultivares **Idlep2** (1.66 branches /plante), le reste des cultivares présentent des valeurs intermédiaires pour ce paramètre (2.33 à 3.33 branches /plante).

Les données d'analyse de variance ne montrent aucunes différences significatives entre les cultivares étudiés pour ce paramètre au seuil 5%(Annexe).

3.1.1.5. Nombre de folioles/ Feuille (Nfo/F)

Les données sur les folioles /feuille sont présentées dans la Figure (25), ces données allaient de 12,33 à 16,66. Le plus grand nombre de folioles/feuille est observé pour le cultivare **Idlep1**(16,66 folioles/feuille) , tandis que le nombre minimal des folioles/feuille a été enregistré pour les cultivares **Flip90-31** (12 folioles/feuille). Le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre (13.33 à 16 folioles /feuille).

L'analyse de variance de folioles /feuille a révélée une différence hautement significative entre les cultivares étudié pour ce caractère ($\alpha = 0,001$ à *** F = 6.532).

3.1.2. Paramètres agronomiques

3.1.2.1. Nombre de jours jusqu'à floraison(NJF)

D'après la figure(26) les données sont de l'ordre 71.33 à 75.33 jours. Le plus grand nombre de jours sont pris par le cultivare **Métropole** (75.33 jours) qui considéré comme cultivare tardive, tandis que les jours minimums sont pris par **Idlep3** (71.33 jours) qui est marqué comme cultivare précoce, le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

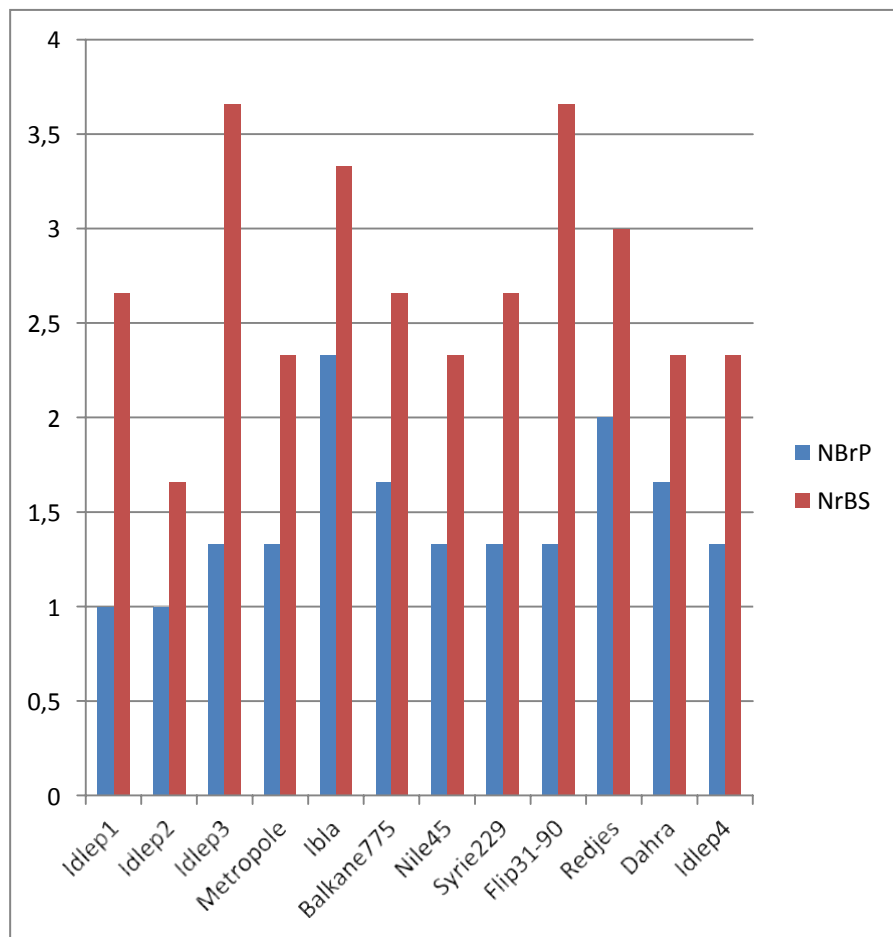


Figure 24: Nombre des branches (primaires, secondaire).

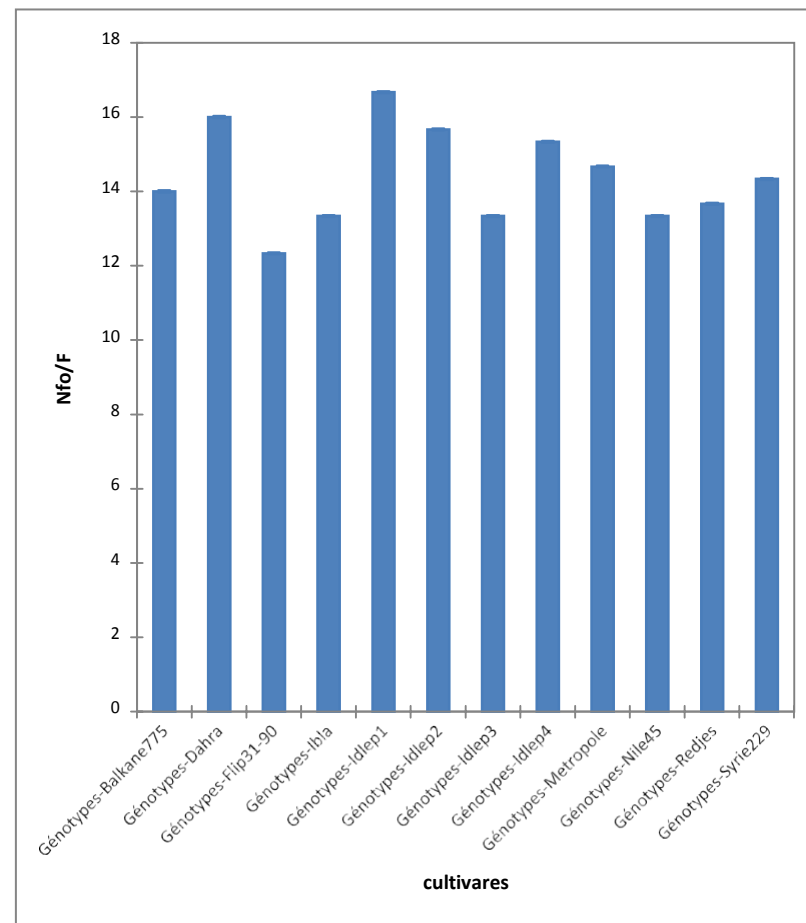


Figure 25: Nombre des folioles par feuille.

L'analyse de variance de jours jusqu'à floraison a révélée une différence hautement significatives entre les cultivares étudié pour ce caractère (***) $F = 16.923$ à $\alpha = 0,001$ (annexe).

3.1.2.2. Nombre de jours à maturité(NJM)

D'après la figure(27) les données sont de l'ordre de 97.33 à 116.33 jours, le plus grand nombre des jours sont pris par le cultivare **Métropole** (116.33 jours), tandis que les jours minimums sont pris par le cultivare **Idlep3** (97.33 jours), le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

L'analyse de variance de jours jusqu'à maturité a révélée une différence hautement significatives entre les cultivares étudié pour ce caractère (***) $F = 335.659$ à $\alpha = 0,001$ (annexe1).

3.1.2.3. Nombre de gousses /plante (Ngo/P)

La figure (28) montre les donnés de paramètre nombre de gousses /plante (Ngo/P) qui est de l'ordre de 25 à 37.33 gousses /plante. Le nombre maximum de gousses par plante est enregistré par le cultivare **Idlep3** (37.33 gousses /plante), et le nombre le plus bas des gousse/plante est enregistré par le cultivare **Nile45** (25 gousses /plante), le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

L'analyse de variance de nombre des gousse/plante a révélée une différence hautement significatives entre les cultivares étudié pour ce caractère (***) $F = 5.426$ à $\alpha = 0,001$ (annexe).

3.1.2.4. Nombre de graines /plante(NG/P)

La figure (29) montre les donnés de paramètre nombre de graines /plante(NG/P)qui est de l'ordre de 16.66 à 41.66 graines /plante. Le nombre maximum de graines par plante est enregistré par le cultivare **Idlep3** (41.66 graines /plante), et le nombre le plus bas de nombre graines/plante est enregistré par le cultivare **Métropole** (16.66 graines /plante), le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

L'analyse de variance de nombre des graines/plante a révélée une différence hautement significatives entre les cultivares étudié pour ce caractère (***) $F = 14.983$ à $\alpha = 0,001$. (Annexe).

3.1.2.5. poids de 1000 graines (PMG)

La figure (30) montre les donnés de paramètre pois de mille graines (PMG) qui est de l'ordre de 37.32 à 75.16 g. Le nombre maximum de pois de mille graines est enregistré par le cultivare **Nile45** (75.16 g) qui démontre la grande taille des graines, tandis que la valeur le plus faible est enregistré par le cultivare **Idlep3** (37.32 g) qui comportant des graines de

petites tailles, le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

L'analyse de variance de pois de mille graines a révélée une différence hautement significatives entre les cultivares étudié pour ce caractère (**F = 378.654 à $\alpha = 0,001$) (Annexe).

3.1.2.6. Rendement biologique/plante (RBIO/P)

La figure (31) montre les données de paramètre rendement biologique/plante (RBIO/P) qui est de l'ordre de 2.76 à 3.89 g. Le nombre maximum de rendement biologique/plante est enregistré par le cultivare **Flip90-31** (3.89 g), tandis que la valeur le plus faible de pois de mille graines est enregistré par le cultivare **Idlep4** (2.76 g), le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

L'analyse de variance de rendement biologique/plante (RBIO/P) a révélée une différence hautement significatives entre les cultivares étudié pour ce caractère (**F = 12.342 à $\alpha = 0,001$) (Annexe).

3.1.2.7. Indice de récolte(IR)

La figure (32) montre les données de paramètre indice de récolte(IR) qui est de l'ordre de 46.11 à 59.21 %. Le nombre maximum de l'indice de récolte est enregistré par le cultivare **Métropole** (59.21 %), tandis que la valeur le plus faible de l'indice de récolte est enregistrée par le cultivare **Idlep3** (46.11 %), le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

L'analyse de variance de l'indice de récolte a révélée une différence significatives élevée entre les cultivares étudié pour ce caractère (**F = 4.177 à $\alpha = 0,01$) (Annexe).

3.1.2.8. Poids des graine/plante (PG)

La figure (33) montre les données de paramètre pois des graine/plante (PG) qui est de l'ordre de 1.6 à 1.94g. Le nombre maximum de pois des graine/plante est enregistré par le cultivare **Flip90-31** (1.94g), tandis que la valeur le plus faible de pois des graine/plante est enregistrée par le cultivare **Idlep4** (1.6g), le reste des cultivares présentent des valeurs moyennes pour ce paramètre.

L'analyse de variance de pois des graine/plante a révélée une différence significatives élevée entre les cultivares étudié pour ce caractère (**F = 3.025 à $\alpha = 0,01$). (Annexe).

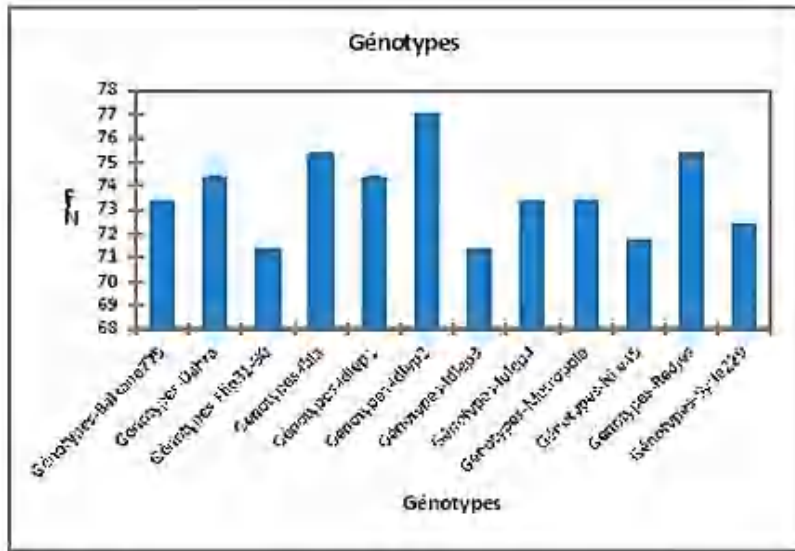


Figure26 . Jours jusqu'à floraison des géotypes de lentille.

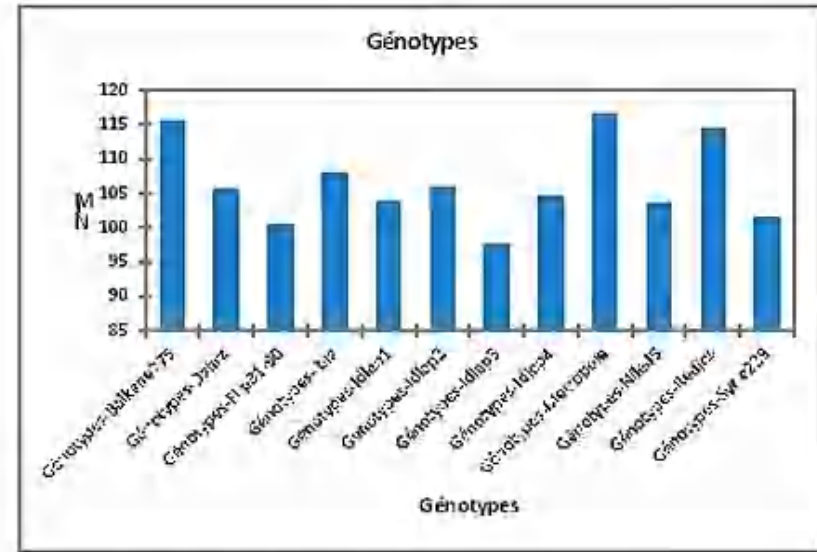


Figure27 Nombre des jours jusqu'à maturité.

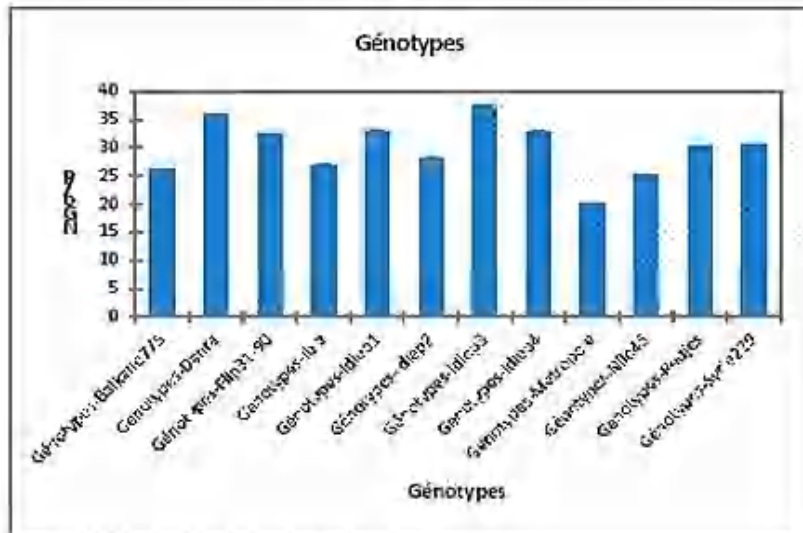


Figure28 .Nombre des gousses / plante.

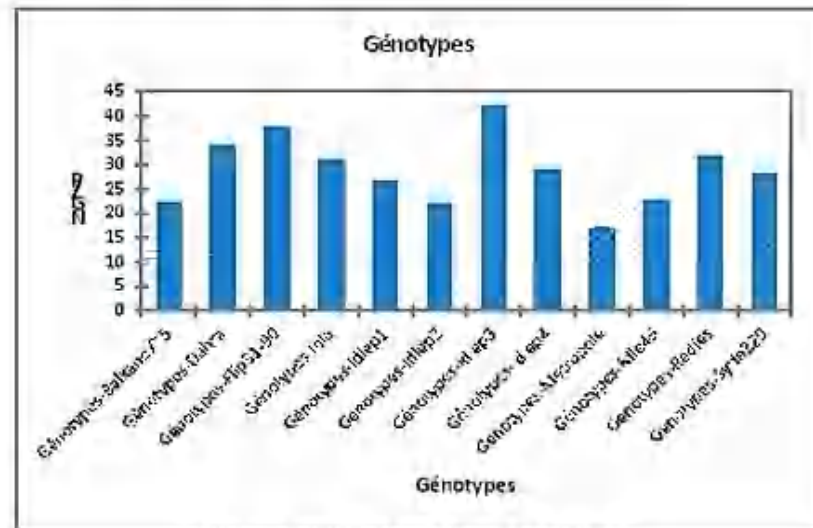


Figure29. Nombre des graines / plante.

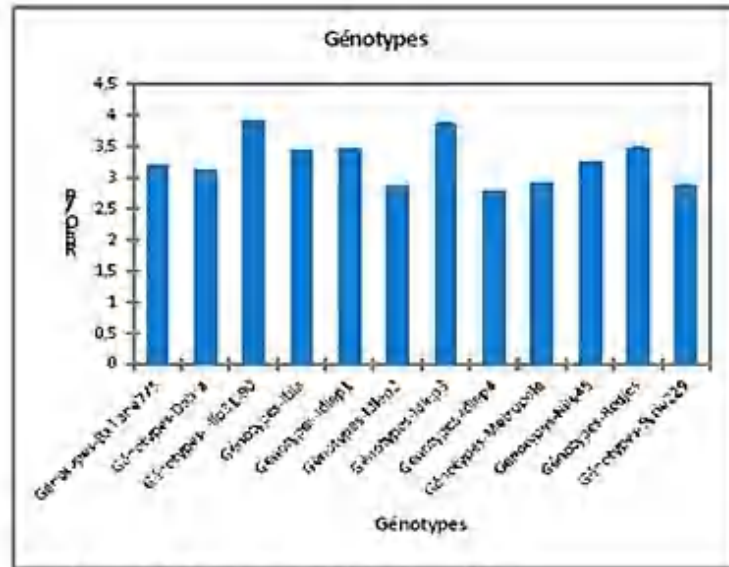


Figure 31 Rendement biologique /plante.

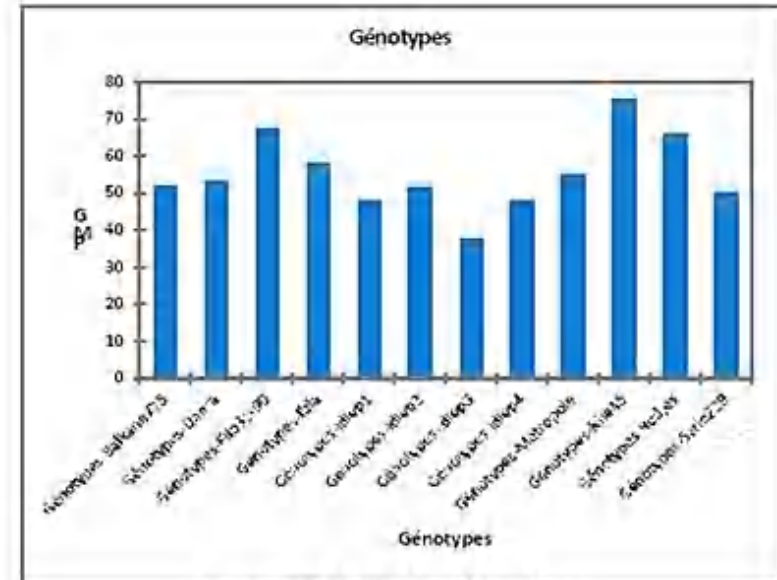


Figure 30 Poids de 1000 grains

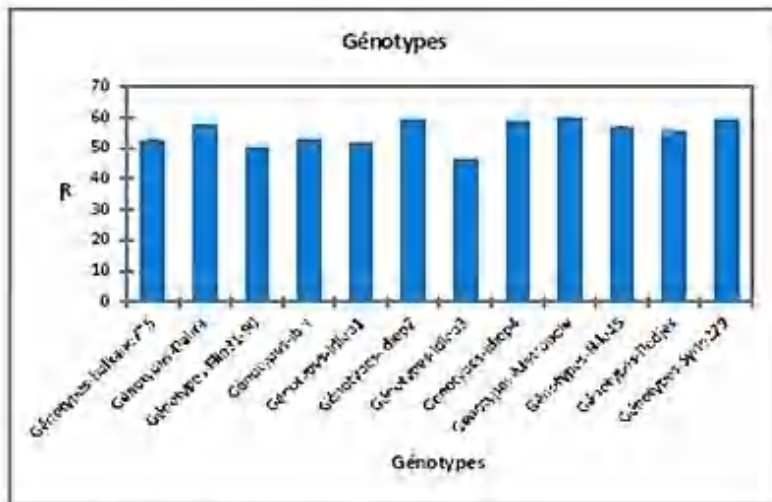


Figure 33. Poids des graines /plante.

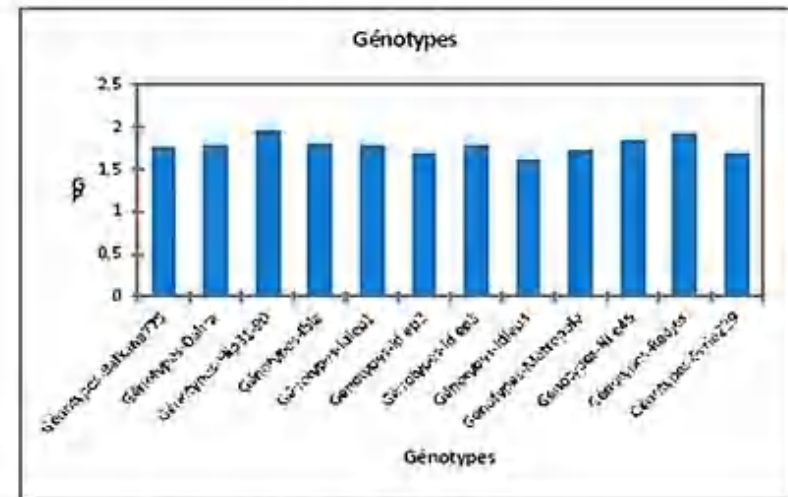


Figure 32. L'indice de récolte.

A partir des résultats obtenus, lors de l'analyse de variance au seuil de 5%, on a remarquée qu'il existe de fortes différences significatives entre les cultivares pour tous les caractères sauf chez le nombre de branche primaire et secondaire, ce qui indique une présence de variabilité assez importante entre les différents cultivares (l'existence d'une variabilité inter-génotypique).

3.1.3. Analyse de la variabilité morphologique

L'analyse en Composantes Principales (ACP) ont été analysés pour 12 cultivares en termes de 15 paramètres qui ont été utilisées au cours de cette étude. Cette analyse a mis en évidence que les axes les plus informatifs sont l'axe 1 et 2 avec 36.87 et %21.93% respectivement, soit un total de 58.80%. C'est une proportion suffisante pour montrer la diversité.

Tableau 8. Les axes (F1 et F2).

F	F1	F2
Valeur propre	5.58	3.28
Variabilité (%)	36.87%	21.93%
Total (%)	58.80%	

3.1.3. 1. Matrice de corrélation

A travers cette analyse on a estimé les niveaux des corrélations entre les différents paramètres mesurés. L'analyse montre l'existence des liaisons positives et négatives variant entre faible à forte corrélation (tableau 10). Ainsi, il apparaît que la hauteur de la plante au 30 jour (HP30) est positivement corrélée avec les jours jusqu'à la floraison (NJF) ($r = 0.51$) et l'indice de récolte (IR) ($r = 0.70$), tandis que la hauteur de la plante au 60 jour (HP60) est fortement et positivement corrélée à la hauteur de la plante à maturité (HPM) ($r = 0.72$). Le nombre de branches secondaires (NBrS) est positivement corrélé au nombre de grains/plante (NG/P) ($r = 0.74$), rendement biologique de plante (RBIO/P) ($r = 0.83$) et poids des graines/plante (PG) ($r = 0.65$). La surface foliaire (SF) est positivement corrélée au jour à maturité (NJM) ($r = 0.60$) et poids de 1000 grains (PMG) ($r = 0.59$). Le nombre de gousses/plante (Ng o / P) est fortement et positivement corrélé avec le nombre de grains/plante (NG/P) ($r = 0.78$). Le nombre de grains/plante est positivement corrélé au rendement biologique de plante (RBIO/P) ($r = 0.58$).

Le rendement biologique de graine (RBIO/P) est f o r t e m e n t e t positivement corrélé avec le pois des graines/plante(PG)($r=0.82$). En revanche, des coefficients de corrélation négatifs ont été enregistrés entre :

le nombre de branche secondaire est négativement corrélée avec le nombre des folioles /feuille (NFo/F) ($r=-0.69$) et l'indice de récolte(IR) ($r=-0.82$). Le nombre de folioles/feuille (NFo/F) est négativement corrélée avec le pois des graine/plante ($r=-0.61$).

la surface foliaire (SF) est négativement corrélée avec le nombre de gousses/plante (Ngo/P)($r=-0.61$).le nombre des jour jusqu'à maturité(NJM) est négativement corrélée avec le nombre de gousses/plante (Ngo/P)($r=-0.68$) et le nombre de graines/plante(NG/P) ($r=-0.61$).Le nombre des graines/plante(NG/P) est négativement corrélée avec l'indice de récolte (IR) ($r=-0.66$).Le rendement biologique de graine(RBIO/P) est f o r t e m e n t e t négativement corrélé avec l'indice de récolte (IR) ($r=-0.82$).

3.1.3.2. Études des variables

Selon le Tableau (9) et Figure (34), l'axe 1 du coté positif est formé principalement par les variables suivantes :

Nombre des branches secondaire(NBrS), nombre de graine/plante(NG/P), rendement biologique /plante(RBIO/P) , hauteur de plante a maturité(HPM), alors que les variables hauteur de plante au 30 jour après semi(HP30), nombre des jour jusqu'a floraison(NJF) et l'indice de récolte (IR) déterminent le coté négatif du même axe. Les variables surface foliaire(SF) et pois de 1000 graine(PMG) , le pois des grains/plante(PG) , nombre de branches primaire(NBrP) et nombre des jour jusqu'a maturité (NJM) déterminent l'axe 2 du coté positif , alors que les variable nombre des folioles/feuille(NFo/F), hauteur de plante au 60 jour après semi(HP60) , nombre de gousses/plante (Ngo/P) du coté négatif du même axe.

L'analyse a montré que le premier axe est principalement caractérisé par des paramètres morphologiques et des composantes de rendement.

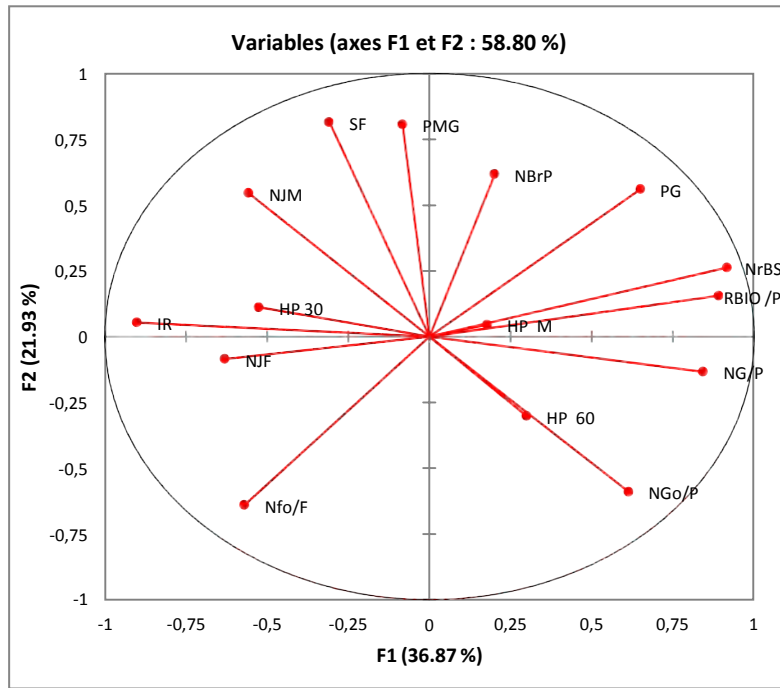


Figure 34 : Cercle de corrélation des variables issues de l'analyse des 12 cultivares.

Tableau 9 : L'efficacité des variables sur les deux principaux axes.

	F1	F2
HP 30	-0.223	0.061
HP 60	0.127	-0.167
HP M	0.076	0.025
NBrP	0.086	0.340
NrBS	0.390	0.144
Nfo/F	-0.242	-0.353
SF	-0.131	0.449
NJF	-0.268	-0.047
NJM	-0.237	0.301
NGo/P	0.261	-0.325
NG/P	0.359	-0.074
PMG	-0.035	0.445
RBIO /P	0.379	0.085
IR	-0.383	0.029
PG	0.277	0.309

Tableau 10: Matrice de corrélation.

Variables	HP 30	HP 60	HP M	NBrP	NrBS	Nfo/F	SF	NJF	NJM	NGo/P	NG/P	PMG	RBIO /P	IR	PG
HP 30	1	0.239	0.471	0.162	-0.477	0.266	0.319	0.513	0.151	-0.108	-0.222	0.330	-0.462	0.708	-0.220
HP 60	0.239	1	0.723	0.061	0.279	0.109	-0.248	0.266	-0.331	0.332	0.282	-0.290	0.325	-0.271	0.081
HP M	0.471	0.723	1	0.411	0.270	0.122	0.218	0.286	0.016	0.286	0.299	-0.057	0.214	-0.119	0.162
NBrP	0.162	0.061	0.411	1	0.400	-0.416	0.420	-0.084	0.406	-0.122	0.298	0.273	0.143	-0.120	0.329
NrBS	-0.477	0.279	0.270	0.400	1	-0.690	0.014	-0.589	-0.297	0.368	0.748	0.002	0.834	-0.824	0.654
Nfo/F	0.266	0.109	0.122	-0.416	-0.690	1	-0.255	0.578	0.079	0.146	-0.387	-0.470	-0.521	0.430	-0.614
SF	0.319	-0.248	0.218	0.420	0.014	-0.255	1	0.074	0.607	-0.612	-0.327	0.597	-0.167	0.371	0.203
NJF	0.513	0.266	0.286	-0.084	-0.589	0.578	0.074	1	0.513	-0.257	-0.527	-0.023	-0.375	0.493	-0.216
NJM	0.151	-0.331	0.016	0.406	-0.297	0.079	0.607	0.513	1	-0.685	-0.480	0.217	-0.441	0.357	-0.066
NGo/P	-0.108	0.332	0.286	-0.122	0.368	0.146	-0.612	-0.257	-0.685	1	0.786	-0.442	0.449	-0.454	0.157
NG/P	-0.222	0.282	0.299	0.298	0.748	-0.387	-0.327	-0.527	-0.480	0.786	1	-0.231	0.587	-0.664	0.427
PMG	0.330	-0.290	-0.057	0.273	0.002	-0.470	0.597	-0.023	0.217	-0.442	-0.231	1	0.153	0.203	0.573
RBIO /P	-0.462	0.325	0.214	0.143	0.834	-0.521	-0.167	-0.375	-0.441	0.449	0.587	0.153	1	-0.824	0.825
IR	0.708	-0.271	-0.119	-0.120	-0.824	0.430	0.371	0.493	0.357	-0.454	-0.664	0.203	-0.824	1	-0.564
PG	-0.220	0.081	0.162	0.329	0.654	-0.614	0.203	-0.216	-0.066	0.157	0.427	0.573	0.825	-0.564	1

3.1.3.3. Étude des individus

Tableau 11, Figures 35,36 présentent la dispersion graphique des individus sur la base de l'analyse en composantes principales(ACP). Cette dispersion nous a permis de répartir les différents génotypes en plusieurs groupes distincts.

- du côté positif de l'axe 1 se trouve les cultivares suivants : Idlep3 et Flip90-31 se distinguent par un nombre de gousses/plante(Ngo/P), nombre de graine/plante(NG/P), rendement biologique /plante(RBIO/P) plus élevés.

Alors que les cultivares Idlep2, Métropole et Syrie229 sont situent du côté négatif de l'axe 1 se traduisent par de faibles valeurs des paramètres précédents, tendus que les variables nombre des jours jusqu'à maturité (NJM) et l'indice de récolte (IR) plus élevés.

Sur l'axe 2 du côté positif se trouvent les cultivares suivants : Balkane755 ,Redjes ,Ibla et Nile45 qui se caractérisent par une grande surface foliaire(SF) un hauteur de plante au 30 jour après semi(HP30), hauteur de plante au 60 jour après semi(HP60) , hauteur de plante a maturité(HPM), nombre de branches primaire(NBrP) et nombre des jour jusqu'a floraison(NJF) élevés et pois de 1000 graine(PMG),du côté négatif de ce même axe se trouvent les cultivares Idlep1,Dahra et Idlep4 qui se distinguent par les variable nombre des folioles/feuille(NFo/F)élevés.

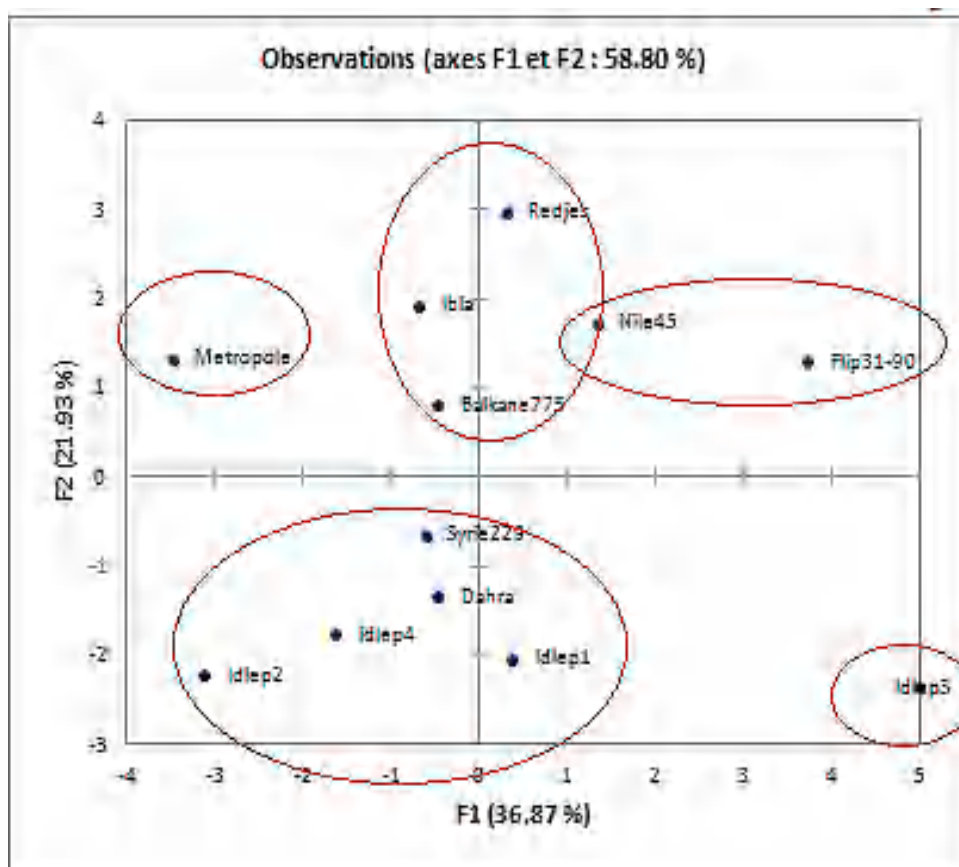


Figure 35: Représentation graphique de la répartition des individus eux deux niveaux.

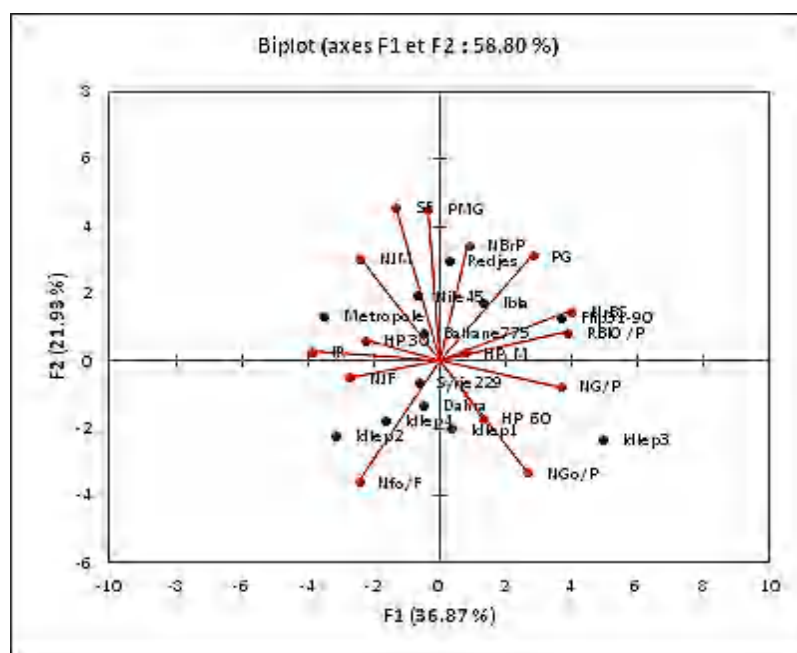


Figure 36 : Une représentation conjointe des individus étudiés et des métriques eux deux niveaux.

Les résultats obtenus à partir de l'analyse des composés typique ont montré plusieurs corrélations significatives entre les paramètres étudiées ont également montré une diversité importante parmi les 12 individus, car il a été constaté qu'il existe cinq groupes caractérisés par des paramètres morphologie et les composantes du rendement, ce qui montre l'existence d'une différence de comportement des paramétrés entre les cultivares.

3.1.3.4. Classification hiérarchique des paramètres agro-morphologiques.

La classification hiérarchique des caractères agro-morphologique (Figure 37), repartit les différents cultivares en deux grands groupes distincts de similarité équivalente de 96% qui subdivises en cin groupes .

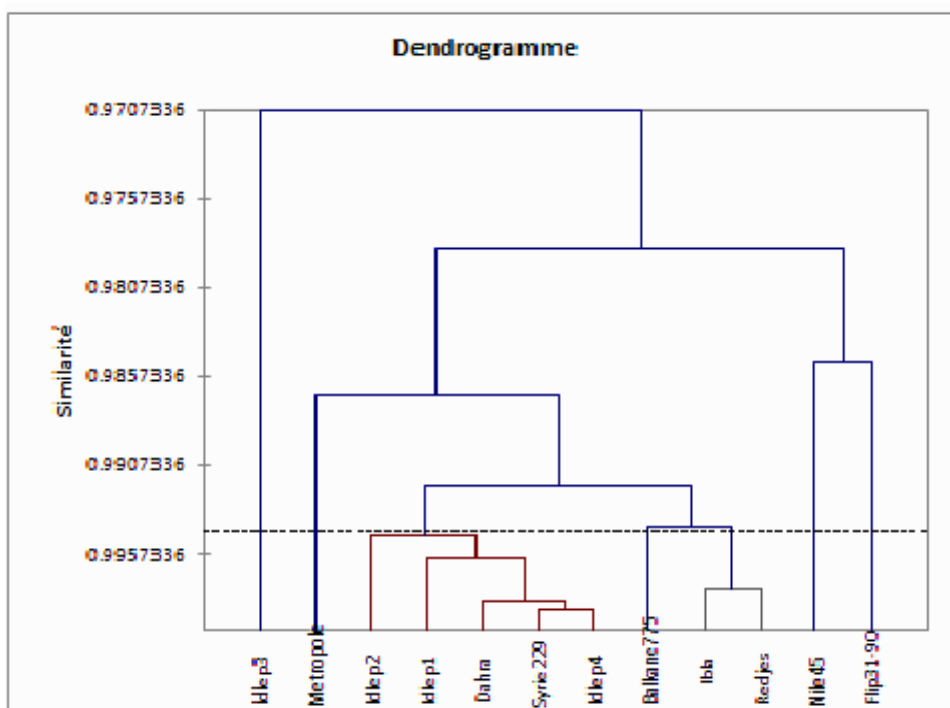


Figure 37 : Dendrogramme des paramètres agro-morphologiques de 12 cultivares.

-Le premier groupe : Il est composé de 1 individus Idlep3 de type *Macrosperma* caractérisé par les paramètres suivantes : nombre de gousses/plante(Ngo/P), nombre de graine/plante(NG/P), rendement biologique /plante(RBIO/P) et nombre de branches primaire(NBrs) plus élevés et se caractérisé par de floraison et maturité précoce .

-Le deuxième groupe : Il est constitué de 1 individu Métropole type *Macrosperma* caractérisé par les variables nombre des jours jusqu'à maturité (NJM), nombre des jour jusqu' a floraison (floraison et maturité tardive) et l'indice de récolte (IR) plus élevés, et surface foliaire(SF) élevés.

-Le troisième groupe Il est composé par les individus Idlep2 et Idlep1,Dahra, Syrie229 et Idlep4 type *Microsperma* qui se caractérisent, nombre des folioles/feuille(NFo/F) élevés et faible pois de 1000 graines (PMG).

-Le Quatrième groupe : Il est constitué des individus Balkane755, Ibla et Redjes de type *Macrosperma* qui se distinguent par une grande surface foliaire(SF) élevé, nombre de branches primaire(NBrP) élevée et par de floraison et maturité tardive.

-Le cinquième groupe : Il comporte les individus Flip90-31 et Nile45 de type *Macrosperma* qui se caractérisent par un hauteur de plante au 30 jour après semi(HP30), hauteur de plante au 60 jour après semi(HP60) , hauteur de plante a maturité(HPM), nombre de branches primaire(NBrP) élevées .

Discussion

D'après les analyses de variance, tous les paramètres ont révélés une variation significative entre les cultivares, à l'exception du nombre de branches primaire et secondaire. Nos résultats sont en accord avec ceux des auteurs (Omar Idrissi, 2012, Mondal *et al.* 2013, Salem *et al.*, 2014) qui n'ont pas trouvé aucune différence significative pour la production des branches.

Nos résultats concernant la variabilité morphologique sont en accord avec ceux des auteurs (Bacchi *et al.* 2010 ,Kumar *et al.* 2014).

Les résultats obtenus ont montré une corrélation positive entre la hauteur de la plante et les composantes du rendement. Les cultivares Idlep1,Ibla et Redjes sont caractérisent par des valeurs élevées pour la hauteur des plantes, il a également donné des valeurs élevées pour le rendement biologique /plante. Tandis que le cultivare Métropole caractérisé par des valeurs faibles pour la hauteur des plantes et peu de valeur pour le rendement biologique/plante par contre les cultivares Idlep3 et Balkane755 sont enregistrés des valeurs faibles pour la hauteur des plantes et rendement biologique de plante élevé.

Une corrélation positive entre hauteur de plante et rendement biologique a été prouvée par plusieurs auteurs(Tullu *et al.*, 2001, Mondal *et al.* 2013,Maria D *et al.*,2014 , Mekonnen *et al.* 2014, ,Gaad 2018), avec des différences qui sont due à des variations dans le matériel génétique et facteurs climatiques.

la hauteur de la plante, le rendement biologique par plante, le rendement en graines par plante ont de fortes corrélations positives les uns avec les autres comme indiqué les auteur suivantes (Azizi-Chakherchaman *et al.*, 2009 , Al-Ghazawi *et al.*, 2011).

Ces résultats indiquent que la production de branches primaires est plus importante que la hauteur de la plante pour obtenir un rendement en graines plus élevé chez les lentilles. Si nous confrontons nos résultats à ceux des auteurs (Yadav *et al.*, 2003 ; Anzam *et al.*, 2005; Karadavut, 2009 ; Mondol *et al.*, 2013, Soyema *al.*, 2016) . qui ont signalé que le rendement en graines était positif et significativement corrélé avec le nombre des branches .

Plus de branches primaires garantissent plus de nombre de gousse, ce qui augmente le nombre de graines et enfin produire plus de rendement en graines. Un résultat similaire a également été rapporté par Soyema Khatun, *et al*(2016) .

Les branches secondaires par plante, les gousses / plante sont fortement corrélées les uns aux autres et ces caractéristiques contribuent à une biomasse plus élevée. Ces résultats sont globalement en accord avec les auteurs (Younis *et al.*, 2009 et Karadavut *et al.*, 2009).

D'après Amarah *et al.* (2005) et Sobia *et al.* (2008) le nombre de branches primaires, le rendement biologique et l'indice de récolte ont des effets directs positifs, ainsi qu'une corrélation génotypique positive et la plus élevée avec le rendement en graines. Par conséquent, ces traits peuvent être utilisés pour l'amélioration des plantes.

Les résultats obtenus par l'étude statistique ont montré une corrélation positive entre la surface foliaire de la plante et les composantes du rendement et une corrélation négative entre nombre de foliole/feuille et les composantes du rendement presque les mêmes résultats pour la surface foliaire et le nombre de foliole/feuille a été trouvé par Ruisi (2015) qui caractérise 12 agro-écotypes de lentilles de différentes régions de Sicile.

Une plus grande surface foliaire peut fournir plus de surface pour la photosynthèse. Les données relatives à la surface foliaire des génotypes de *Lens culinaris* indiquent que l'analyse de la variance a révélé des différences significatives pour la surface foliaire parmi les cultivars. Des résultats similaires ont été trouvés par (Moslem *et al.*, 2011).

Le nombre de jours jusqu'à floraison, le nombre de jours jusqu'à maturité physiologique sont fortement corrélés les uns aux autres et ces caractéristiques contribuent à un rendement très élevé. Ces résultats sont globalement en accord avec ceux des auteurs (Younis *et al.*, 2009 , Karadavut *et al.*, 2009, Gaad *et al.*, 2018).

Résultats similaires de la variabilité entre les cultivares de lentilles pour les jours de floraison et de maturité physiologique étaient démontrés par Mondal *et al.* 2013. Ces paramètres sont considérés comme un trait important qui est principalement utilisé pour sélectionner les cultivares à maturation précoce.

Le nombre de jours de floraison et maturité physiologique varient significativement entre les cultivares étudiés, Cette différence peut s'expliquer par la variation entre environnement facteurs et cultivares. Lázaro *et al.* (2001) ont signalé un faible nombre de jours à 50% de floraison avec 117,8 jours de lentille en Espagne.

Nos résultats sont similaires au Bicer et Şakar (2007) qui ont montré que les génotypes de l'ICARDA ce qui est notre cas (Idlep3) ont besoin moins de jours de floraison et de maturité que le nombre de jours des autres cultivares.

Le rendement biologique maximal démontre par les cultivares *Microsperma*. Alors que, le rendement biologique minimum est observé par les cultivares *Macrosperma*. Les résultats suggèrent qu'il existe une variabilité génétique élevée inter génotypique pour le rendement biologique / plante.

Les résultats des caractéristiques des composantes du rendement révèlent des différences très significatives observées entre les cultivares. Ce est déjà observé par Cristobal *et al.* (2014).

Les auteurs (Maria *et al.*, 2014, Gaad *et al.*, 2018) ont observé que les traits d'importance agronomique, tels que le rendement biologique, le nombre de graine/plante et le nombre de gousses /plante ont des variations marquées. En effet, le rendement biologique par plante, les gousses par plante, l'indice de récolte, et le poids de 1000 graines sont fortement et positivement corrélés pour contribuer à la prédiction comme indiqué par les auteurs (Azizi-Chakherchaman *et al.*, 2009, Al-Ghazawi *et al.*, 2011).

Mondal *et al.*, (2012) considéraient le rendement biologique et le nombre de gousses comme les principales composantes du rendement en grains.

Nos résultats sont en accord avec le résultat de nombreux auteurs qui ont également observé que le rendement des graines a augmenté avec l'augmentation du nombre de gousses/ plante dans lentille (Yadav *et al.*, 2003; Tabu et Sakar, 2008 ; Younis *et al.*, 2008).

D'autres études confirment que le nombre de gousses par plante et le poids de mille graines ont un effet positif et direct sur le rendement (Benbrahim *et al.*, 2016).

L'analyse en composantes principales montre que les deux premières composantes, qui expliquent le pourcentage le plus élevé de variables sont liées aux caractères qui marquent la production.

Des résultats similaires sont obtenus par Toklu *et al.*, (2009) dans une analyse en composantes principales, dans laquelle les variables liées à la production de semences étaient les plus importantes pour le premier facteur. La deuxième composante montre que les variables les plus importantes sont le nombre de jours à floraison et le nombre de jours à maturité.

D'après Maria *et al.*, (2014), la variation observée de ces paramètres pourrait être utilisée pour obtenir des variétés de cycles courts ou plus longs, bien qu'elles soient très dépendantes de l'environnement.

Bicer et Sakar (2007) ont trouvé une variation significative des caractéristiques agronomiques entre certaines variétés locales de lentilles en Turquie.

Bacchi *et al.* (2010) ont utilisé l'analyse en composantes principales pour des données morphologiques et agronomiques afin de permettre la discrimination des génotypes de lentilles.

Des résultats similaires ont été obtenus par Lázaro *et al.*, (2001) dans une analyse en composantes principales, dans laquelle les variables liées à la production de graines étaient les plus importantes pour le premier facteur.

Selon Abdul-Razzak (2017) les deux composants principaux PC1 et PC2 ont révélé 66,538 % de la variation phénotypique originale, ce qui est presque notre cas (58.8%).

À partir de cette analyse, il existe cinq groupes qui est similaire à (Gaad *et al.*., 2018) qui se trouve cinq groupes par l'analyse de l'ACP.

Le résultat de l'analyse de classification hiérarchique, qui permettra une meilleure gestion de l'échantillon dans la banque de gènes, montre une séparation entre *Macrosperma* et *Microsperma*. Un dendrogramme construit pour estimer la relation génétique basée sur des données agro-morphologiques a révélé deux principaux groupes qui sont divisés en cinq sous-groupes qui confirment les résultats obtenus par l'ACP. Nos résultats sont similaires à ce que l'on trouve (Gaad *et al.*, 2018) qui trouve cinq groupes par contre, Anuradha (2015) a trouvé trois groupes.

Solen Bacchi *et al.* (2010) la séparation des populations en fonction du type de graines est également observée dans les lentilles d'Algérie, de Chypre, d'Égypte, du Maroc, de Tunisie, du Pakistan et d'Éthiopie.

En observant le dendrogramme, nous pouvons constater que les cultivares ne sont pas regroupées compte tenu des zones climatiques établies. Le regroupement basé sur les traits morphologiques et la distance euclidienne a représenté cinq groupes pour le germoplasme entier, mais il n'a montré aucune corrélation avec la présence géographique des accessions, ce qui était conforme à une étude sur la lentille par Singh *et al.* (2014).

Lázaro *et al.* (2001) n'ont pas trouvé de relations entre les caractères phénotypiques et climatiques dans la collection de lentilles espagnoles. La même conclusion a été atteinte par Tyagi & Khan (2010) qui n'ont pas trouvé d'association de 50 variétés locales d'Inde selon différentes régions éco géographiques, où les variétés d'une même zone étaient regroupées en différents groupes.

Conclusion

Les résultats de cette étude montrent la présence d'une forte variation phénotypique **inta et inter-génotypique importantes** pour différentes caractéristiques végétales importantes d'un point de vue agronomique,

Permettant son utilisation en analyse génétique et son éventuelle inclusion dans des programmes de sélection.

Les 12 cultivares de lentille ont montré une différence significative selon les paramètres morphologiques, seuls les cultivares **Idlep3** et **Flip90-31** ont révélés un potentiel de rendement élevé.

Les résultats obtenus par l'analyse en composantes principales (ACP) et l'analyse hiérarchique (CAH) des paramètres agro morphologiques ont permis de ressortir cinq groupes qui se différencient par les aspects morphologiques et les composantes du rendement de sorte que :

-Le premier groupe : il est composé de l'individu Idlep3 de type *Macrosperma* caractérisé par les paramètres de rendement plus élevés et se caractérise par de floraison et maturité précoce.

-Le deuxième groupe : il est constitué de l'individu Métropole de type *Macrosperma* caractérisé par les variables nombre des jours jusqu'à maturité (NJM), nombre des jours jusqu'à floraison élevés (floraison et maturité tardive)

-**Le troisième groupe** : il est composé de les individus Idlep2et Idlep1,Dahra, Syrie229 et Idlep4 de type *Microsperma* .

-**Le Quatrième groupe** : il est constitué des individus Balkane755, Ibla et Redjes de type *Macrosperma* .

-**Le cinquième groupe** : il comporte les individus Flip90-31 et Nile45 de type *Macrosperma* .

3.2. Analyse cytogénétique

3.2.1. Dénombrement chromosomique

Tous les cultivars de *Lens culinaris* ont fait l'objet de dénombrement chromosomique aussi bien en mitose somatique, qu'en méiose pollinique. L'observation des plaques métaphasiques et des cellules méiotiques au stade diacinèse de la lentille cultivée montre un nombre chromosomique constant $2n = 2x = 14$ chromosomes et 7 bivalents chez tous les caryotypes. Cette espèce a donc un caryotype diploïde (Figure 38).

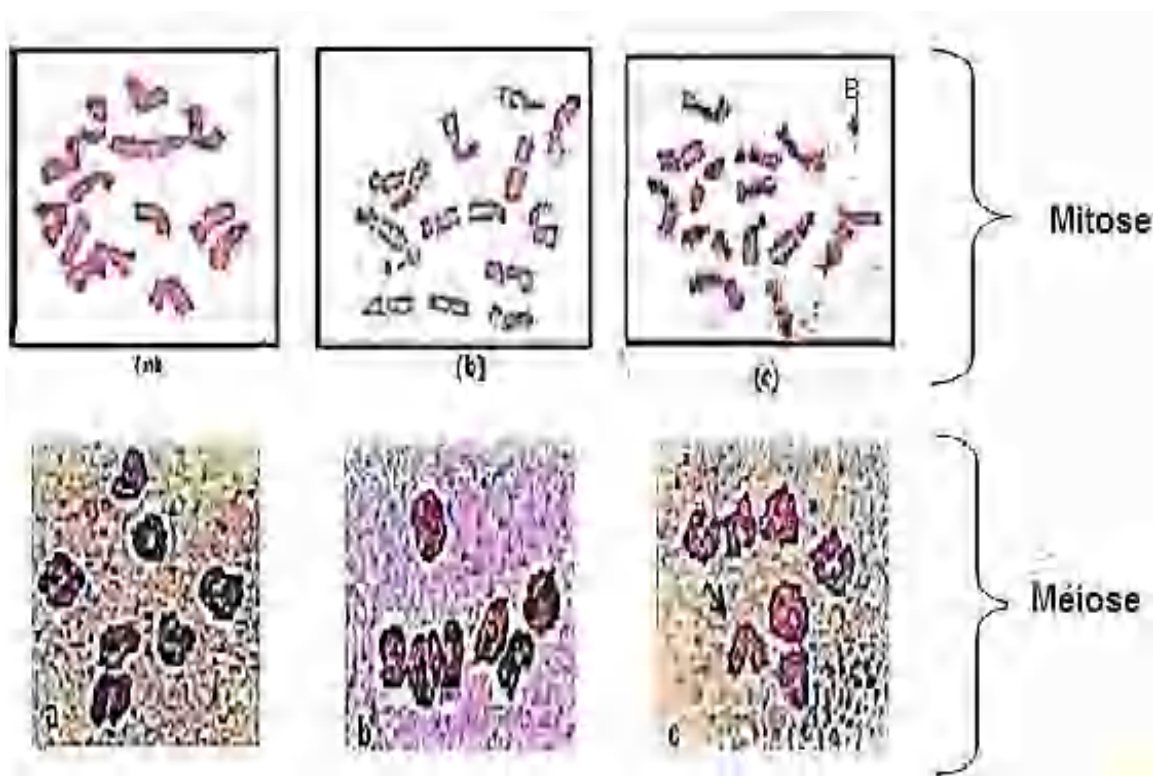


Figure 38 : Mitose et méiose pollinique : (a, b, c) plaques métaphasiques à $2n = 2x = 14$ chromosomes, stades diacinèse à 8 bivalents chez *Lens culinaris*.

3.2.1.1. Caryotype

D'après les données morpho- métriques (tableau 11), on constate que le caryotype de l'espèce est constitué de 7 paires chromosomiques. Les caryotypes des cultivars (Dahra, Idlep1 et Idlep 3, Syrie 229, Métropole et Flip 90-31) constituent, chacun, un génome qui regroupe 7 paires chromosomiques dont quatre paires sont métacentriques et trois paires sont sub-métacentriques (Figure 39,40,41). Nous décrivons les caractères morpho métriques des chromosomes, qui caractérisent le caryotype de chaque cultivars.

Les mesures des chromosomes sur cinq plaques métaphasiques choisies, a permis la constitution du caryotype de *Lens culinaris*.

- **Cultivare Dahra**

Le caryotype de Cultivare Dahra est caractérisé par la présence de 7 paires chromosomique (Figure 39). Les calculs de l'indice centromérique (I.C) et le rapport des bras longs sur les bras courts (r) (Tableau 11) nous ont permis de déterminer les chromosomes homologues et classer les différents types chromosomiques. Deux types sont observés : les métacentriques et les sub-métacentriques (en absence des acrocentriques et les télocentriques).

Il s'agit des paires chromosomiques (1-2- 3 et 7) qui sont des métacentriques et les paires (4-5 et 6) sont des sub-métacentriques. La formule chromosomique est la suivante : $2n = 2x = 14 = 3m + 3sm + 1m - sat$

- La longueur totale moyenne (LT) des chromosomes est comprise entre 5.39 μm et 1.59 μm .
- le rapport entre la longueur des bras longs et des celles des bras courts (r) varie entre 1.23 et 2.88 (Tableau 11).

- **Cultivare Syrie 229**

Le caryotype de Cultivare Syrie est caractérisé par la présence de Sept paire chromosomique (Figure 39). Les calculs de l'indice centromérique (I.C) et le rapport des bras longs sur les bras courts (r) (Tableau 12) nous ont permis de déterminer les chromosomes homologues et classer les différents types chromosomiques. Deux types sont observés : les métacentriques et les sub-métacentriques (en absence des acrocentriques et les télocentriques). Il s'agit des paires chromosomiques 1, 2, 5 et 7 qui sont métaphasique et les paires 3, 4 et 6 sont des sub- métacentrique. La formule chromosomique est la suivante : $2n = 2x = 14 = 2m + 2sm + 1m + 1sm + 1m - sat$

- La longueur totale moyenne (LT) des chromosomes est comprise entre 5,11 et 3.07 μm .
- Le rapport entre la longueur des bras longs et celle des bras courts (r) varie entre 0,65 et 0.41 μm .
- La longueur totale relative (LR) varie entre 5,56 et 3,4 μm .
- L'indice centromérique varie entre 34,05 et 43,52 %.

- Le rapport entre la paire chromosomiques la plus longue et celle la plus courte (R) est de 2.44 μm .

Nous observons aussi, la présence des satellites situés au niveau des paires chromosomiques 4 et 6.

- **Cultivare Métropole**

Chez ce Cultivare, nous constatons la présence de sept paires chromosomiques (Figure 39). La majorité des paires chromosomiques sont métacentrique à l'exception des paires :

5 et 7 qui sont sub-métacentriques. La formule chromosomique est la suivante : $2n = 2x = 14 = 4m + 3sm - \text{sat}$

- La longueur totale moyenne (LT) des chromosomes de cette variété est comprise entre 6,06 et 4,21.
- Le rapport entre la longueur des bras longs et celles des bras courts (r) varie entre 0.85 et 0.41.
- La longueur totale relative (LR) varie entre 5,47 et 3,79.
- L'indice centromérique varie entre 42,93 et 22,97.
- Le rapport entre la paire chromosomique la plus longue et celle la plus courte (R) est de 1,43.
- **Cultivare Flip 90-31**

Le caryotype de ce Cultivare est caractérisé par la présence de 7 paires chromosomiques (Figure 40), quatre paires sont métacentriques (1, 2, 3, 4), et trois paires (5, 6, 7) sont sub-métacentriques. La formule chromosomique est la suivante : $2n = 2x = 14 = 4m + 3sm - \text{sat}$

- La longueur totale moyenne (LT) des chromosomes de cette variété est comprise entre 6.94 et 5.02.
- Le rapport entre la longueur des bras longs et celles des bras courts (r) varie entre 0,95 et 0,39.
- La longueur totale relative (LR) varie entre 5,39 et 3,75.
- L'indice centromérique varie entre 45,20 et 25,39.
- Le rapport entre la paire chromosomique la plus longue et celle la plus courte (R) est de 1,38 μm .

Ce Cultivare se caractérise par la présence de deux satellites localisés au niveau de la paire chromosomique 04.

- **Cultivare Idlep 3**

Chez ce Cultivare, nous constatons la présence de sept paires chromosomiques (Figure 41). La majorité des paires chromosomiques sont métacentrique à l'exception des paires 5-6 et 7 qui sont sub-métacentriques. La formule chromosomique est la suivante :

$2n = 2x = 14 = 4m + 3sm - \text{sat}$.

- La longueur totale moyenne (LT) des chromosomes est comprise entre 3.71 μm et 6.2 μm .

- le rapport entre la longueur des bras longs et des celles des bras courts(r) varie entre 1.3 et 2.38.
- La longueur totale relative (LR) varie entre 18.19 et 10.84.
- L'indice centromérique varie entre 29.82 et 44%
- le rapport entre la paire chromosomique la plus longue et celle la plus courte (R) est de 1.67 (Tableau 11).
- **Cultivare Idlep1**

Le caryotype est caractérisé par la présence de sept paires chromosomiques dont quatre paires métacentrique (1-2-3 et 4) et trois paires submétacentriques (5-6 et 7). La formule chromosomique est la suivante : $2n = 2x = 14 = 4m + 3sm$ (Figure 41).

- La longueur totale moyenne (LT) des chromosomes est comprise entre 3.81 μm et 7.44 μm .
- le rapport entre la longueur des bras longs et des celles des bras courts(r) varie entre 1.24 et 2.27.
- La longueur totale relative (LR) varie entre 18.42 et 9.64.
- L'indice centromérique varie entre 30.44 et 44.46 %
- le rapport entre la paire chromosomique la plus longue et celle la plus courte (R) est de 1.95.

Globalement, les caryotypes des Cultivare étudiées sont symétriques tant pour la forme que pour la taille des chromosomes. L'indice d'asymétrie ayant sensiblement les mêmes valeurs (61,45 % Syrie 229, 60,13 %, Métropole, 63,11 % Flip 9-31, 64,32% Dahra, 62,30 % Idlep 3, 60,51% Idlep 1).

3.2.1.2. Les chromosomes B

Signalons que tous les Cultivare présentent des chromosomes B à l'exception le Cultivare Métropole.

Tableau 11 : Les caractères morphométriques des chromosomes chez les cultivares du *Lensculinaris*.

Chr	Cc	cultivares de la lentille					
		Idlep1	Flip 90-31	Idlep3	Metropole	Syrie229	Dahra
1	LT	7.44±0.55*	6,96±0,28	6.20±0.89	6,06 ±0,09	5,11 ±0,07	5.39±0.65
	LR	18.42±0.33	15,39±0,16	18.19±1.04	15,47±0,08	15,56±0,007	19.43±0.65
	BL	4.11±0.11	4,27±0,19	3.79±0.55	3,49±0,31	2,88± 0,15	3.09±0.53
	BC	3.26±0.16	2,91±0,22	2.41±0.34	2,57±0,23	2,22± 0,22	2.30±0.4
	BL/BC	1.26±0.02	1.46±0,01	1.62±0.02	1.35±0,08	1.29±0,16	1.34±0.15
	t Ic %	m 43.81	m 41.81	m 38.87	m 42.40	m 43.44	m 42.67
2	LT	6.76±0.74	6,94±0,28	5.59±0.93	5,81±0,21	4,85 ±0,13	5.01±0.41
	LR	17.10±0.36	15,22±0,02	16.31±0.39	15,23±0,06	15,29 ±0,09	18.07±0.25
	BL	3.89±0.62	4,14±0,14	3.19±0.21	3,31±0,14	3,02 ±0,14	3.06±0.29
	BC	2.97±0.61	2,79±0,23	2.46±0.56	2,49±0,21	1,83 ±0,19	1.95±0.15
	BL/BC	1.30±0.18	1,48±0,04	1.30±0.06	1.32±0,04	1.65 ±0,08	1.57±0.03
	t Ic %	m 43.93	m 40.20	m 44	m 44	m 37.73	m 38.92
3	LT	6.23±0.39	6,66±0,29	5.24±0.88	5,53 ±0,15	4,69 ±0,2	4.42±0.13
	LR	15.79±0.34	15.0 ±0,02	15.27±0.32	14,98±0,04	14,11 ± 0,18	15.93±0.15
	BL	3.46±0.79	3,71±0,12	3.18±0.64	3,29 ±0,07	3,06 ±0,25	2.72±0.24
	BC	2.77±0.63	2,94±0,16	2.05±0.24	2,27 ±0,22	1,83 ±0,19	1.83±0.14
	BL/BC	1.24±0.18	1.26±0,06	1.61±0.17	1.44 ±0,06	1.67 ±0,08	1.48±0.07
	t Ic %	m 44.46	m 44.14	m 39.12	m 41.04	sm 39.01	m 41.40
4	LT	5.59±0.63	6,30±0,18	4.84±0.77	5,39±0,10	4,44 ±0,04	4.08±0.42
	LR	14.17±0.47	14,74±0,16	14.11±0.25	15,80±,11	14,82 ±0,08	14.71±0.34
	B L	3.46±0.43	3,45±0,04	2.83±0.12	2,99±0,14	2,81 ±0,12	2.72± 0.19
	BC	2.13±0.19	2,84±0,15	2.01±0.70	2,33±0,10	1,63 ±0,12	1.35± 0.24
	BL/BC	1.62±0.01	1.21±0,01	1.47±0.14	1.28±0,03	1.72 ±0,06	2.01± 0.08
	t Ic %	m 38.10	m- sat 47.33	m- sat 41.52	m- sat 43.22	sm- sat 36.71	sm 33.08
5	LT	5.25±0.08	5,61±0,22	4.58±0.36	5,29 0,24	4,29 ±0,11	3.84± 0.28
	LR	13.3±0.32	14,22±0,14	13.35±0.36	4,41±0,07	14,67 ±0,14	13.85±0.18
	B L	3.38±0.35	3,86±0,08	2.98±0.72	3,40±0,16	2,58 ±0,21	2.85± 0.58
	BC	1.86±0.30	1,74±0,31	1.60±0.17	1,49±0,11	1,70 ±0,24	1.1±0.06
	BL/BC	1.81±0.20	2.21±0,13	1.86±0.10	2.28±0,07	1,51 ± 0,11	2.59± 0.22
	t Ic %.	sm 35.42	sm 31.01	sm 34.93	sm 28.16	m 39.62	sm 28.64
6	LT	4.56±0.9	5,7 ±0,24	4.09±0.69	4,41±0,28	3,67 ±0,2	3.39± 0.15
	LR	11.53±0.57	14,29±0,09	11.94±0.64	3,96±0,12	4,00 ±0,18	12.21 ±0.3
	BL	3.05±0.71	4,09±0,05	2.87±0.59	2,60±0,23	2,42 ±0,29	2.51± 0.07
	BC	1.5±0.46	1,62±0,18	1.22±0.39	1,80±0,40	1,25 ±0,17	0.87± 0.08
	t BL/BC	2.03±0.23	2.52±0,07	2.38±0.28	1.44±0,17	1.93 ±0,14	2.88± 0.06
	Ic %	sm 32.89	sm 28.42	sm 29.82	sm 40.81	sm- sat 34.05	Sm 25.66
7	LT	3.81±0.92	5,02±0,26	3.71±0.32	4,21±0,22	3,47± 0,3	1.59± 0.51
	LR	9.64±0.56	3,75±0,09	10.84±0.53	13,79±0,09	13,4 ±0,29	5.75± 0.65
	B L	2.64±0.55	3,74±0,21	2.50±0.44	2,99±0,21	2.19 ±0,16	0.88± 0.25
	BC	1.16±0.58	1,27±0,04	1.20±0.12	1,22±0,02	1,28±0,14	0.71± 0.28
	B L/BC	2.27±0.32	2,94±0,01	2.08±0.19	2.45±0,04	1.71 ±0,01	1.23± 0.08
	t Ic %	sm 30.44	sm 25.29	sm 32.34	sm 28.97	m 36.88	M 44.65
I.a.s.	60,51 %	63 ,11%	62,30%	60 ,13%	61,45%	64,32 %	
R	1,95	1,38	1,67	1,43	2 ,44	3,38	

Cc : caractères caryo-morphologiques. PCh: paire chromosomique; BL: bras long, BC: bras court; LT: longueur totale des chromosomes = BL+BC; r: rapport bras long sur bras court =BL/ BC; Ic: indice centromérique = 100 x BC / LT; LR (%):longueur relative = 1000 x LT / ΣLT; t: type morphologique des chromosomes selon Levan *et al.* (1964), IAs % : indice d'asymétrie = 100 x ΣBL / ΣLT selon Arano et Saito (1980) R: rapport entre la paire la plus longue et la plus courte des chromosomes ; * : présence de satellites, sat: satellites.

(*)

=

écart

type.

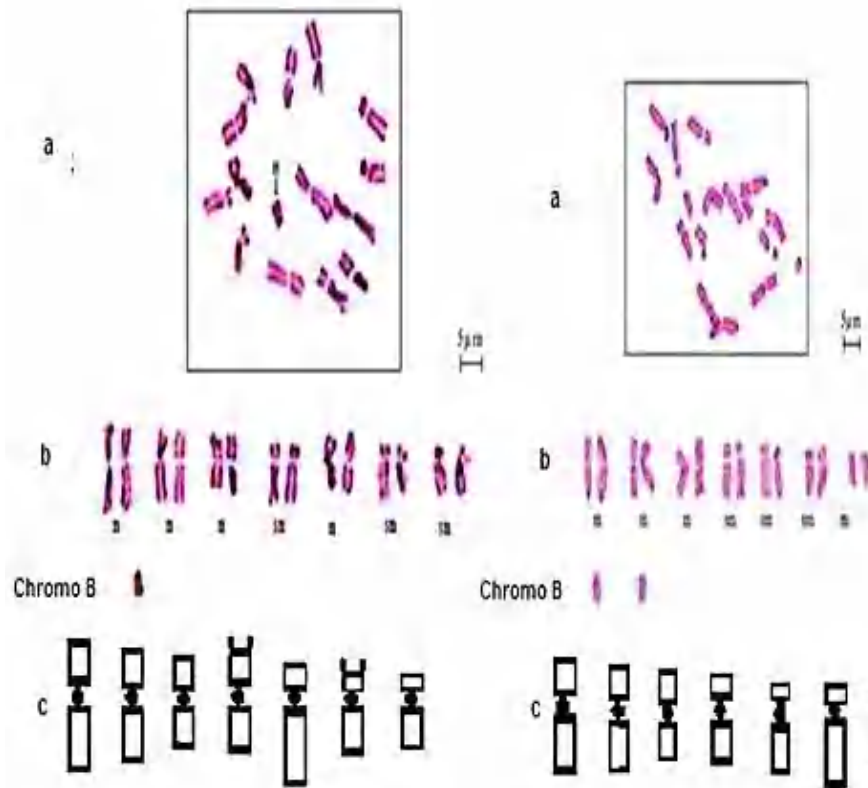


Figure 39 Cytotype de l'espece *Lens culinaris* Medick (Génotypes Syrie 229 et Dahra).
 a- Plaque métaphasique
 b- Caryogramme
 c-Idiogramme

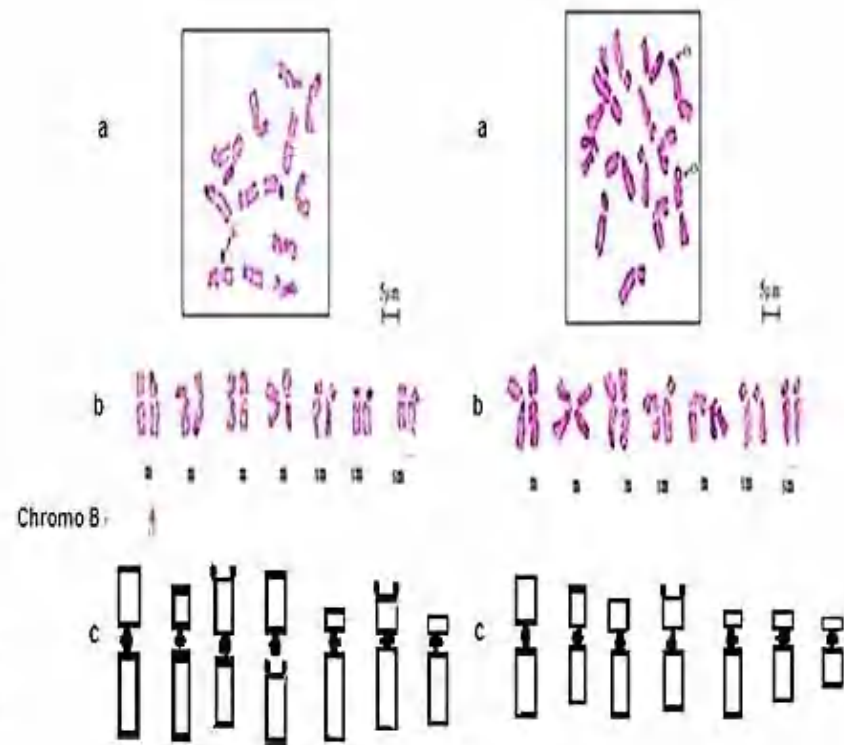


Figure 40 Cytotype de l'espece *Lens culinaris* Medick (Génotypes Flip 90.31 et Métropole).
 a- Plaque métaphasique
 b- Caryogramme
 c-Idiogramme

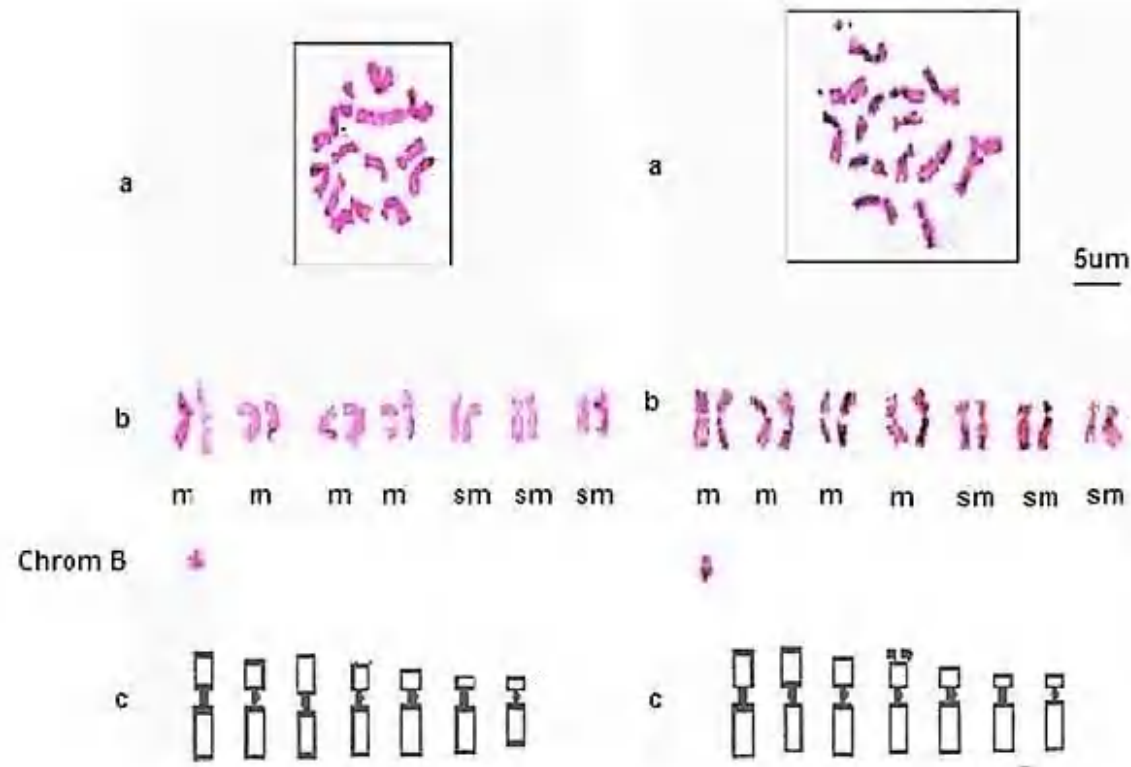


Figure 41 Caryotype de l'espece *Lens culinaris* Medick (Génotypes Idlep:1 Idlep3),
 a-Plaqué métaphasique
 b- Caryogramme
 c-Idiogramme

Discussion

Les méthodes cytogénétiques à travers le dénombrement chromosomique (réalisé sur le méristème apical des pointes racinaires), permettent dans un premier temps de déterminer le niveau de ploïdie du matériel étudié. Plusieurs paramètres interviennent dans la description de la morphologie des chromosomes : taille, position du centromère, présence ou non de satellites ou de constructions secondaires.

D'autres caractères sont utilisés pour l'étude des caryotypes : la longueur totale des chromosomes (LT), la taille relative des chromosomes (LR), l'indice d'asymétrie de caryotype (I.a.s) et le rapport de la plus longue paire chromosomique et celle de la plus courte (R) qui donnent une idée sur la forme du caryotype.

La comparaison des idiogrammes obtenus lors de l'étude des cultivars de *Lens culinaris* révèle quelques différences remarquables pour la taille des chromosomes, la localisation et le nombre de satellites et de constructions secondaires. Contrairement aux cultivars Syrie229, Dahra et Idlep1, les cultivars Métropole et Flip90-31 présentent une seule paire de satellites localisée sur le chromosome 4. Seul le cultivar Métropole qui se singularise par la présence d'une construction secondaire sur le chromosome 3 (bras long).

En général, la formule caryologique du *Lens culinaris* est définie comme :

$$n = x = 7 = 4m + 3 Sm.$$

Si nous confrontons nos résultats à ceux d'autres auteurs (Galasso *et al.* 2001, Gaffarzadeh *et al.* 2007, Hammouda, 2015, Hammadi *et al.*, 2018), nous pouvons remarquer que les résultats obtenus chez *Lens culinaris* Medik sont similaires.

D'après Gaffarzadeh *et al.* (2007), chez la lentille cultivée, quatre paires chromosomiques de types métacentriques et trois paires sub-métacentriques sont détectées, ce qui est notre cas. Par contre, la localisation et le nombre de satellites observés sont différents. Galasso *et al.* (2001) ont proposé un caryotype avec trois paires chromosomiques métacentrique ou submétacentrique et trois paires acrocentriques. Ces auteurs ont pu mettre en évidence un satellite sur la paire n°4 (bras long proche au centromère) du *Lens culinaris* Medik. Dans notre cas, l'analyse caryologique des chromosomes des cultivars, montre des variations dans la localisation et le nombre de satellites d'un cultivar à un autre.

Nous avons pu détecter deux satellites dans les paires n°4 et n°6 (bras courts) de cultivar Syrie229, une construction secondaire dans la paire n°3 (bras long) et un satellite dans la paire n°4 (bras court) de cultivar Métropole. Egalement, un autre satellite est localisé sur la paire n°4 de cultivar Flip19-31 et Dahra. Par contre, les cultivars (Idlep3 et Idlep 1) en sont dépourvus.

Sharma *et al.* (1986), a déclaré le niveau autotétraploïde de $2n = 4x = 28$ pour *L. culinaris* pour la première fois.

Selon Shafique *et al.* (1992), le caryotype du *Lens culinaris* est constitué de trois paires chromosomiques métacentriques, quatre paires submétacentriques et absence de satellites.

Rappelons que le génome du *Lens culinaris* se caractérise par un caryotype symétrique (Galasso., 2001 ; Gaffarzadeh *et al.*, 2007 ; Hammouda., 2015, Hammadi *et al.*, 2018).

L'hypothèse qu'un caryotype symétrique est considéré comme un caryotype primitif, en comparaison à un caryotype asymétrique, d'abord formulée par Levitzky (1931) repris par Stebbins (1971) est celle généralement admise dans la littérature concernant l'évolution de la morphologie des chromosomes chez les plantes. Bien que l'hypothèse inverse ait aussi été invoquée (Jones, 1984).

3.2.2. Organisation et distribution de l'hétérochromatine par le C-banding

La distribution et la caractérisation de l'hétérochromatine chez une série de cultivares appartenant à l'espèce *Lens culinaris* Medik ($2n=2x=14$) sont analysées et comparées par les bandes C. Cette analyse révèle beaucoup de variations en bandes polymorphes C+. En effet, le nombre de bande, leur intensité et leur emplacement sur les chromosomes, diffèrent au sein du génotype et d'un génotype à un autre (Figure 42-43).

Rappelons que, les bandes hétérochromatiques existent sous trois formes : télomériques, centromériques et intercalaires (Figure 42).

Chromosome 1 :

Ce chromosome est marqué par des bandes C+ polymorphes foncées observé dans tous les cultivares à l'exception de cultivare Redjes. De plus, nous avons observé une paire de satellites sur le court chromosome bras des cultivares Dahra et Balkan755.

Chromosome 2 :

Ce chromosome a révélé le maximum d'obscurité supplémentaire bandes (ou spécifiques), de types intercalaires et télomériques , à l'exception de ceux de Idlep2 (bras court) et Balkan755 (bras long). On note également la présence d'une paire de satellites marqué sur le chromosome des bras courts de Dahra et Syrie229.

Chromosome 3 :

Ce chromosome est marqué par des couleurs sombres et fortement colorées.

Bandes intercalées, autres fines, faiblement colorées, peu bandes centromériques et télomériques marquées sur ce chromosome dans tous les cultivares. Notez également la présence d'un paire de satellites près du centromère (bras court) du g cultivare Flip90-31.

Notons ici que seul le cultivare Dahra est caractérisé par l'existence d'une paire de construction, située sur le bras court.

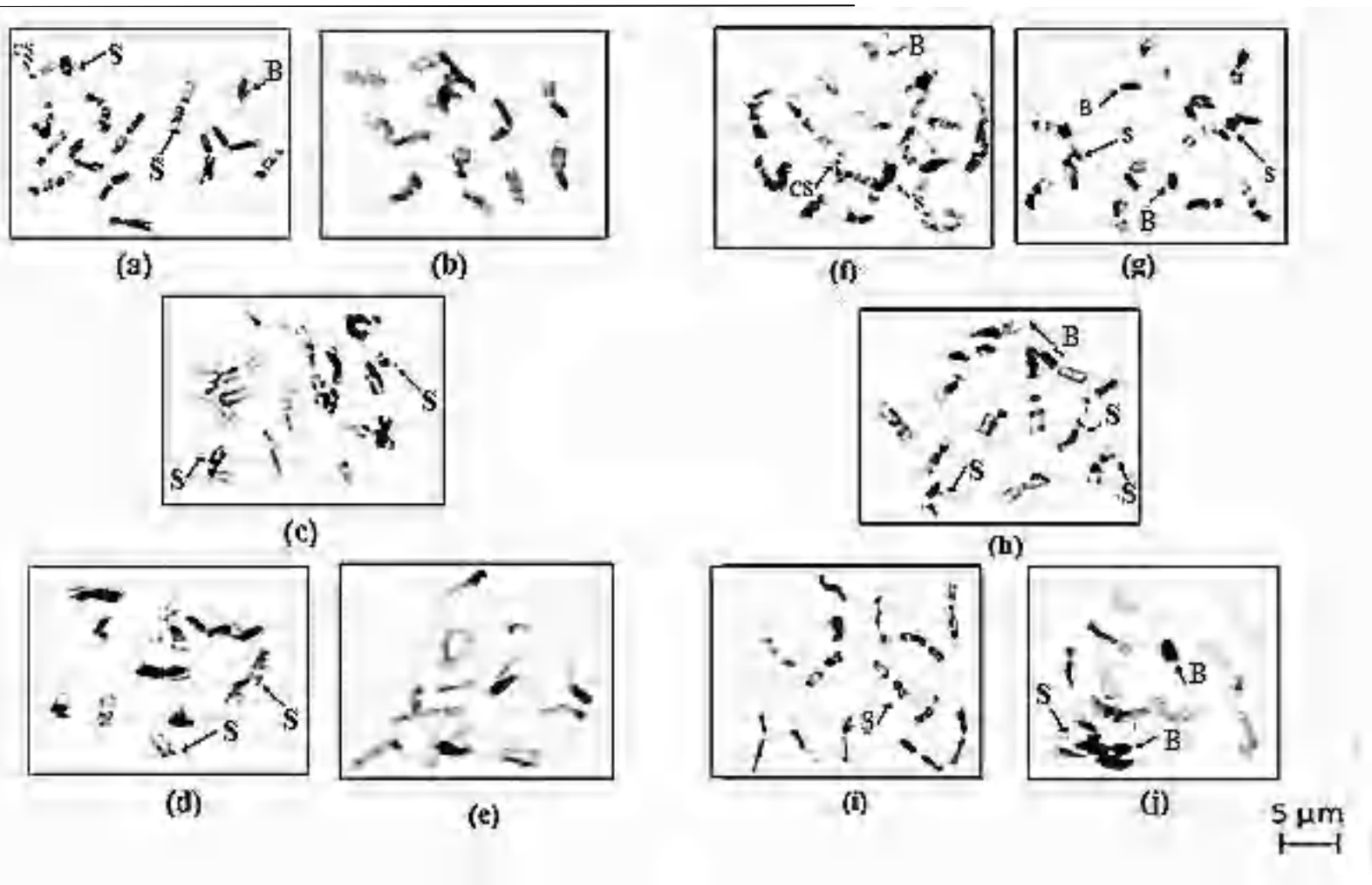


Figure 42 : Plaques de métaphases marquées par les bandes C-. (A) Dahra, (b) Nil 45, (c) Idlep2, (d) Idlep3, (e) Balkans 755, (f) Syrie229, (g) Metropole, (c) f) Flip 90-31, (i) Idlep1, (j) Redjes. Les chromosomes B et les satellites sont représentés par les flèches.

Chromosome 4 :

Ce chromosome montre beaucoup de bandes intercalaires supplémentaires, qui sont fortement colorés et centrométriques et télomériques bandes faiblement colorées, à l'exception de cultivare Redjes qui fait défaut montre beaucoup d'extra bandes intercalaires fortement colorées et bandes centrométriques et télomériques faiblement colorées.

Chromosome 5 :

Ce chromosome révèle de nombreux autres fortement bandes intercalaires colorées et moins de télomères et bandes de centromère sur les deux bras. Présence d'une paire de satellites situés sur les bras courts de chromosome 6 du cultivares Balkan755 et Syrie 229.

Chromosome 6 :

Ce chromosome est marqué par des points intermédiaires et télescopiques bandes et bandes centromériques sombres, à l'exception de celle des cultivares Métropole et Redjes. A noter également la présence d'une paire de satellites situés sur les bras courts du chromosome 6 du cultivares Balkan755 et Syrie 229.

Chromosome 7 :

Ce chromosome révèle des bandes interstitielles, faiblement colorées, à l'exception de ceux des cultivares Dahra, Idlep3 et Flip 90-31.



Figure 43 : Caryotypes marqués par des bandes C des cultivares de *Lens culinaris*. Trois groupes sont déterminés :

G1 (Dahra, Nil45, Idlep2, Idlep3, Balkan 755).

G2 (Syrie 229, Métropole, Flip 90-31).

G3 (Idlep1, Redjes).

Tableau 12 : Nombre et localisation des bandes C sur les chromosomes de cultivares riches en heterochromatine de *Lens culinaris*.

cultivares génomes		Dahra			Nil 45			Idlep2			Idlep3			Balkan755			Serie229			Métropole			Flip90-31			Idlep1			Redjes		
Nombre bandes c		BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT	BC	BI	BT
Génome R	1 R	1	5	0	0	3	0	2	8	0	0	2	0	2	2	1	0	6	0	2	7	1	2	4	2	1	4	1	0	4	0
	2 R	0	5	2	2	8	2	0	4	2	1	8	2	4	4	1	1	5	1	0	2	2	2	4	1	1	5	0	2	6	1
	3 R	0	8	1	2	10	1	0	3	2	1	5	1	4	4	0	0	4	0	3	4	1	1	4	0	1	3	1	2	6	1
	4 R	1	10	0	1	2	0	0	2	2	2	4	0	4	4	0	1	3	4	1	3	2	1	3	1	0	4	1	0	2	0
	5 R	1	5	0	2	7	0	0	6	2	1	6	2	8	8	1	0	3	0	1	3	1	0	2	2	1	4	0	0	4	0
	6 R	1	5	1	0	4	2	2	5	1	0	2	1	2	2	0	1	6	2	0	2	1	1	3	1	2	3	0	0	2	1
	7 R	1	7	0	0	3	1	2	4	0	2	2	2	10	10	2	0	5	0	1	3	0	1	3	0	1	2	1	0	4	0
		5	45	4	7	37	6	6	32	9	7	29	8	5	34	5	3	32	7	8	24	8	8	23	7	7	25	4	4	28	3
		54			50			47			44			44			42			40			38			36			35		
Chromosome B		1 hétérochromatique			/			/			1 hétérochromatique			/			/			/			2 hétérochromatique			/			1 euchromatique		

Discussion

L'analyse de la distribution de l'hétérochromatine constitutive (séquences d'ADN hautement répétées non codantes riche en bases CG) à révélé quelle se trouve sous forme d'épaisses, sombres et de fines bandes C sur les deux bras de tous les chromosomes du génome de *Lens culinaris*. Si nous confrontons nos résultats à ceux d'autres auteurs, nous pouvons remarquer que les résultats obtenus chez *Lens culinaris* Medik (dix cultivares) sont presque similaires à **Gaffarzadeh et al.** (2007) à l'exception ceux du cultivares Dahra, Nile 45 et Idlep 3 qui révèlent d'importantes variations des bandes C⁺ témoignant d'une plus grande richesse en hétérochromatine. aussi en concernant les types chromosomiques, mais, avec des différences importantes dans la présence/ou absence de satellites.

La comparaison des caryotypes des cultivares montre une grande hétérogénéité structurale (hétérochromatine constitutive) marquée par des épaisses et sombres bandes C⁺ (propres aux cultivares) sur les zonages des chromosomes. L'analyse inter-chromosomique révèle beaucoup de variations au sein des cultivares et entre les cultivares:

-variabilité inter- géotypes

Le chromosome 1, en comparaison à ceux des autres cultivares, présente d'importantes bandes hétérochromatiques supplémentaires observé chez le cultivare Métropole.

Les chromosomes 2, 3, 4, 5 et 7 qui révèlent beaucoup de bandes hétérochromatiques spécifiques sont ceux observés chez le cultivare Dahra. Seul le chromosome 6 du cultivare Syrie 229, est le plus riche en hétérochromatine par rapport aux autres.

Tableu13: Etude de quelques caractères chez le *Lens culinaris*

cultivares	caractères	Taux d'eterochromatine	Nombre et localisation			Nombre de chromosome B
			S	CS	localisation	
	Dahra	70.3%	3	1	2(BC)et 1 proche au centromere (BI)	1
	Metropole	60%	1	0	2(BC)	0
	Syrie229	58%	2	0	3(BC)	0
	Flip90-31	55.2%	2	0	1 proche au centromere(BC)	2
	Idlep 1	50%	1	0	1(BC)	0
	Redjes	48%	1	0	1(BC)	1
	Nile45	68%	0	0	0	0
	Balkan755	62%	2	0	2(BC)	0
	Idlep 2	65.5%	0	0	0	0
	Idlep 3	62%	1	1	1(BC)	1

En effet, Le cultivares Dahra, Nil45, Idlep2, Idlep3, Balkan 755 montrent un surcharge en

hétérochromatine constitutive. Les cultivares Syrie 229, Métropole, Flip 90-31 en sont moyennement riches. Alors que, les génotypes Redjes et Idlep1 en sont pauvres (Figure 43).

-variabilité intra- génotype

Nous avons pu observer une différence structurale remarquable (nombre, intensité et emplacement des bandes C) au sein des paires chromosomiques 1 et 5. Ceci signifie que les chromosomes sont marqués par les deux types d' hétérochromatines.

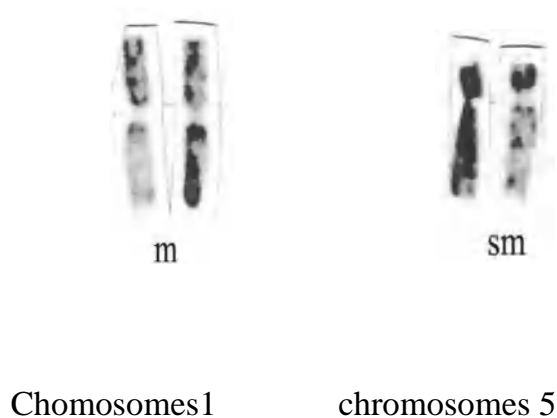


Figure 44 : Détection des deux types d'hétérochromatine (constitutive et facultative) chez le cultivare Dahra.

Rappelons que, toutes les variations révélées par le C-banding sont dues probablement à l'amplification ou à la réduction de la quantité des séquences d'ADN hautement répétées dans ces régions (Friebe et Gill, 1994, Gill,2009).

Nos résultats, en comparaison a ceux des auteurs (Gaffarzadeh et al 2007),sont presque similaires a l'exception ceux du cultivares Dahra ,Nile45 et Idlep3 qui révèlent d'importantes variations des bandes C⁺ témoignant d'une plus grande richesse en heterochromatine. Grâce a cette technique, certains auteurs : Masoud et *al.* (1991); Jahier (1992); Piumbini et Sylvia (1998), ont effectué des travaux sur les chromosomes des espèces végétales dans le but de détecter les régions riches en hétérochromatine.

La localisation et nombre des zones vitales des chromosomes (satellites et construction secondaires) sont déférent par rapport a ceux observes par les auteurs (Galasso et al ,2001,Gaffarzadeh et al ,2007).ces derniers ont ont pu mettre en évidence une paire de satellite sur

le chromosome 4 (bras long proche au centromère) du *Lens culinaris*, alors que dans notre cas, les satellites sont situés sur les chromosomes marqueurs des dix cultivars en position différentes (tableau 13), également, signalons la présence d'une construction secondaire marquée sur le chromosome 7 (bras court) de Dahra et sur le chromosome 5 (bras long) de cultivars Idlep 3. Dont elles sont absentes chez les génotypes de référence .

Nos résultats, en comparaison à ceux des auteurs (Galasso *et al.* 2001, Gaffarzadeh *et al.* 2007) montrent, aussi, la présence des chromosomes B, observées chez les cultivars Dahra (en nombre de 1) et le Flip90-31 (en nombre de 2), Idlep 3 (en nombre 1). et les cultivars Redjes (en nombre 1). d'après les littératures (Siljak-Yakovlev (1986), Stibinn, 1971, Amirouche, 2007, Hammouda et Khalfallah, 2008, 2013, 2015), deux facteurs jouant un rôle important dans l'adaptation du végétal aux conditions difficiles du milieu : Le taux de l'hétérochromatine et le nombre des chromosomes B.

A l'issue de nos travaux, nous pouvons retenir que :

- Chez la lentille cultivée, Un pourcentage de polymorphisme hétérochromatique intra et inter-génotypes est décelé dans les profils des bandes, témoignant un taux important d'hétérochromatine C+.

3.2.3. Les organisateurs nucléolaires (N.O.R)

Nous avons pu marquer et localiser des régions organisatrices nucléolaires (N.O.R) sur quelques de chromosomes des différents cultivares (sous forme de points noirs), en nombre et position différents (Figures 45,46, 47).

Tableau 14 : Nombre et localisation des NOR chez les 12 cultivares.

cultivares	Nombre de satellites	Secondaire Construction	Organisateurs nucléolaires (NOR)	
			Numéro de	Emplacement
Idlep1	3	/	3	Téломériques
Idlep2	2	1	2	Téломériques
Idlep3	3	/	3	Téломériques
Idlep4	4	/	4	Téломériques Centromérique
Nile45	2	2	2	Centromérique
Balkane755	3	0	3	Téломériques Centromérique
Syrie229	/	/	4	Téломériques Centromérique
Flip90-31	4	1	4	Téломériques Centromérique
Ibla	1	/	2	Centromérique
Métropole	4	1	4	Téломériques Centromérique
Redjes	2	/	2	Téломériques Centromérique
Dahra	3	0	3	Téломériques Centromérique

% de polymorphisme = (Nombre de bandes polymorphes par variété/Nombre total de bandes C)x 100 (Bushreen, 2007).

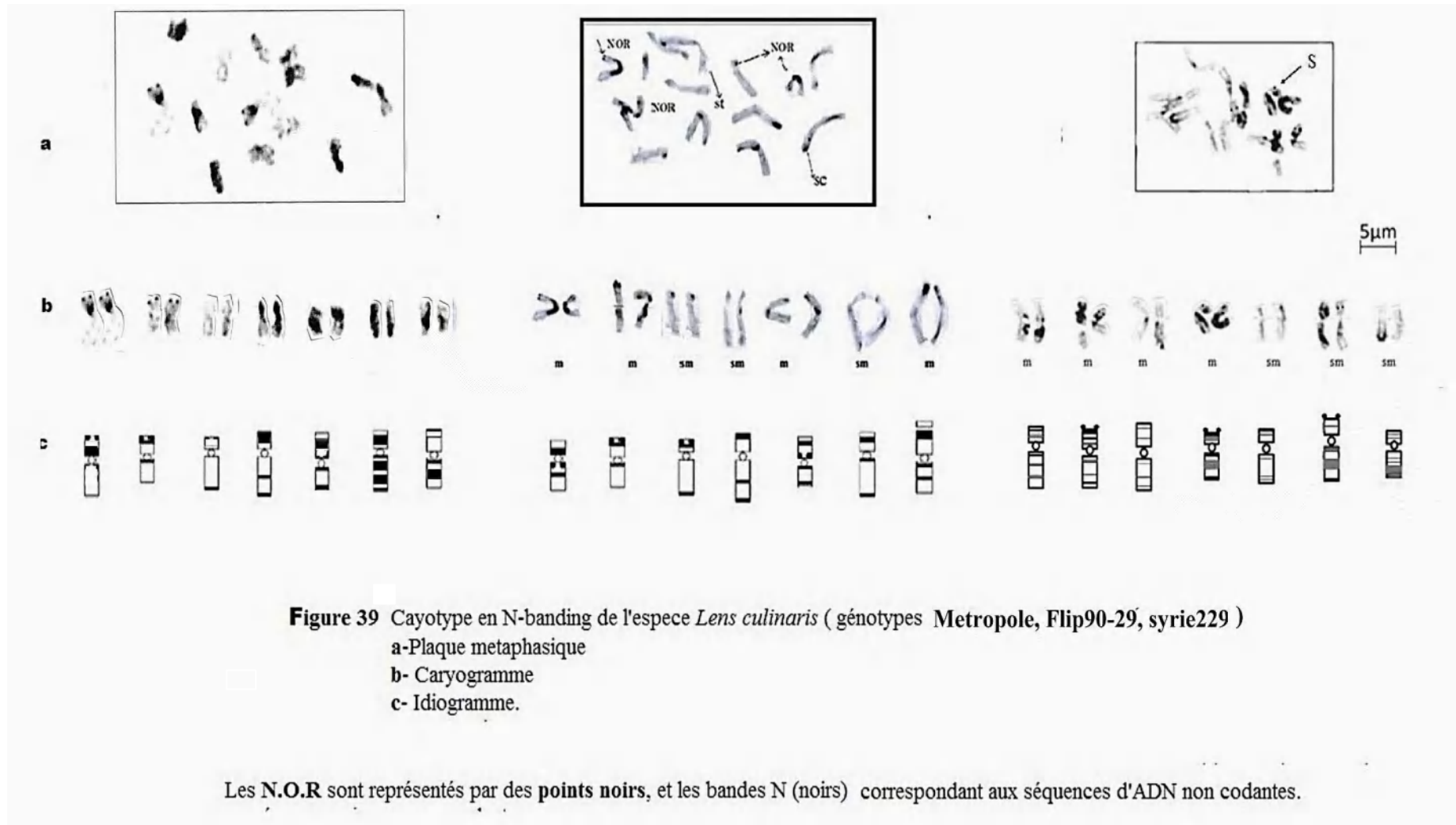


Figure 45 :Caryotype en N-banding des cultivares (Metropole,Flip90-31 et Syrie229).

Chromosome 1 :

Ce chromosome est marqué par des bandes N+ polymorphes foncées observées dans tous les cultivares à l'exception des cultivares Redjes et Idlep2. De plus, nous avons observé une paire de satellites sur le chromosome des bras courts des cultivares Métropole, Flip90-31, Idlep1, Idlep3, Balkane755 et Dahra.

Chromosome 2 :

Le chromosome 2 présentait des bandes centromériques sombres et distales claires sur le bras court et le bras long. Deux bandes interstitielles une proximale au centromère et l'autre dans la partie médiane de bras long étaient présents. Nous avons également noté la présence d'une paire de satellites marqués sur le chromosome des bras courts de tous les cultivares.

Chromosome 3 :

Il avait des bandes sombres observées dans le bras court et/ou dans le bras long. Nous avons également noté la présence d'une paire de satellites marqués sur le chromosome des bras courts des cultivares Métropole, Flip90-31, Syrie 229, Dahra et Balkane755. Le chromosome SAT- possédait deux bandes dans le bras court, en observant le NOR sur les mêmes chromosomes.

Chromosome 4 :

Ces chromosomes ont montré une à trois bandes interstitielles respectivement dans les bras court et long, la plupart d'entre elles étant proximales au centromère, qui a également une large bande au NOR dans tous les génotypes à l'exception des cultivares Balkane755 et Dahra.

Chromosome 5 :

Il a montré des bandes très claires dans la majorité des chromosomes des cultivares, à l'exception des cultivares Idlep3, Dahra et Ibla, qui étaient marqués par des bandes sombres. Ce chromosome se caractérise par l'absence de satellites dans tous les cultivares.

Chromosome 6 : Il a révélé des bandes très claires dans les chromosomes exceptionnels des cultivares Métropole, Idlep3, Balkane755 et Nil45. Tous les cultivares n'ont pas de satellites à l'exception du cultivare Idlep1.

Chromosome 7 :

Il a montré des bandes sombres sur le bras long ou / dans le bras court de tous les cultivares. Tous les cultivares n'ont pas de satellites à l'exception du cultivare Dahra.

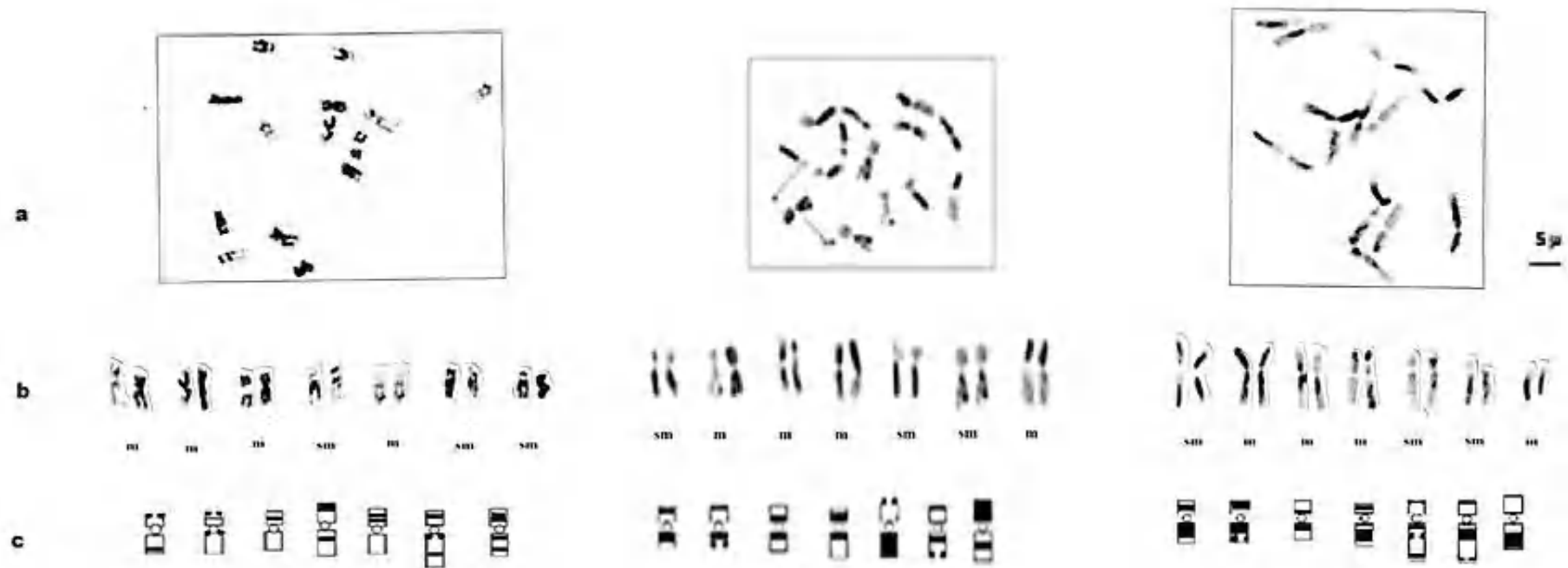
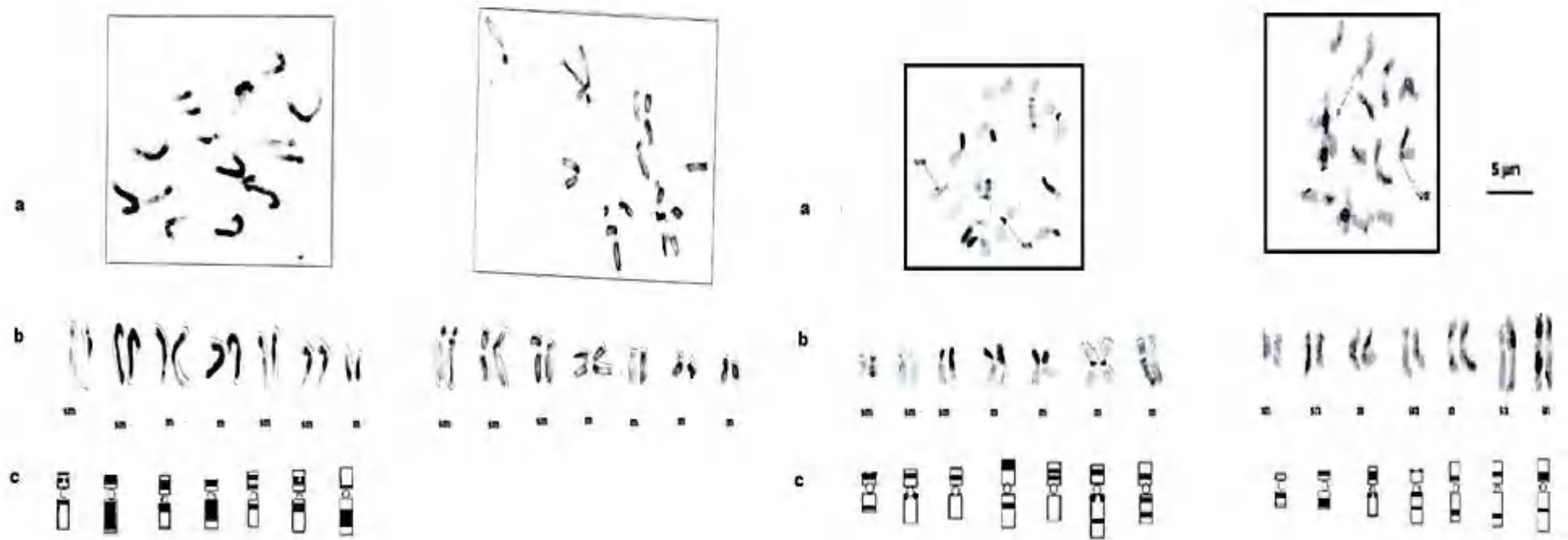


Figure 46 Cayotype en N-banding de l'espece *Lens culinaris* (géotypes Idle1, Idle3 et Dahra)
 a-Plaqué metaphasique
 b- Caryogramme
 c- Idiogramme.

Les N.O.R sont représentés par des **points noirs**, et les bandes N (noirs) correspondant aux séquences d'ADN non codantes.



Figur 47 Cayotype en N-banding de l'espece *Lens culinaris* (géotypes Nile, Idlep2, Ibla et radjes)

a-Plaqué metaphasique

b- Caryogramme

c- Idiogramme.

Les N.O.R sont représentés par des **points noirs**, et les bandes N (noirs) correspondant aux séquences d'ADN non codantes.

Discussion

Suite aux travaux réalisés sur les chromosomes du génome de *Lens culinaris* Medik (Hammouda D., 2015 ; HammadI H *et al*, 2018), la recherche, nous a conduits à l'étude de l'organisation et la localisation des organisateurs nucléolaires (N.O.R) sur huit cultivares appartenant à la même espèce.

La comparaison des chromosomes marqués par les bandes (N), montre une grande hétérogénéité structurale, et la présence ou l'absence des régions organisatrices nucléolaires (NOR).

Comparaison structurale et localisation des NOR

Les chromosomes des cultivares Idlep 3 et Flip 90-31, en comparaison à leurs homologues des autres cultivares, montrent une surcharge en hétérochromatine et un nombre élevé (de 3 à 4) des organisateurs nucléolaires (N.O.R). Par contre, ceux des cultivares Ibla et Redjes sont moyennement riches en hétérochromatine et ils portent moins de NOR (en nombre de 2). Par opposition, les chromosomes du cultivare Syrie229 en sont pauvres et dépourvus de N.O.R.

Nos résultats en confrontation à ceux des auteurs (Mehra,1986; Galasso *et al.*, 2001 ; Gaffarzadeh N *et al.*, 2007) ont prouvé la présence d'une paire de satellite sur le chromosome 4 (bras long proche au centromère) et mettre en évidence un organisateur nucléolaire (N.O.R) sur le même chromosome par hybridation *in situ*, en utilisant la sonde (pTa71) du *Lens culinaris* Medik, alors que dans notre cas, ils sont situés sur les chromosomes (1, 2, 3 et 4) du cultivare Flip90-31, (2 et 6) du cultivare Ibla, (1,2 et 3) du cultivare Idlep3 et sur les chromosomes (2 et 3) du cultivare Redjes. Le cultivare Syrie est le seul en on dépourvu. Les satellites sont toujours associés aux NOR qui codent les gènes).

Hammouda D et Khalfallah N. (2008), travaillant sur les chromosomes des poacées, en pu marquer les chromosomes par des bandes N et ont confirmé que l'hétérochromatine consécutive est localisée près du centromère et du télomère ou des satellites qui possèdent des NOR. Ces derniers contiennent des séquences d'ADN hautement répétées, portant des gènes Ribosomiques.

Rôle des NOR

Ils participent à la formation et au fonctionnement des nucléoles dans les noyaux interphasiques, qui contiennent l'ARN et les protéines ribosomiques (Hayes H., 2000).Donc ils sont associés aux gènes ribosomiques.

3.2.4. Rapport = $\frac{\text{Bandes C}}{\text{Bandes N}}$

Il est important d'apprécier la richesse en hétérochromatine constitutive (bandes N et bandes C) révélée par les techniques de marquage N-banding et C-banding (Selon que les bandes d'hétérochromatine sont plus ou moins épaisses le signe + ou - est affecté à la lettre C ou N). Chez la lentille, l'hétérochromatine peut se révéler N+C+ (Figure 47). En outre, (Hammouda *et al.*, 2017) ont démontré des bandes centromériques sombres observées par le N-banding contrairement aux C-banding chez le blé tendre. Par conséquent, l'hétérochromatine de *Triticum aestivum* L. peut être décrite comme N+C-. ou N+C+. Kakeda, *et al.* 1991) ont décrit l'hétérochromatine de *Hordeum sp* comme N+C-. Mais, seule l'hétérochromatine N+C+ qui coïncidé avec la localisation des séquences d'ADN (GAA)_n, (GAG)_n des satellites (organisateur nucléolaires) (Appels, 1982, Gill, 1991; 1996).

L'importance de l'hétérochromatine dans l'adaptation des espèces végétales aux conditions environnementales a été illustrée par Cassagnau (1974). Ce auteur ont montré une relation entre l'hétérochromatine surchargée et l'adaptation à un nouvel environnement. De plus, Siljak-Yakovlev (1986) ont montré l'importance et le rôle éventuel de l'hétérochromatine dans l'adaptation et l'évolution. De plus, Bernard (1997) attribuent un autre rôle à l'hétérochromatine qui attire les répresseurs pour la protection des zones vitales des génomes (NOR, centromère). Ensuite, l'hétérochromatine a été localisée sur les chromosomes de deux régions principales proches du centromère et dans les télomères ou satellites qui possèdent les régions organisatrices nucléaires (NOR). Ces régions possèdent les gènes responsables du codage de l'ARN ribosomique. En général, l'hétérochromatine représente environ 12 % de la longueur totale des chromosomes en métaphase mitotique Bernard (1997) attribuent un rôle important à l'hétérochromatine dans la répression génique (régulation épigénétique). De plus, l'hétérochromatine serait impliquée dans le contrôle de la transcriptabilité du génome. Ainsi, les gènes localisés dans l'euchromatine peuvent être réduits au silence lorsqu'ils sont placés à proximité d'un domaine hétérochromatique. Ostashevsky (1996) montre que, l'addition des chromosomes "B" peut améliorer les régions organisatrices nucléaires (N.O.R).

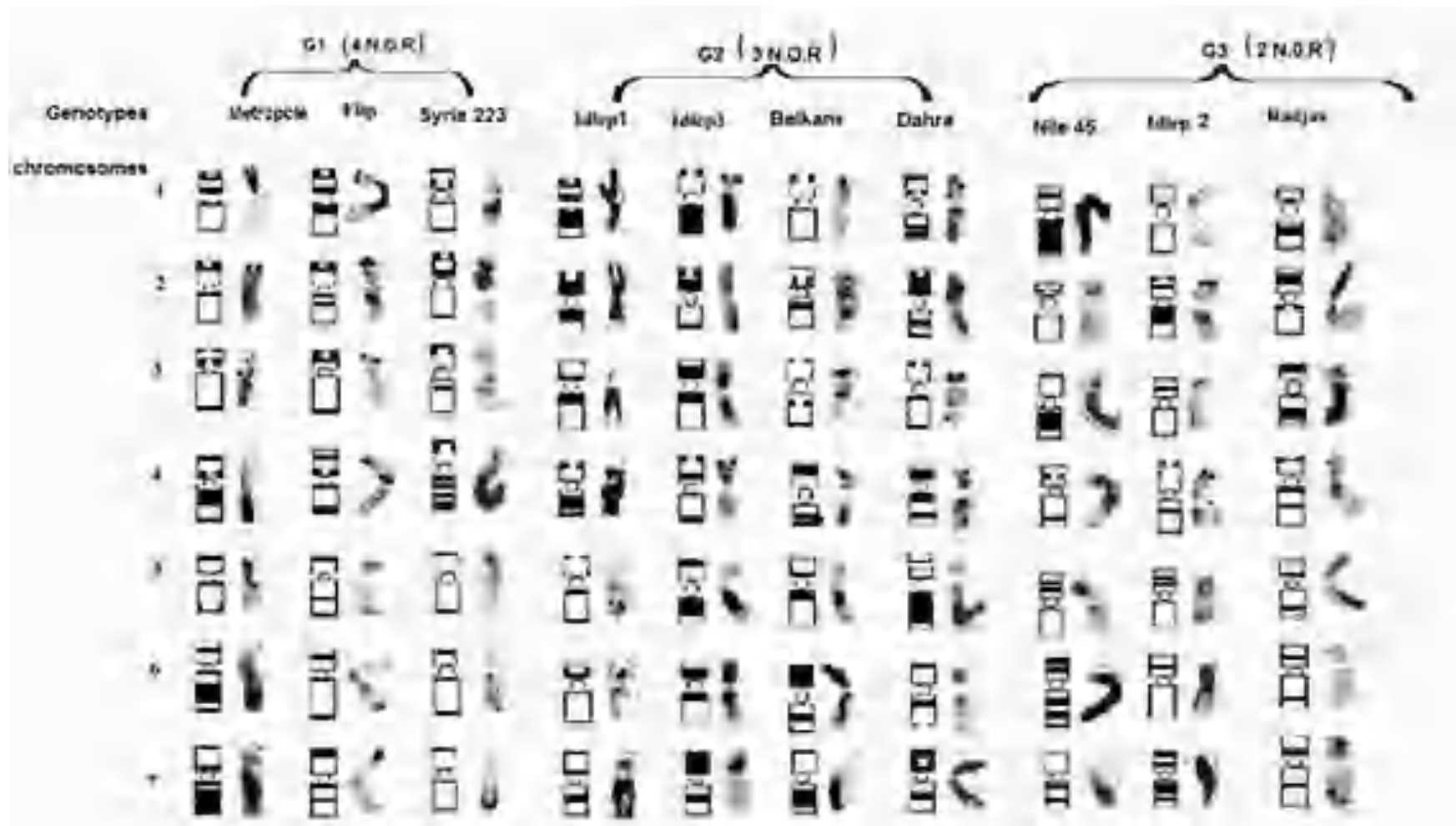


Figure 48: Analyse comparative des chromosomes du génome *Lens culinaris*, marqués par les bandes N. Trois groupes sont détectés : G1 ,G2 , G3.

3.2.5. Cartographie des chromosomes marqueurs

Dans notre étude, les plaques métaphasiques marquées par le N-banding et le C-banding de tous les génotypes de la lentille cultivée (*Lens culinaris*) montrent que l'hétérochromatine (riche en GC) et les organisateurs nucléolaires (N.O.R) sont de bons marqueurs chromosomiques qui ont permis d'identifier individuellement les paires chromosomiques.

Nos résultats sont originaux, nous avons pu déterminer les chromosomes 1,2,3,4 comme marqueurs, alors que les chromosome 5,6,7 en sont dépourvues, et donc, nous pouvons proposer ces chromosomes marqueurs pour l'établissement d'une cartographie cytogénétique de l'hétérochromatine constitutive de notre matériel (Figure 49).

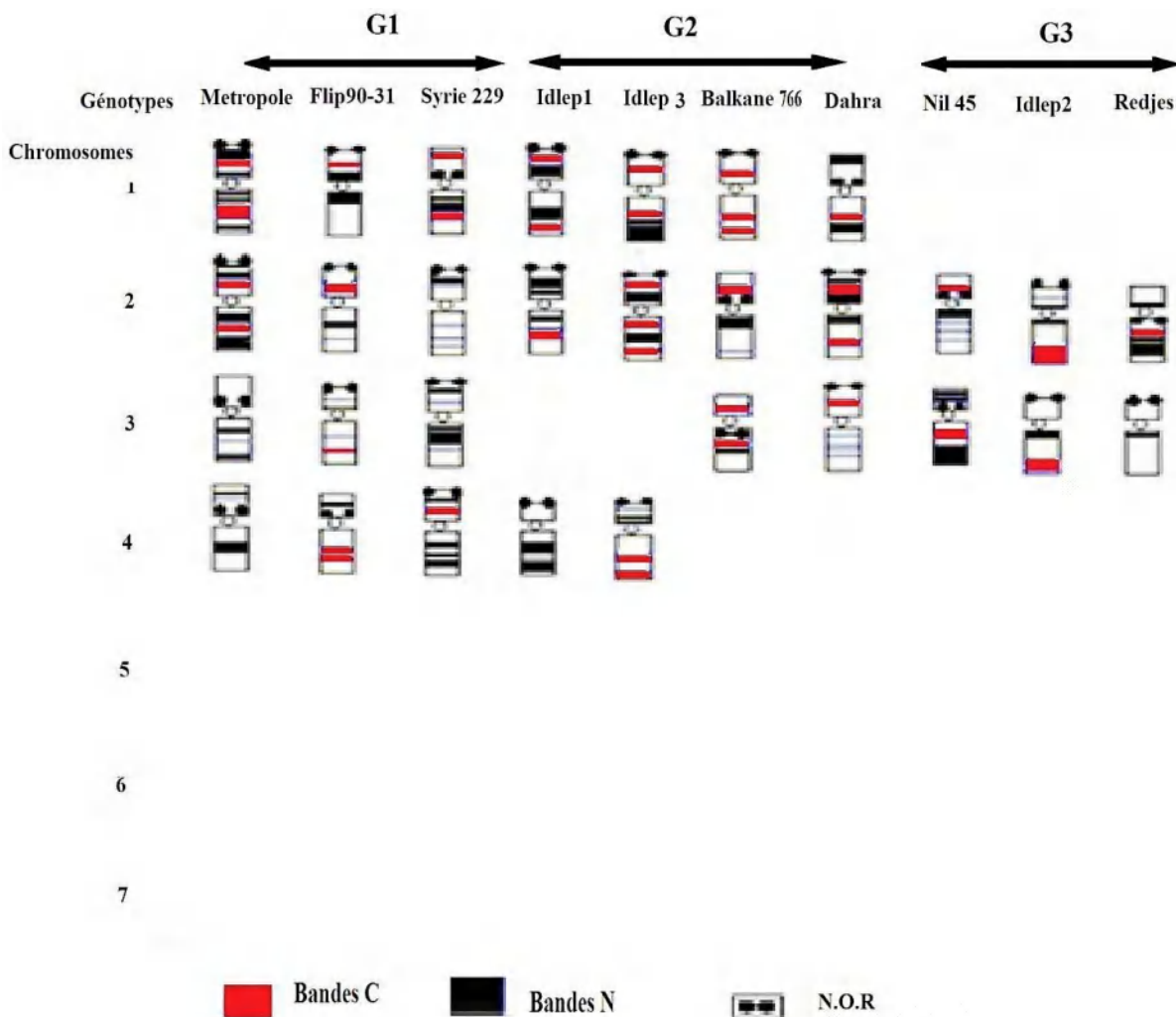


Figure 49: Schéma montrant la localisation de l'hétérochromatine (bandes C et N) et des organisateurs nucléolaires (N.O.R) sur les chromosomes marqueurs.

Nos résultats, en comparaison avec tous les auteurs (Galasso *et al.* 2001, Gaffarzadeh *et al.* 2007) ont montré l'existence de chromosomes B surnuméraires, observés chez Dahra et Balkane755 (au nombre de 1), les cultivares Flip 90-31 (au nombre de 2) et le cultivare Idlep2 (au nombre de 3).

Selon les (Yakovlev, 1986, Bernard, 1997, Hammouda ; 2008), l'apparition de ces chromosomes B est une forme d'adaptation de l'espèce à des conditions d'environnement difficiles. L'existence d'une corrélation entre leur présence et la répartition écologique des populations, notée par John *et al.* (1982) a montré que les populations de *Myrmeleotettix maculatus* présentent plusieurs chromosomes B dans les régions sèches et chaudes, alors que dans les climats plus humides et plus froids ces chromosomes sont présents en petit nombre, voire absent. Ces auteurs concluent que les chromosomes B jouent un rôle dans l'adaptation des organismes aux variations environnementales. Selon Hammouda et Khalfallah, (2008 , 2013, 2015), il existe une corrélation positive entre le taux d'hétérochromatine constitutive et l'augmentation du nombre de chromosomes B dans triticales (8x et 6x).

3.2.6. Analyse du comportement méiotique

Les comportements méiotiques sont analysés dans des cellules mères de pollen (CMP) afin de déterminer les associations chromosomiques, de noter les anomalies et de confirmer les résultats obtenus en mitose.

Suite aux travaux réalisés par (Hammouda et Khalfallah 2009, Hammouda et Khalfallah, 2015, Hammadi *et al.*, 2018) sur l'analyse mitotique approfondie des chromosomes de la lentille, L'étude méiotique nous a conduit à une analyse des stades, afin, d'affirmer ou infirmer si **la méiose est régulière ou irrégulière ?**.

Nous nous intéressons à l'étude du comportement méiotique et les anomalies chromosomiques sur 6 cultivars de la lentille (Idleb3, Idleb4, Dahra, Syrie229, Redjes, et Balkane755). La figure ci-dessous (Figure 49) montre les principales phases de la méiose observées.

a- Identification des bivalents

Les dénombrements des bivalents méiotiques sont effectués aux différents stades (soit en Métaphase I, soit en zygoténe) des cellules mères polliniques. Les résultats obtenus montrent une ségrégation normale à 7 bivalents ($2n = 2x = 14$) de l'espèce *Lensculinaris*.

Les différentes configurations méiotiques montrent que l'appariement des chromosomes homologues se fait sous différentes formes, bivalents en anneaux, bivalents droits, et bivalents en V (Figure 50) et (Figure 51a), Ces bivalents forment ensuite, la plaque équatoriale.

b- Les anomalies méiotiques

Également, nous avons pu mettre en évidence des anomalies chromosomiques de types (Figure 51b)

- Chromosomes retardataires.
- Les micronoyaux.
- Orientation anormale.
- Chromosomes B.

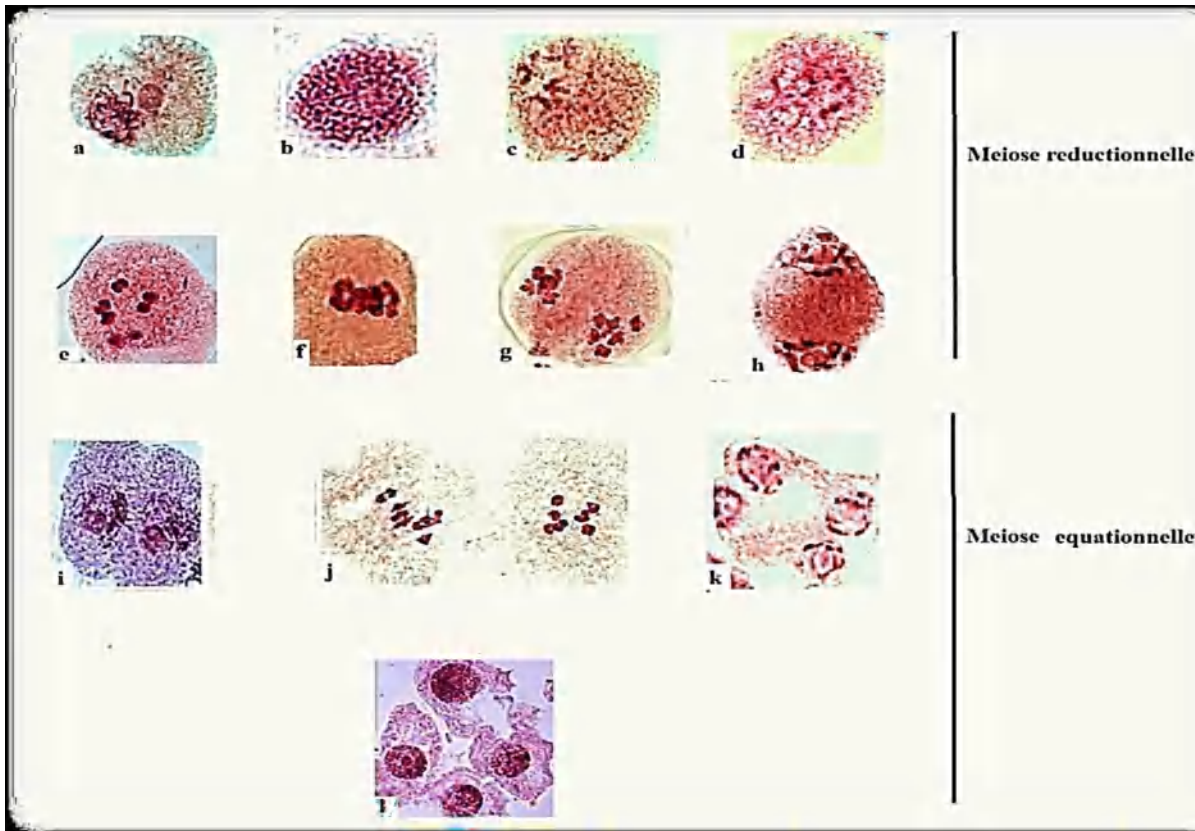


Figure 50: Les différentes étapes de la division méiotique des cellules mères polliniques de 4 cultivares de l'espèce *Lens culinaris* observés au microscope photonique (X100).

- (a) : prophase au stade : Leptotène } cultivares Dahra
- b-c-d : prophases aux stades : (a), Zygotène, (b) Pachytène, (c) Diplotène. cultivares Syrie 229
- (e) : Diacynèse } cultivare Redjes
- (f) : métaphase I } cultivare Syrie 229
- (g) : anaphase I } cultivare Balkane 755
- (h) : fin de l'anaphase I } cultivare Syrie 229
- (i) : téléphase I
- (j) : prophase II } cultivare Redjes
- (k) : métaphase II } cultivare Syrie 229
- (l) : anaphase II } cultivare Redjes
- (m) : tetrade (fin de la téléphase II) } cultivare Redjes

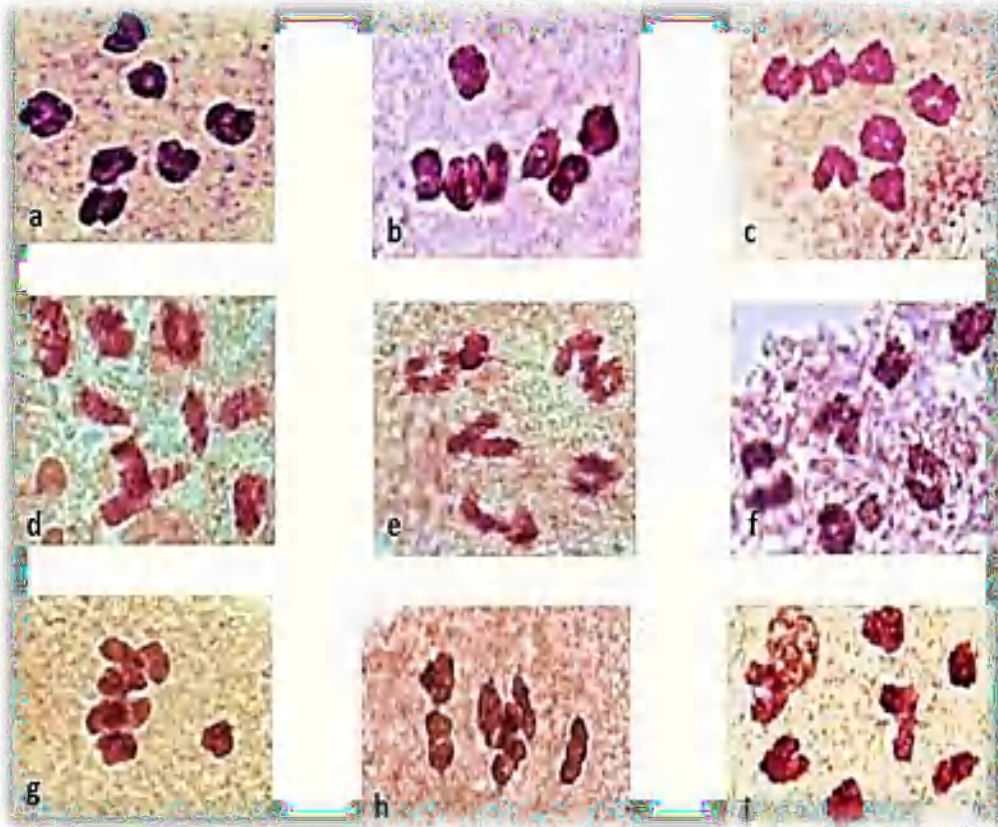


Figure 51a: Principales types de bivalents observés en Métaphase I observé au microscope Photonique (X100). (a-b) : bivalents en anneaux, (c) : bivalents en bivalents allongés, et bivalents en V (i) : bivalents allongés, et bivalents en V.

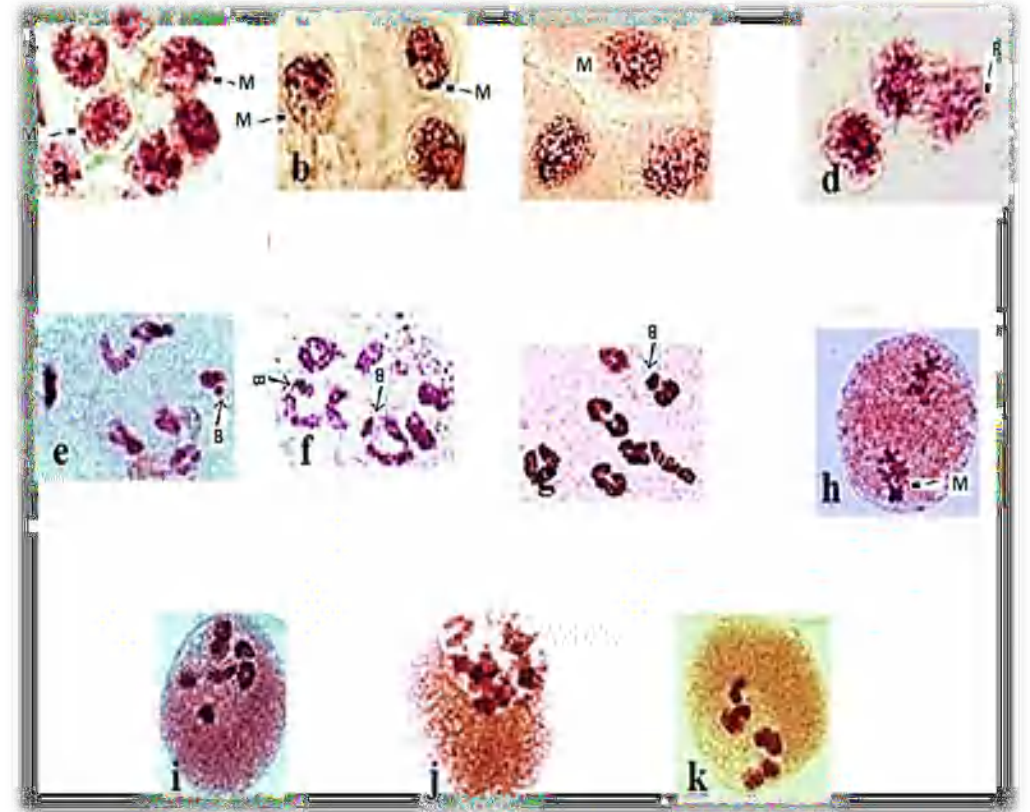


Figure 51b : Les anomalies associées aux méioses polliniques observées au microscope photonique (X100) chez les cultivars « Idleb3 », « Idleb4 », « Dahra », « Syrie 229 », « Redjes » de l'espèce *Lens culinaris*. **M** (micronoyaux), **B** (Chromosomes surnuméraires), **R** (chromosomes retardataires) et orientation anormale (**i, j, k**).

Discussion

La méiose est une étape essentielle de la reproduction sexuée des organismes. Les différentes étapes méiotiques sont communes pour la plupart des organismes diploïdes. Dans cette étude, le déroulement de la méiose est suivi pour les génotypes de l'espèce *Lens culinaris* afin d'observer les différentes étapes, d'identifier les bivalents chromosomiques et mettre en évidence les anomalies chromosomiques.

Les résultats obtenus chez *Lens culinaris* ($2n = 2x = 14$ avec $x = 7$), en comparaison à ceux observées par **Seyed and Arash (2006)** qui signyalei que la méiose chez six cultivars était régulière et présentait sept bivalents à la diacinèse et à la première métaphase sont similaires. En comparaison aussi à ceux observés chez le genre *Medicago* (Fabacées), ($2n = 2x = 16$ avec $x = 8$) **Abdelguerfi et al., (1988)** ; **Benhizia et al., (2013)** sont similaires.

L'analyse des cellules mères polliniques pour les différents génotypes à différents stades de la méiose pour l'espèce *Lens culinaris* a donné des résultats nettement différents illustrés dans la (figure 37) qui ont permis de visualiser des irrégularités méiotiques. Les différentes anomalies observées sont la présence des cellules mères polliniques métaphasiques montrant des chromosomes B, des chromosomes retardataires, des micronoyaux, et une orientation anormale. Ces anomalies ont été signalé dans un grand nombre de plantes (**Stebinn, 1971, Amirouche, 2007, Hammouda et Khalfallah, 2009**).

Chez le cultivare Syrie 229, on a observé une migration anormale de chromosome à un seul pôle ce résultat a suggéré que cette anomalie dite « Orientation anormale » était causée par le stress environnemental qui affectait les plantes au cours de la période de floraison comme les basses ou hautes températures, stress hydriques, attaques parasitaires. L'appareil de la broche est normalement bipolaire et agit comme une unité unique, joue un rôle crucial dans l'alignement des chromosomes de la métaphase et leur mouvement vers le pôle pendant l'anaphase (**Nirmala et Rao, 1996**). La distorsion dans les broches méiotiques peut être responsable de la formation de gamètes non réduits. Des fusées aberrantes lors de la deuxième division entraînant la reprise des produits de

la première division ont été largement signalées dans les pommes de terre, trois des types de broches aberrantes ont été trouvés dans cette espèce (**Mok & Peloquin, 1975**) Ces anomalies pourraient être un phénomène normal commandé par des facteurs génétiques comme il à été proposé par différents travaux (**Sharma, 1983**).

3.2.7. Viabilité et caractères morphologiques du pollen

3.2.7.1. Viabilité des grains de pollen

La viabilité du pollen est estimée après coloration avec le carmin acétique est très importante chez les cultivares étudiés dont le dénombrement des grains colorés et non colorés nous a conduit à calculer le pourcentage des grains colorés (Figure 52), les grains de pollen colorés en rose, sont considérés comme viables (Figure 52). (Reflétant la viabilité). Les résultats donnés dans le tableau (Annexe), indiquent une viabilité pollinique supérieure à 95%. L'étude palynologique de Redjes n'a pas été réalisée par manque de matériel (fleurs).

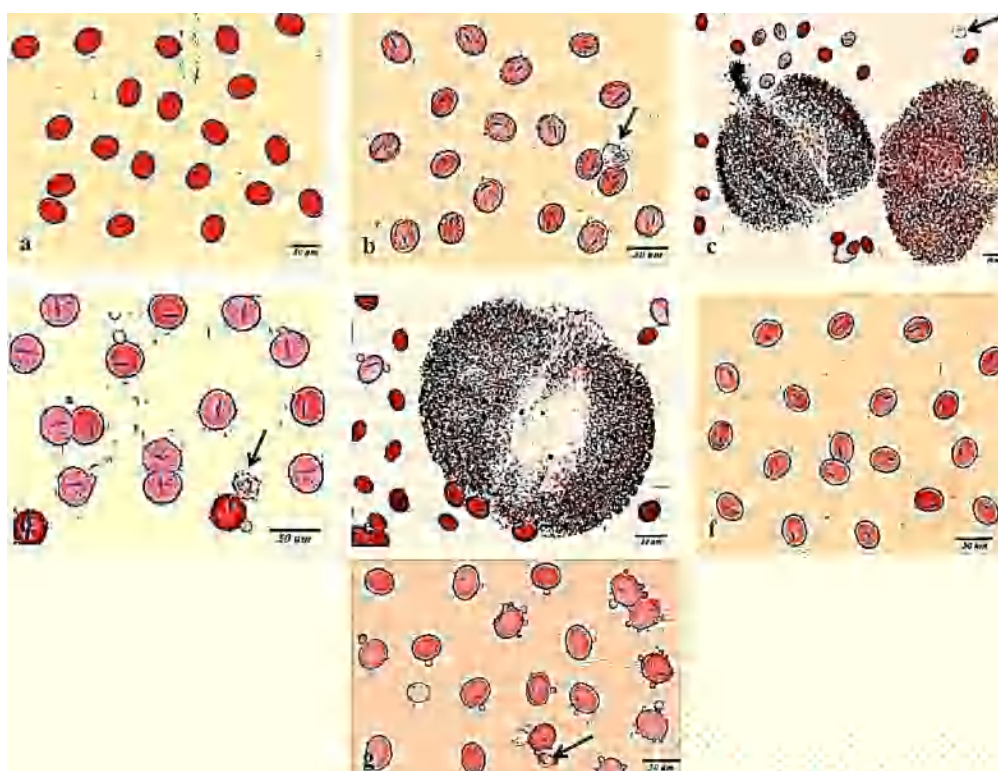


Figure 52 : Pollens observés au microscope photonique (X10) chez les cultivares étudiés. (c)-(e) représentent les anthères avec ses pollens. Les flèches indiquent le pollen non viable (transparent).

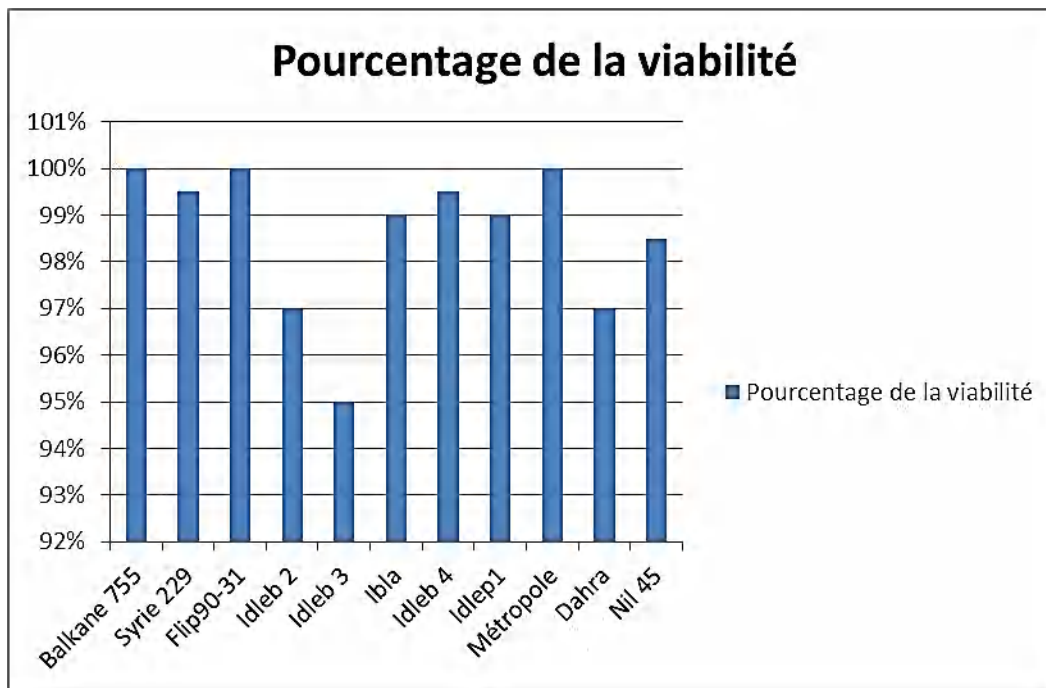


Figure 53 : Pourcentage des grains colorés de différents cultivares chez la lentille *Lens culinaris*.

Le taux de viabilité hautement élevé chez tous les cultivares. On remarque que les deux cultivares Balkan755 et Métropole présentent un pourcentage de coloration très élevés (100%), par opposition, le cultivare Idleb3 présente une valeur un peu faible par rapport aux autres (95%).

3.2.7.2. Caractères morphologiques des grains de pollen

Nous avons pu traiter les paramètres suivants :

Longueur et largeur des grains de pollens

On constate une différence entre les cultivares étudiés que ce soit en longueur ou en largeur. Pour la longueur la plus élevée est observée chez le cultivare Idleb3 de (35.75 μm) et pour la largeur c'est le cultivare Idleb2 de (24.04 μm).

Le cultivare Métropole qui représente les valeurs les plus faibles (29.91, 21.37 μm successivement) (Tableau 15, Figure 54, Figure 55).

Rapport L/E

A travers les mesures de la longueur et la largeur nous avons calculé le rapport L/E. Les résultats sont présentés dans la figure 54 : On remarque une grande différence entre les cultivares étudiés dans le rapport de la longueur sur la largeur. Pour le rapport le plus élevé est celui de le cultivare

Balkane755 (1.50 μ m) par contre le cultivare Idleb2 qui présente la valeur la plus faible (1.34 μ m).

Longueur et largeur de sillon

D'après les résultats obtenus, on constate que les proportions sont hautement variables. Pour la longueur de sillon les plus élevées est celle de cultivares Idleb3 et Nil45 de même fréquence de (26.32 μ m) .Le cultivare Dahra, en comparaison aux autres cultivare se singularise par une longueur faible de (23.26 μ m) et une largeur élevée de (4.80 μ m) et pour la faible largeur c'est le cultivare Métropole de (2.36 μ m) (Taleau15, Figure 54 et Figure 55).

Longueur et largeur de pore

Pour ce paramètre, le cultivare Idleb2 présente la valeur la plus élevés (8.88 μ m) Alors qu'Idleb4 présente, la plus faible valeur (6.79 μ m). On observe qu'il y a une légère différence entre ces génotypes étudiés dans ce paramètre. Pour la largeur de pore les plus élevées est celle de génotype Nil45 (6.66 μ m).Et le cultivare Balkane755 représente la valeur la plus faible (5.14 μ m) (Taleau15, Figure 54 et Figure 55).

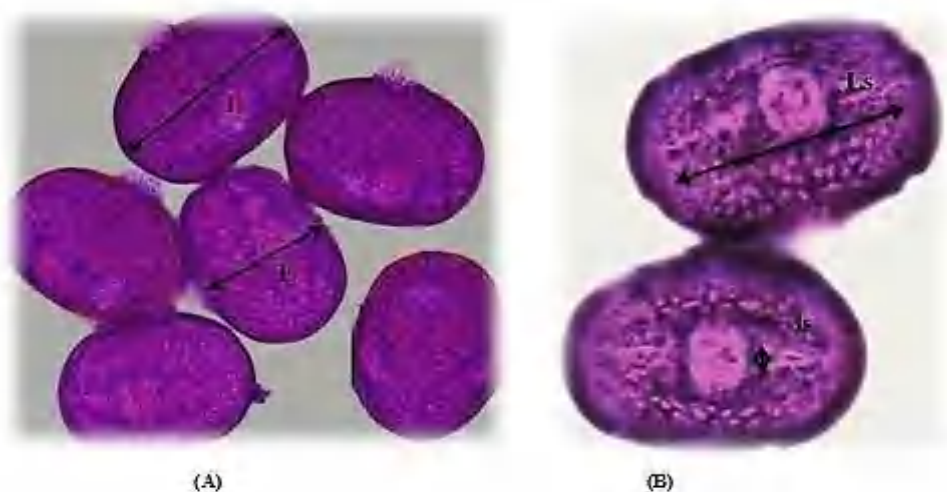


Figure 54: Mesures (L) Longueur (E) largeur des grains de pollen. (x100) de cultivare Idleb2. Mesures (Ls, ls) de taux de sillon des grains de pollens (x100) de cultivare Idleb2. (Ls) Longueur (ls) largeur de sillon des grains de pollen.

L'analyse morphologique d'après la valeur du rapport **P/E** confirme que la forme des grains de pollen de nos cultivares est **Prolate** (Figure 54B) qui est de fréquence 133-200.

Un examen au microscope a été effectué pour déterminer l'aspect morphologique des grains de pollen. Toutes les cultivares de l'espèce *Lens culinaris* présentent des eumonades (grains de pollen libres) à 3 ouvertures complexes (3 sillons méridiens associés à 3 pores équatoriaux) : ils sont de type **tricolporé** (Figure 55).



Figure 55: Pollen observé au microscope photonique (X100), (a) vue équatoriale de cultivare Dahra, (b) vue polaire de cultivare Balkane 755.

Tableau 15 : Données morphométriques des grains de pollen des cultivares de *Lens culinaris*.

cultivares	L (μm)	E (μm)	L/E	L/Ex100	Ls (μm)	ls (μm)	Lp (μm)	Lp (μm)	Forme	Apperture	v
Balkane7 75	32.799	21.826	1.502	150.2	24.10 9	3.033	7.365	5.14 8	Prolate	tricolporé	100 %
Dahra	30.964	21.508	1.439	143.9	23.26 1	4.800	7.757	5.97 8	Prolate	tricolporé	97%
Idleb2	32.358	24.041	1.345	134.5	25.14 8	4.270	8.880	6.50 7	Prolate	tricolporé	97%
Idleb3	35.753	23.520	1.492	149.2	26.32 0	3.306	7.883	6.28 1	Prolate	tricolporé	95%
Idleb4	31.342	21.957	1.427	142.7	24.34 6	3.042	6.795	5.57 9	Prolate	tricolporé	99.5 %
Métropol e	29.911	21.374	1.399	139.9	25.72 3	2.362	6.902	5.95 4	Prolate	tricolporé	100 %
Nil 45	34.013	23.406	1.453	145.3	26.32 3	3. 823	8.330	6.66 1	Prolate	tricolporé	98.5 %

V : viabilité (%) ; **L** : Longueur de grains de pollens, **E** : largeur de grains de pollen, **Lp** : longueur de pore

L/E : le rapport de longueur sur largeur, **Ls** : longueur de sillon, **ls** : largeur de sillon, **lp** : largeur de pore.

Discussion

Très peu de travaux sont réalisés sur les grains de pollens de la lentille cultivée, et n'étudient les critères morphologiques utilisés sont :

-forme du grain de pollen (longueur et largeur).

- le rapport L/E, longueur et largeur du sillon et celle du pore (Özler et al., 2009) sont très importants pour la caractérisation des espèces (Mbagwu et Edeoga 2006).

En comparaison aux 'Asteracées', la taille des grains de pollen varie d'une variété à une autre et correspond à la taille moyenne des grains de 'Fabacée' déjà observée (Pinar et al., 2014, Baziz, 2015).

Nos résultats en confrontation avec ceux observés par les auteurs (Ressayre et al., 2002) montrent deux types : tétrades tétraédriques et rhomboïdales (Figure 56a, b) (Figure 56a, b).

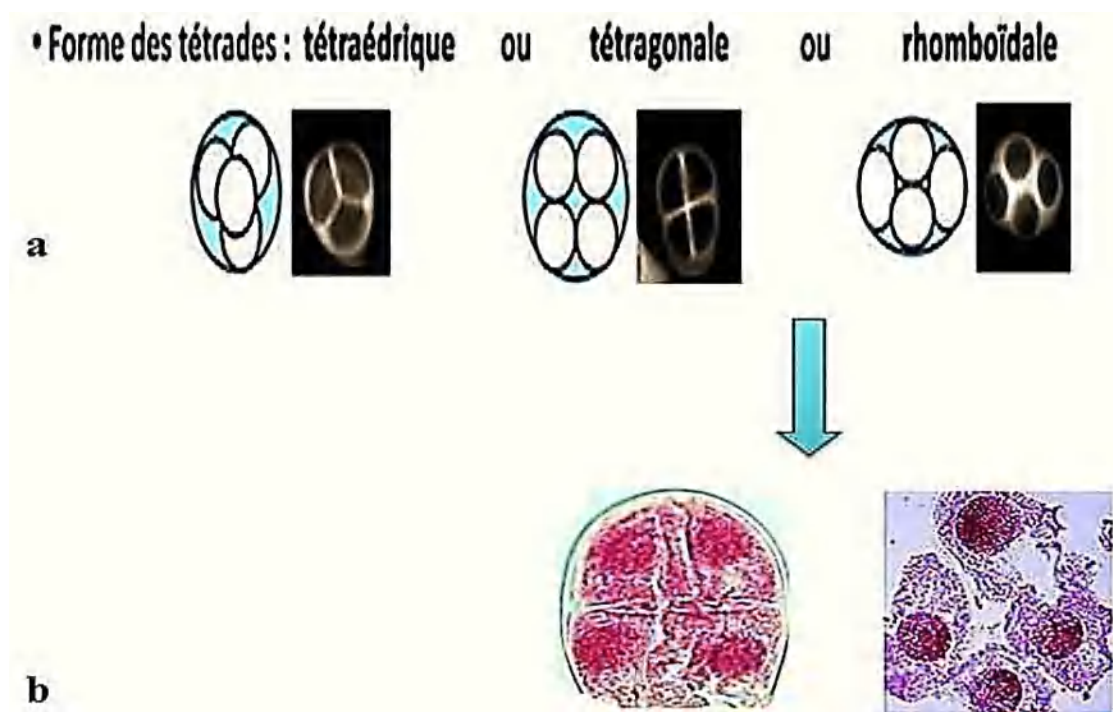


Figure 56 : (a) Types de tétrades (d'après la référence. Ressayre et al., 2002). (b) **Tétrades tétraédriques et rhomboïdales** de l'espèce *Lens culinaris* observée au microscope photonique (X100). Echelle 10µm.

La forme des grains de pollen du genre *Lens* analysés est de type prolate est un peu identique par rapport aux d'autres espèces du genre *Centaurea* de la famille des 'Asteracées' qui sont de forme prolate sphéroïdal (Villodre & Garcia-Jacas, 2000, Benamara M, 2015).

Les apertures des grains de pollen tricolporée de *Lens* sont conformes à ceux observés chez les espèces du genre *Centaurea* qui sont les plus répandues. D'après Özler et al., 2009, les grains de pollen sont rarement tétracolporés.

D'après Walker et Doherty (1975) considèrent que le pollen inaperturé est un caractère relativement plus primitif que celui monoaperturé, di-, tri- et poly-aperturé.

Till et al., (1987), Dajoz et al., (1991), Domnez et Pinar (2001), Furness et Rudall (2004) s'accordent à dire que l'aperture étant le point de germination du tube pollinique, une multiplication du nombre d'apertures et de sillons peut apparaître comme un avantage sélectif vis-à-vis de la fécondation car elle augmente la probabilité de contact entre le site de la germination et la surface du stigmate. La présence de trois sillons et de trois pores pourrait donc être considérée comme un caractère intermédiaire et avancé (in Baziz, 2015).

Viabilité des grains de pollen

La viabilité des grains de pollen est l'un des facteurs qui influent le pouvoir germinatif (Goudgil H, 2014).

Dans cette étude, nous avons utilisé la coloration au carmin acétique qui révèle la présence de matériel génétique dans le grain de pollen. La viabilité de ces grains a été définie comme ayant la capacité de vivre, grandir, germer ou se développer (Lincoln et al., 1982).

Towill (1985) estime que le test de viabilité est suffisant pour avoir une estimation approximative de la viabilité du pollen. L'évaluation de ce taux a révélé un très grand pourcentage de viabilité qui traduit un déroulement normal de la microsporogénèse (ou gaméto-genèse).

Stebbins (1971) indique que les espèces diploïdes produisent une méiose régulière, ce qui est confirmé par nos travaux chez la lentille. Donc, la méiose régulière s'exprime par la production de grains de pollen de taille régulière et hautement viable.

D'autres travaux confirment que le taux élevé de viabilité est également considéré comme un indicateur de l'adaptation des espèces à certaines conditions écologiques (Char et al., 1973 ; Qureschi et al., 2002), et joue un rôle important dans la sélection végétale (Ozeker et al., 2006 in Benhizia, 2014). On peut conclure que nos génotypes sont bien adaptés à la condition de leur milieu de vie.

Conclusion

Le travail que nous avons entrepris a permis d'élargir nos connaissances sur les aspects cytogénétiques de la lentille cultivée (*Lens culinaris* Medik, $2n=2x=14$), concernant :

- la forme des chromosomes pour établir le type de caryotype qui est symétrique:

La comparaison des idiogrammes obtenus lors de l'étude des génotypes de *Lens culinaris* révèle quelques différences remarquables pour la taille des chromosomes, la localisation et le nombre de satellites et de constructions secondaires. Contrairement aux cultivares Syrie 229, Dahra et Idlep1, les cultivares Métropole et Flip90-31 présentent une seule paire de satellites localisée sur le chromosome 4. Seul le cultivare Métropole qui se singularise par la présence d'une construction secondaire sur le chromosome 3 (bras long). En général, la formule caryologique du *Lens culinaris* est définie comme: $n = x = 7 = 4m + 3 Sm$.

- la structure des chromosomes, par la détermination du taux d'hétérochromatine de *Lens culinaris*, qui est décrite comme $C+N+$, e coïncidant avec la localisation des séquences d'ADN $(GAA)_n$, $(GAG)_n$ des satellites (organiseurs nucléolaires).

- La corrélation entre le taux d'hétérochromatines et le nombre des organisateurs nucléolaire (N.O.R).

- La détermination des facteurs d'adaptations (chromosomes B et l'hétérochromatine) pour les cultivares étudiés.

- signalons que le cultivare **Dahra** présente un taux de polymorphisme majoritaire par rapport aux autres cultivares, des bandes hétérochromatiques ($C+$) épaisses et intenses, présence des satellites (1^{er} et la 2^{ème} paire), un chromosome B ainsi qu'une construction secondaire, ce qui la rendre un cultivare modèle pour l'espèce *Lens culinaris* Medik.

- Les cultivares Dahra, Nile45, Idlep2, Idlep3, Balkan 755(**G2**) montrent un surcharge en hétérochromatine constitutive. Les cultivares Syrie 229, Métropole, Flip 90-31(**G3**) en sont moyennement riches. Alors que, les cultivares Redjes et Idlep1(**G1**) en sont pauvres .

- La comparaison des régions organisatrices nucléolaires (N.O.R.) marquées (par les bandes N) sur les chromosomes des génotypes a montré trois groupes:
 - **Groupe 1 (4 N.O.R.)** composé de trois cultivares (Métropole, Flip 90-31, Syrie 229).
 - **Groupe 2 (3N.O.R)** est composé de quatre cultivares (Idlep1, Idlep 3, Belkane755,Dahra).
 - **Groupe 3 (2 N.O.R)** contient trois cultivares (Nile 45, Idlep2, Redjes).

-Nos résultats sont originaux, nous avons pu déterminer les chromosomes 1,2,3,4 comme **marqueurs**, alors que les chromosome 5,6,7 en sont dépourvus, et donc, nous pouvons proposer ces chromosomes marqueurs pour l'établissement d'une cartographie cytogénétique de l'hétérochromatine constitutive (bandes C, bandes N) et les N.O.R de notre matériel.

-L'analyse du comportement méiotique au niveau des cellules mères des grains de pollen (CMP) montre a un même déroulement de la méiose, et en métaphase I, les 7 bivalents sont comptés sur certaines cellules des cultivares. Donc, d'une manière générale, la méiose est régulière.

-L'analyse palynologique montre une variation en taille des grains de pollen mais signaler un seul type de la forme des grains de pollen « prolata » de type « tricolporate».

-Un taux élevé de viabilité est également considéré comme un indicateur de l'adaptation et la sélection des espèces à certaines conditions écologiques. On pourrait donc suggérer que nos cultivares sont bien adaptés à leurs milieux.

3.3. Analyse biochimique

Les résultats de ce paragraphe ont fait l'objet d'une publication dans la revue **BIODIVERSITAS** ISSN: 1412-033X, Volume 22, Number 6, June **2021** , Pages: 3494-25 , E-ISSN: 2085-4722. DOI: 10.13057/biodiv/d220659.

Genetic diversity in several genotypes of Algerian lentil using biochemical markers

HAMIDA HAMMADI^{1,2*}, DOUNIA HAMMOUDA-BOUSBIA^{1,2}, GHANIA CHAIB², ANFEL TIR³

¹Laboratory of Biochemistry, Genetic and Vegetal Biotechnology, University of the Brothers Mentouri, Constantine 1, Route de Ain El bey, Constantine 25000, Algeria

²Department of Biology and Plant Ecology, Frères Mentouri University, Constantine 1, Route de Ain El Bey, Constantine 25017, Algeria.
Tel.: +213-557396170, *email: hammadihamida@gmail.com

³Biotechnology Research Center (CRBT), BP E73, LIV 03, Nouvelle Ville Ali Mendjil, Constantine, Algeria

Manuscript received 17 February 2021, Revision accepted: 30 May 2021.

Abstract. Hammadi H, Hammouda-Bousbia D, Chaib G, Tir A. 2021. Genetic diversity in several genotypes of Algerian lentil using biochemical markers. *Biodiversitas* 22: 3494-2500. Studying seed storage proteins in legumes (Fabaceae) is very important besides its economic value; seed storage proteins play an important role in plant taxonomy because of the stability of their contents. The grain protein content and protein profiles of 12 lentil genotypes (*Lens culinaris* Medik.) were characterized based on protein profiling through SDS-PAGE. The obtained gel has shown forty bands ranged from 13 to 21 with molecular weight 10 to 120 kDa. Of which six monomorphic bands, thirty-four polymorphic bands and five unique bands in Flip90-31, Idlep3, Idlep2, Idlep4 and Radjas genotypes. The protein banding pattern polymorphism (84%) revealed an inter-genotypic variability. The Idlep3 genotype is characterized by specific bands (or a specific marker), followed by the Flip90-31 genotype. So these two genotypes can be considered as valuable gene resources for further breeding programs.

Keywords: Genotypes, *Lens culinaris*, protein, profiling, polymorphisms, SDS PAGE

Abbreviations: BPB: bromophenol blue; BSA: Bovine Serum Albumin; CBB: Coomassie brilliant blue; kDa: KiloDaltons; Mw: molecular weight; Rm: relative mobility; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

INTRODUCTION

Lentil (*Lens culinaris* Medik.) is one of the ancient legumes to be cultivated in the world (Abraham 2015), the trace of the *L. culinaris* in Greece dates from 11,000 BC, and in Syria dates from 8,500. His center of origin is located in the Near East, and the cultivation of the species has started in this region BC (Ladizinsky 1979). It is self-pollinating, diploid ($2n = 2 \times = 14$ chromosomes), Lentil seeds are rich in high levels of antioxidants, proteins, vitamins, minerals and dietary fiber for nutrition (Karimizadeh et al. 2012) and play an important role in crop rotations because of their nitrogen-fixing capability. Lentil in Algeria has great importance in living and is included in the daily diet, and therefore it is the focus of several different studies in cytogenetic, genetic, and morphological fields (Hammouda and Khalilallah 2015; Hammadi et al. 2018; Gaad et al. 2018). However, there are no studies on seed storage protein profile using SDS-PAGE technique on lentils in Algeria.

The seeds of plants are not only organs of propagation and dispersal but also the major plant tissue harvested by humans. There are significant amounts of protein in the seeds and vary from one type to another, for example, 10% (in grains) 40% (in legumes) of the dry weight, which constitutes a major source of dietary protein (Arslan 2012). Storage proteins are vital because they determine not only

the total protein content of seeds but also their quality for different uses (Arslan 2012).

Multiple markers, including biological and morphological markers that are used for long, can mainly detect genetic diversity time (Abdul-Razzak and Omer 2017). However, these markers are affected by environmental conditions and have some limitations. Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of storage seed proteins is the most commonly used method to discriminate the varieties, and it is used for selection and genetic diversity analysis (Arslan 2012) of lentil and other crops. It has been applied to several organisms: bacteria, animals, and plants because it is relatively simple and easy to achieve. The present investigation involves: (i) Determination of protein content of the lentil genotypes; (ii) Determination of the profile of seed storage proteins in certain genotypes; (iii) Cluster analysis for the assessment of differences between genotypes; (iv) The highlighting the intra-specific and inter-genotypic polymorphism(s); (v) Assessment of genetic distances.

The genetic relationship was discovered in this study may form the basis for future systematic lentil breeding programs. The aim of the present study was to find out genetic diversity of 12 different genotypes of lentils using protein profiling by SDS-PAGE.

MATERIALS AND METHODS

The study was conducted at National Research Center of Biotechnology, Constantine, Algeria (CRBt). The plant material consists of twelve genotypes (Figure 1, Table 1) of *Lens culinaris* (2n=2x=14), from different regions in Algeria.

Protein extraction

The grains of lentil were ground to fine powder and 10 mg was weighed in 1.5 ml microtube, 400 µl protein extraction buffer (Tris-Hcl 0.05M (pH 8), 0.02% SDS, 30.3% urea, 1% 2-mercaptoethanol) was added to each micro-tube, kept overnight at 40°C and centrifuged at 13000 rpm for 10 min. The supernatant contain dissolved extracted protein ready for experiment purposes, which could be kept for longer time at 4°C.

Protein estimation

Protein estimation of extracts was measured immediately and directly from the supernatant by dye-binding assay as described by (Bradford 1976).

Electrophoresis

Before starting the electrophoresis process, 50 µL supernatant was mixed with 10 µL sample buffer and heated in a 1.5 ml Eppendorf tube in the water bath at 95°C for 5 min to denature the protein. After that, the protein samples were subjected to one dimensional (SDS-PAGE) in a gel slab of 1 mm thickness (5% stacking gel = 2.5 cm height and 15% separating gel= 5.5 cm height) as described by Laemmli (1970). Electrophoresis was performed with a discontinuous buffer system in a vertical electrophoresis unit. The gel was run until the bromophenol blue marker had reached the bottom of the gel. The gel was stained in a staining solution (10% Ethanol; 6.6% acetic acid 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250) overnight. The gel was destained in the de-staining solution (40% ethanol; 7% acetic acid) overnight until the color of background disappeared. Finally, gels were photographed and scanned using Bio-Rad software. Detailed analysis of protein and patterns in terms of band number, mobility of protein bands, staining intensity, band percentage, and the determination of molecular weight of each band.

Table 1. Genotypes lists and their origins of *Lens culinaris*

Under species	Genotypes	Generation	Origins	Source
<i>Microsperma</i>	Syrie229	F6	ICARDA(Syria)	ITGC El Khroube
	Dahra	F6	Local selection (Tieret, Algeria)	ITGC Setif
	Idlep1	F5	ICARDA(Syria)	ITGC Mila
	Idlep2	F6	ICARDA(Syria)	CNCC El Khroube
	Idlep3	F6	ICARDA(Syria)	ITGC Setif
<i>Macrosperma</i>	Jbla Flip90-31	F6	ICARDA(Syria)	ITGC El Khroube
	Balkane775	F6	ICARDA(Syria)	CNCC El Khroube
	Metropole	F5	Isolated in 1941, France	ITGC El Khroube
	Nil45	F6	ICARDA(Syria)	CNCC El Khroube
	Radjas	/	local Selection(Algeria)	ITGC Mila

Note: ICARDA: International Center for Agricultural Research in the Dry Areas, Aleppo, Syria; ITGC: Technical Institute of Field, Constantine, Algeria; CNCC: National Center of Control and Certification of seeds and plants, Constantine, Algeria.



Figure 1. The seeds of 12 lentils (*Lens culinaris*) genotypes used in this study

Table 2. Molecular weight (presence of bands (+), absence of bands (-)) of seed storage protein in 12 lentil genotype using SDS-PAGE (M: monomorphic bands, P: polymorphic bands, U: unique bands)

Band no.	Mw kDa	Idlep3	Syrie229	Idlep2	Ibla	Idlep1	Radjas	Flip90-31	Metro-pole	Idlep4	Nile45	Balkane755	Dahra	Band type
1	120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
2	114.9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	P
3	112.1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	P
4	111	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
5	99.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	P
6	98.2	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	P
7	96.6	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	P
8	94.8	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	P
9	92.6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	u(+)
10	91.0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	u(+)
11	88.7	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	P
12	87.5	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	P
13	81.0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	P
14	79.8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	P
15	72	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	P
16	71.4	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	P
17	70.2	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	P
18	64.4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	P
19	63.8	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	P
20	62.8	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	P
21	61.2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	P
22	60.7	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	P
23	55.0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
24	51.8	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	u(+)
25	50.0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	u(+)
26	47.9	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	P
27	40.5	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	P
28	34.2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	P
29	30.7	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	P
30	29.8	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	P
31	28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
32	19.4	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	u(+)
33	17	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	P
34	16.8	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	P
35	15	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	P
36	14	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	P
37	13.5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	P
38	11.5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
39	10.3	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	P
40	10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	M
Total		21	16	17	16	16	13	18	16	17	16	16	15	

To determine the intervarietal correlation between cultivars, only clearly recognizable protein bands were visually marked. In our case, the total number of bands identified is forty, including thirty-four polymorphic bands (five unique bands (specific marker) and twenty nine non-unique bands), six monomorphic bands, indicating the presence of significant polymorphism with 85% (Figure 5). The gel was divided into six regions with molecular marker intervals between 10 to 120 kDa based on the banding pattern.

The study of protein content is related to the study of SDS-PAGE to determine the quality of the protein, the quantitative variation of seed proteins between different lentil genotypes is studied and represented by a bar chart in Figure 6. The high protein content, 19.81%, was obtained in Flip90 - 31 and 19.13% in Idlep3. However, in other genotypes such as Idlep1, Metro-pole, Ibla, Dahra,

Balkane755, Syrie229, Idlep4, Radjas, Nile45 and Idlep2, the protein content of seeds was 18.46%, 17.85%, 17.63%, 17.15%, 17.00%, 16.59%, 16.36%, 16.35%, 16.13 and 15.10% respectively.

The similarity matrices, estimated from simple correspondence coefficients, were used to construct a dendrogram using the UPGMA method with forty SDS-PAGE bands (Figure 7). Genetic similarity coefficients varied among lentil genotypes (Table 3). The highest similarity coefficient (0.792) was observed between Nile45 and Balkane755 genotypes.

The second highest similarity coefficient (0.743) was observed between Balkane755 and Idlep4 genotypes. However, the lowest similarity coefficient was noticed between the genotypes Balkane755 and Flip90-31 (-0.021). The dendrogram (Figure 7) clearly showed two distinct clusters at the similarity coefficient level of -0.021.

The major and large cluster was divided into two clusters. The one cluster is divided into two sub-cluster: the one sub-cluster consisted of Ibla, Idlep1 and Radjas genotypes (Ibla, Idlep1 together (0.68%), and Radjas are alone (0.63% between Radjas and Idlep1), and Flip90-31 were positioned alone as sub-cluster (0.44% between Flip90-31 and Radjas). This genotype is different from the others.

The one cluster is subdivided into two sub-clusters: the one sub-cluster consisted of Syrie229, Idlep2 (0.74%),

which are genetically close to each other, and Metropole (0.64%), and Idlep3 (0.57%) was positioned alone as a sub-cluster. The second sub-cluster consisted of Dahra (0.26%) were positioned alone as sub-cluster, so, genetically, they are far from other genotypes. The second main cluster consisted of Nile45, Balkane (0.79%), and Idlep 4 (0.74%). In this cluster, Idlep-4 has positioned itself alone as a sub-cluster. This genotype is different from the others.

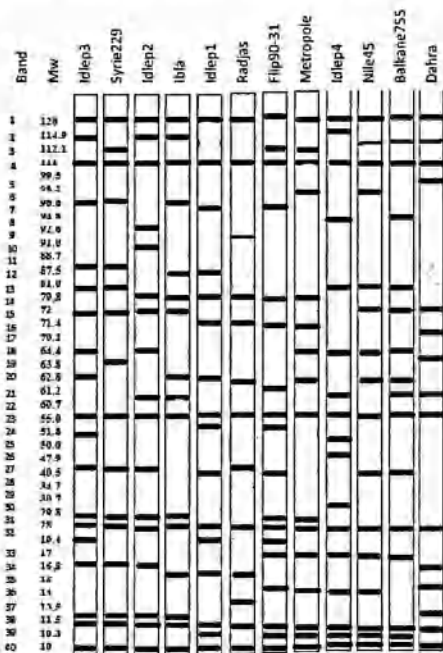


Figure 4. Zymogram of SDS-PAGE of 12 lentil genotypes

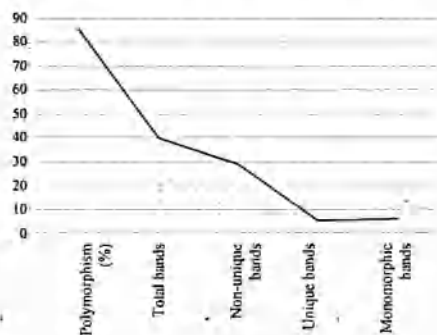


Figure 5. Polymorphism, total bands, polymorphic bands, unique bands, and monomorphic bands of seed with protein profiles in 12 lentil genotypes

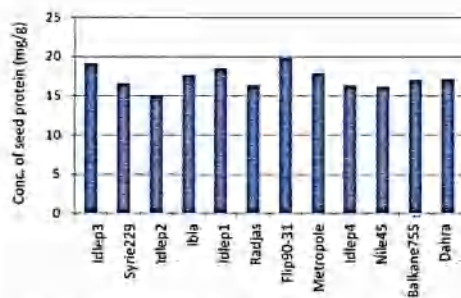


Figure 6. Protein content % of 12 lentil genotypes

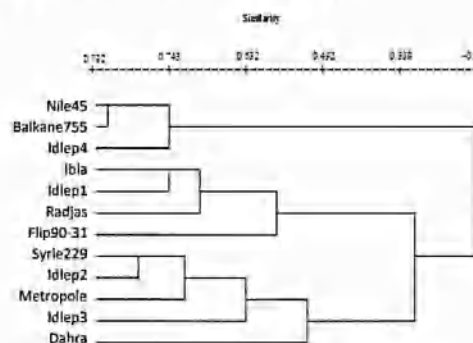


Figure 7. SDS-PAGE dendrogram of 12 genotypes of lentil seed based on protein banding pattern using UPGMA cluster analysis

Discussion

Lentil is an important food legume known for its quality. Therefore, improving new lentil cultivars is essential for sustainable production. We need the revelation of genetic variation among lentil genotypes to breed a new variety with the desired agronomic and commercial characters (Kumar et al. 2018).

Seed storage protein markers, a type of biochemical marker, can be used for selection and genetic diversity analysis (Arslan 2012) of lentil and other crops. SDS-PAGE of storage seed proteins is the most commonly used method to discriminate the varieties. Band patterns indicate differences between varieties in the number of bands, band position, and molecular weight of bands (Hoque and Hasan 2012).

Table 3. Similarity matrices in 12 lentil genotype based on seed storage proteins

Genotypes	Idlep3	Syrie229	Idlep2	Ibla	Idlep1	Radjas	Flip90-31	Metropole	Idlep4	Nile45	Balkane755	Dahra
Idlep3	1											
Syrie229	0.674	1										
Idlep2	0.514	0.743	1									
Ibla	0.470	0.479	0.330	1								
Idlep1	0.164	0.271	0.227	0.688	1							
Radjas	0.339	0.414	0.375	0.632	0.632	1						
Flip90-31	0.357	0.185	0.239	0.595	0.492	0.445	1					
Metropole	0.572	0.688	0.640	0.375	0.271	0.305	0.287	1				
Idlep4	0.008	0.124	0.182	0.021	0.021	0.159	-0.168	0.021	1			
Nile45	0.368	0.375	0.227	0.375	0.167	0.414	0.082	0.167	0.640	1		
Balkane755	0.164	0.167	0.124	0.167	0.167	0.305	-0.021	0.167	0.743	0.792	1	
Dahra	0.266	0.479	0.537	0.063	0.167	0.196	0.185	0.583	0.227	0.167	0.375	1

This study found that seed storage protein in lentils is may reveal usable protein band polymorphism to study the diversity of the genotypes and the information could help make decisions regarding the choice for selecting parents for improvement of lentil productivity through hybridization. Forty polypeptide bands were detected, and molecular weight ranged from 10 to 120 kDa.

Kumar et al. (2018) reported that band patterns obtained from the 14 lentil cultivars and 23 polypeptide bands were detected and from Sultana and Ghafoor (2008). They recorded 55 protein bands in lentils ranging from the molecular mass of 14 to 66 kDa, and 13 of these were polymorphic, and Erdogan (2015) reported that band patterns were obtained from the 13 lentil cultivars, and a total of 22 polypeptide bands were detected. Therefore, our results are similar to those of the authors (Kumar et al. 2018).

The characterization of genotypes based on protein/seed storage subunits is well documented in different crops, including legumes (Hamdi et al. 2012), *Vigna* spp. (Rao et al. 1992), *Vigna unguiculata* (Sharma 2012, Koolwal 2015), fenugreek (Pareek 2014), and mustard (Parashar et al. 2015).

Seed proteins were successfully used to study the variation of storage proteins in lentils. According to Madina et al. (2013), the region 1 was for albumin protein, more than 60 kDa of ovalbumin protein, 45 kDa to 66 kDa of carbonic anhydrase protein, 29 kDa to 45 kDa trypsin inhibitor 20.1 kDa to 29 kDa, lysozyme 14.4 to 20.1 kDa, aprotinin 10 kDa to 14.4 kDa. From six types of seed storage proteins, the albumin protein was abundant in all varieties. In general, legumes contain mainly albumins (20-35%) and globulins (43-55%) (Tchiagam et al. 2014).

In all genotypes, the protein content of the seed varied from 15.10% to 19.81 %. However, it appears that clusters did not affect a particular trend in protein content, as all clusters included genotypes with lower or higher protein content of the seeds. This result is consistent with that of (Tuhin et al. 2016).

The dendrogram was building by the UPGMA method with forty SDS-PAGE bands, It was revealed that at similarity coefficient level of -0.021 two major clusters are

separated. Indeed, it was indicated higher variability dissimilarity estimates among lentil genotypes, and this is similar to what he found (El Nahas et al. 2011) also studied the analysis of seed proteins of 6 genotypes by SDS PAGE, which showed that each genotype was distinct from other. According to Madina et al. (2013), the protein banding pattern obtained showed a polymorphism of 57.12% and could be considered as a general biochemical fingerprint of the lens. Other authors (Tuhin et al. 2016) showed a slight polymorphism (14.285%), indicating a low genetic diversity of the five varieties, and (Wadood et al. 2016) showed that SDS-PAGE displayed a low-level genetic polymorphism in 60 cultivars of lentil but higher than in other legumes, and it can be increased by the addition of more extensively sourced germplasm. In contrast, in our case, binary data obtained by protein gel electrophoresis in 12 lentil genotypes showed a polymorphism of 85%. It means that the level of protein polymorphism is high and is correlated with high genetic diversity. These results are similar to what he found (Jukanti et al. 2017), who studied six arid grain legumes where he found an intra-varietal and inter-specific variability in grain protein content.

In a conclusion, the study of the seed storage profile of protein markers of twelve lentil genotypes using (SDS-PAGE), showed about forty polypeptide bands, whose molecular weight varied from 10 to 120 kDa, indicating the presence of significant polymorphism with 85% between these genotypes, which explains the presence of inter-genotypic diversity. The Idlep3 and Flip90-31 genotypes are characterized by specific bands, so both genotypes can be considered as valuable genetic resources for Algerian lentil selection programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank the director of the Biotechnology Research Center (CRBT), Constantine, Algeria, for helping us complete this work.

REFERENCES

- Abdul-Razzak N T, Omer DA. 2017. Genetic variation in lentil genotypes by morpho-agronomic traits and RAPD-PCR. *J Anim Plant Sci* 27 (2): 468-480.
- Abraham R. 2015. Lentil (*Lens culinaris* Medik) current status and future prospect of production in Ethiopia. *Adv Plants Agric Res* 2 (2): 45-51.
- Arslan M. 2012. Evaluation of genetic similarity and agronomic traits of castor bean populations naturally grown in the Eastern Mediterranean region of Turkey. *Biotechnol Biotechnol Equip* 26: 3089-3093. DOI: 10.5504/BBEQ.2012.0034
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248-254. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Gaoud DJ, Meriem L, Fatma G, Abdelguri A. 2018. Collection and agro morphological characterization of Algerian accessions of lentils (*Lens culinaris*). *Biodiversitas* 19 (1): 183-193. DOI: 10.13057/biodiv/d190125
- El Nahas AI, El Shazly HH, Ahmed SM, Omran AAA. 2011. Molecular and biochemical markers in some lentil genotypes. *Ann Agric Sci* 56: 105-112. DOI: 10.1016/j.aas.2011.11.001.
- Erdoğan C. 2015. Genetic characterization and cotyledon color in lentil. *Chilcan J Agric Res* 75 (4): 383-389. DOI: 10.4067/S0718-58392015000500001.
- Hamdi A, Ali MA, Shaaban M, Ezzat MZ. 2012. Agronomic, seed protein and quality characters of the most promising lentil genotypes in Egypt. *World Appl Sci J* 20 (1): 70-79.
- Hammadi H, Hammouda D, Djeghar R. 2018. Distribution of heterochromatic variability in several genotypes of *Lens culinaris* Medik (SSP microsperma and macrosperma). *Int J Sci Res* 7: 1112.
- Hammouda D, Khalfallah N. 2015. Etude comparative de la caryomorphologie chez six génotypes du *Lens culinaris* Medik. *Eur Sci J* 11: 212-214.
- Hoque ME, Hasan MM. 2012. Molecular diversity analysis of lentil (*Lens culinaris* Medik.) through RAPD markers. *Plant Tiss Cult Biotechnol* 22: 51-58. DOI: 10.3329/pteb.v22i1.11260
- Jukanti AK, Dagla HR, Kafwani P, Citrawati D, Upendra JM, Kalia RK, Bhatt RK. 2017. Grain protein estimation and SDS-PAGE profiling of six important arid legumes. *Legume Res* 40: 485-490. DOI: 10.18805/lr.v0i0.7295
- Karimzadeh R, Mohammadi M, Shefazadeh MK, Mahmoodi AA, Rustami B, Karimpur F. 2012. Relationship among and repeatability of ten stability indices for grain yield of food lentil genotypes in Iran. *Turkish J Field Crops* 17: 51-61.
- Kumar P, Ankita T, Anupam A, Rahul V, Rajesh K, Vyas RP, Yadav MK. 2018. Genetic characterization of lentil genotypes based on SDS-PAGE. *J Pharmacog Phytochem* 7: 274-278.
- Koolwal A. 2015. Genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Genotypes for Storage Seed Protein Profile. [Thesis]. S.K.R.A.U. Bikaner, Campus-Jobner.
- Ladizinsky G, Hymowitz T. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor Appl Genet* 54: 145-151. DOI: 10.1007/BF00263044
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685. DOI: 10.1038/227680a0.
- Madina MH, Haque ME, Dutta AK, Islam MA, Deb AC, Sikdar B. 2013. Estimation of genetic diversity in six lentils (*Lens culinaris* Medik.) varieties using morphological and biochemical markers. *Int J Sci Eng Res* 4 (9): 819-823.
- Parashar N, Jakhra ML, Ram Krishna K, Jangid K. 2015. Genetic diversity for storage seed protein profile in mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern. & Coss.) genotypes. *Ecosyst* 8: 177-182.
- Parveek A. 2014. Genetic diversity for storage seed protein profile in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) genotypes. [Thesis]. S.K.R.A.U. Bikaner, Campus-Jobner.
- Ran R, Vaglioli MD, D'Urzo MP, Month L. 1992. Identification of *Vigna* spp. through specific seed storage polypeptides. *Euphytica* 62: 39-43. DOI: 10.1007/BF00036085
- Sharma BD. 2012. Genetic diversity in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) using protein profile. [Thesis]. S.K.R.A.U. Bikaner, Campus-Jobner.
- Sultana T, Ghafoor A. 2008. Genetic diversity in ex-situ conserved *Lens culinaris* for botanical descriptors, biochemical and molecular markers, and identification of landraces from indigenous. *Genet Resour Pak J Integr Plant Biol* 50: 484-490.
- Wadood SF, Hassan N, Khaliq A, Nausheen, Jan T, Ghafoor A, Khan M, Nisar M. 2016. Genetic polymorphism in *Lens culinaris* collected from Malakand division Khyber Pakhtunkhwa. *Pak J Biodiver Environ Sci* 8: 53-60.
- Tchingang JBN, Bell JM, Nassourou AM, Njintang NY, Youmbi E. 2011. Genetic analysis of seed protein contents in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Afr J Biotechnol* 10: 3077-3086. DOI: 10.5897/AJB10.2469.
- Tuhin P, Ghosh S, Mondal A, De KK. 2016. Evaluation of genetic diversity in some promising varieties of lentil using karyological characters and protein profiling. *J Genet Eng Biotechnol* 14 (1): 39-48. DOI: 10.1016/j.jgeb.2016.03.003.

3.4. Analyse moléculaire

3.4.1. Extraction de l'ADN génomique et test de qualité

Les bandes obtenues ne présentent pas en général la même intensité de fluorescence, ce qui signifie que la quantité d'ADN n'est pas toujours la même pour tous les échantillons analysés (Figure 57). L'usage du protocole I.C.A.R.D.A a permis d'obtenir, à partir des feuilles fraîches de lentille, des extraits d'ADN de très bonne quantité et qualité et dont le rapport de ADN/protéine varié de 1,70 à 2 (Annexe).

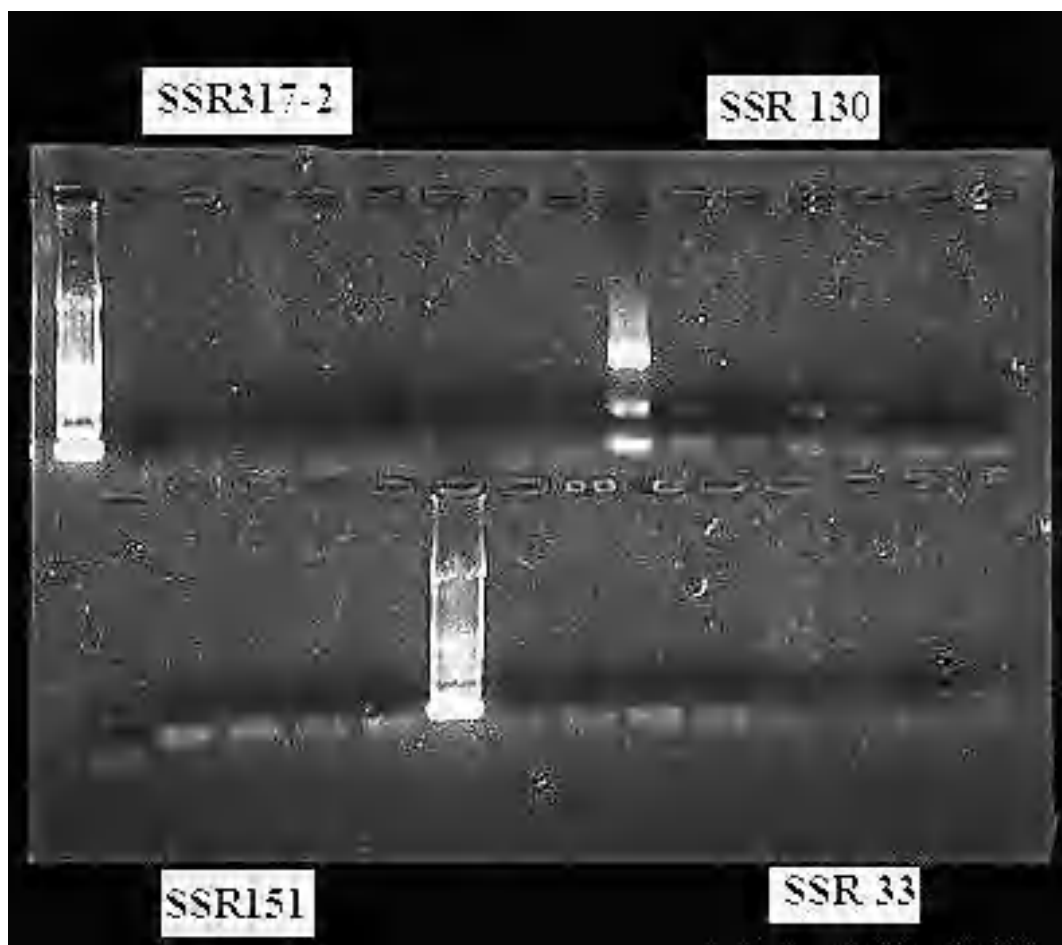


Figure 57 : Test de quatre amorces (SSR 317-2-SSR 130 - SSR151-SSR33) sur les cultivares de *Lens* . M : marqueur de taille 50 pb.

3.4.2. Amplification des amorces SSR

Certaines amorces ont produit un degré élevé de polymorphisme, par opposition, d'autres amorces ne produisent aucun polymorphisme. Sur 19 amorces, seuls 7 marqueurs SSR se sont avérés polymorphes (tableau16) (Figures :58,59).

Le nombre total de bandes visibles sur le gel par amorce varie de 2 à 6 avec le nombre moyen d'allèles polymorphes est de 3.62 amplifiés par des amorces SSR conduisant à l'amplification d'un total de 29 allèles visualisé sur gel acrylamide (tableau 16). Deux amorces, à savoir SSR19 (Figure58), SSR151 (Annexe) ont présenté un nombre maximum d'allèles (06), tandis que, l'amorce SSR317-1 a produit le nombre minimum. Ainsi, la paire d'amorces SSR19 a révélé une valeur maximale de PIC le plus élevé 0,75 tandis que la paire d'amorces SSR317-1 a montré une valeur minimale de PIC avec 0,42 (Tableau 16). Parmi toutes les paires d'amorces testées, SSR19 présentait l'hétérozygotie la plus élevée entre tous les génotypes de lentilles étudiés. Les bandes de différentes tailles dues à la différence de tailles en paire de bases des microsatellites amplifiés. Chaque bande claire dans le gel représente un allèle. Donc, chaque amorce a donné un nombre de bandes qui correspond au nombre d'allèles.

Le tableau ci-dessous résume le nombre d'allèles, l'indice de la diversité génétique et le PIC, calculés pour les 7 amorces SSR testés sur 12 génotypes de lentille à l'aide du logiciel Power Marker.

Tableau 16 : Informations sur les marqueurs microsatellites (SSR) ainsi que leurs allèles respectifs, leur hétérozygotie et leur valeur de contenu d'information polymorphe (PIC).

Marqueur	Nb d'échantillons	Nb d'allèles	Fréquence de l'allèle majoritaire	Indice de diversité génétique	PIC
SSR19	12	6	0.463	0,761	0.753
SSR48	12	3	0.713	0,478	0.471
SSR151	12	6	0.458	0,740	0.735
SSR212-1	12	3	0.731	0.459	0.451
SSR199	12	5	0.491	0,649	0.641
SSR323	12	4	0.664	0.582	0.579
SSR317-1	12	2	0.695	0.431	0.424
Moyenne	12	4.14	0.602	0.585	0.579

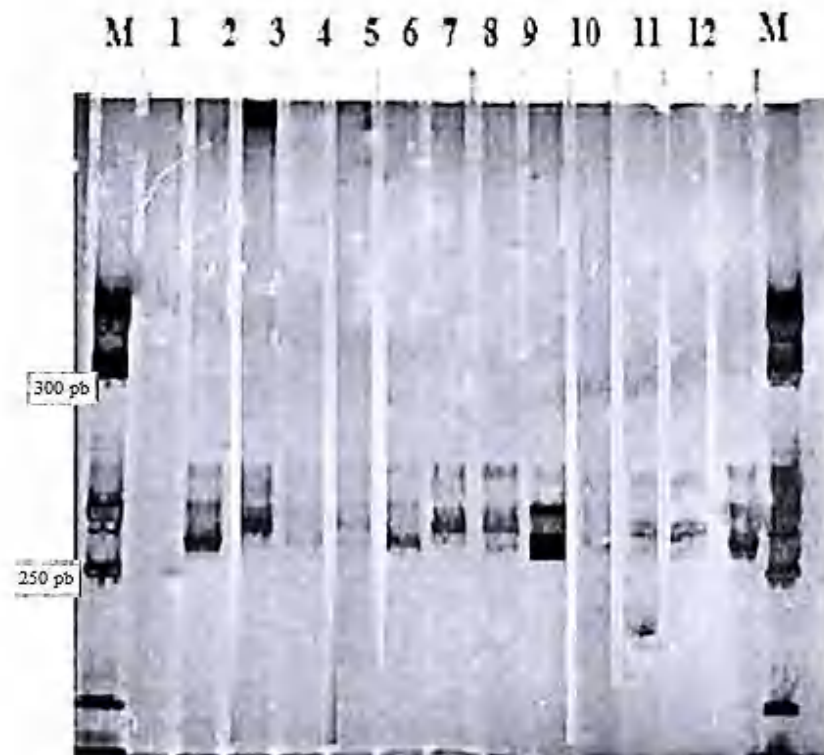


Figure58: Profil électrophorétique de l'amorce SSR19 sur gel de polyacrylamide chez 12 cultivars de la lentille après l'amplification par PCR, ligne 1-12 représentent les cultivars .

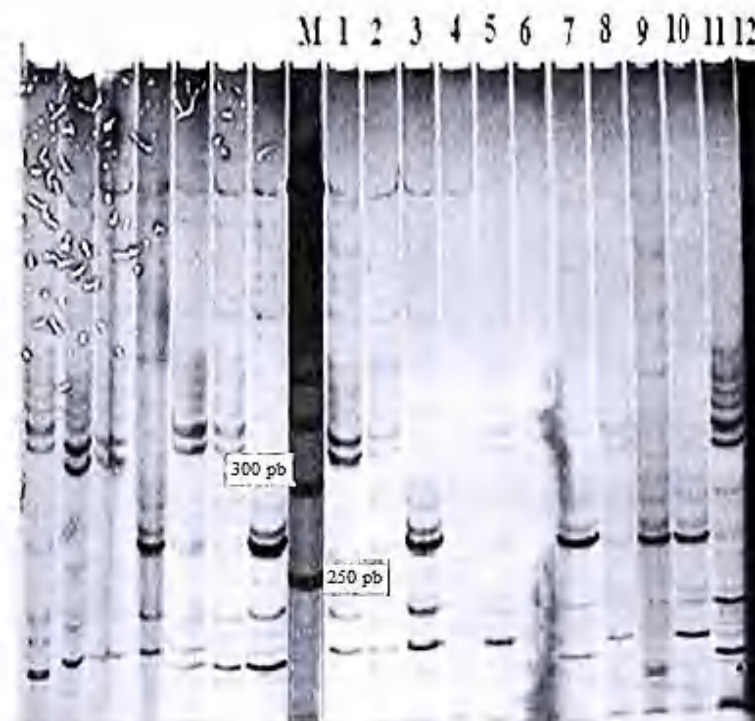


Figure59: Profil électrophorétique de l'amorce SR323 sur gel de polyacrylamide chez 12 cultivars de la lentille après l'amplification par PCR, ligne 1-12 représentent les cultivars.

L'existence d'un faible niveau de polymorphisme nous confirme que les individus analysés ont des caractéristiques génétiques presque pareilles. Dans le cas contraire, l'existence d'un niveau important de diversité génétique prouve une variabilité génétique entre les variétés de la lentille qui est peut être dû à des mutations dans le génome de la lentille.

Le taux de polymorphisme étant basé sur l'indice de la diversité génétique. Plus l'indice de la diversité est important plus le PIC est important.

3.4.3. Distance génétique entre les génotypes

L'analyse des différents profils SSR permet de calculer la distance génétique et abouti à la construction d'un dendrogramme qui illustre parfaitement les relations génétiques probables entre les cultivares de la lentille étudiée.

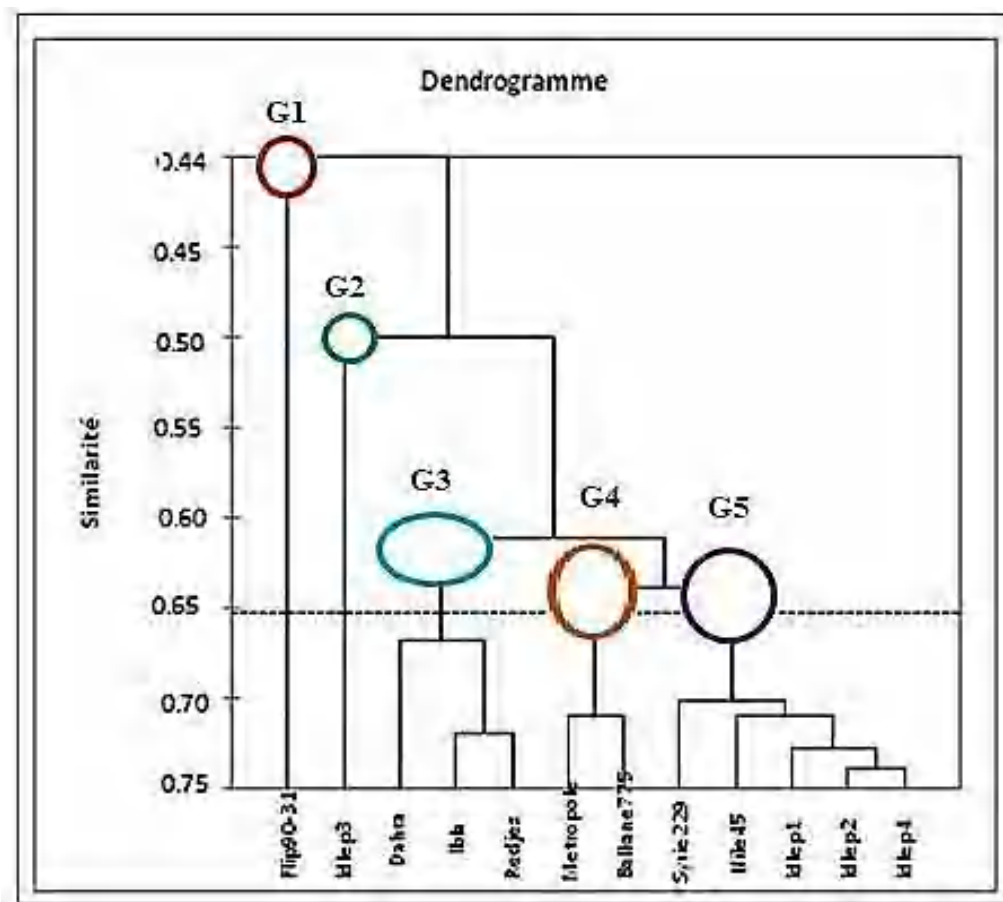


Figure 62 : Dendrogramme généré sur la base des données SSR des 12 cultivars de la lentille.

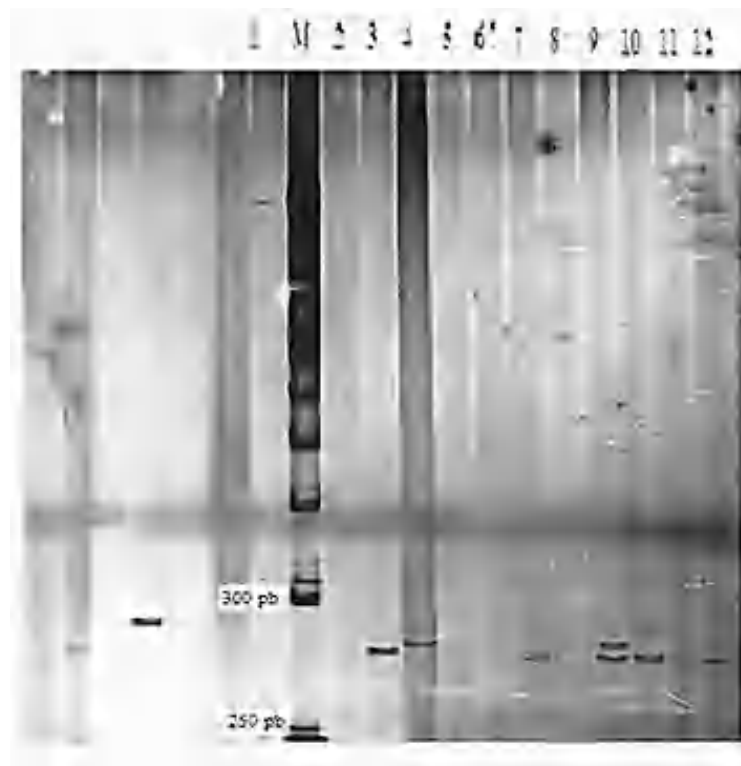


Figure 60: Profil électrophorétique de l'amorce SSR48 sur gel de polyacrylamide chez 12 cultivars de la lentille après l'amplification par PCR, ligne 1-12 représentent les cultivars.

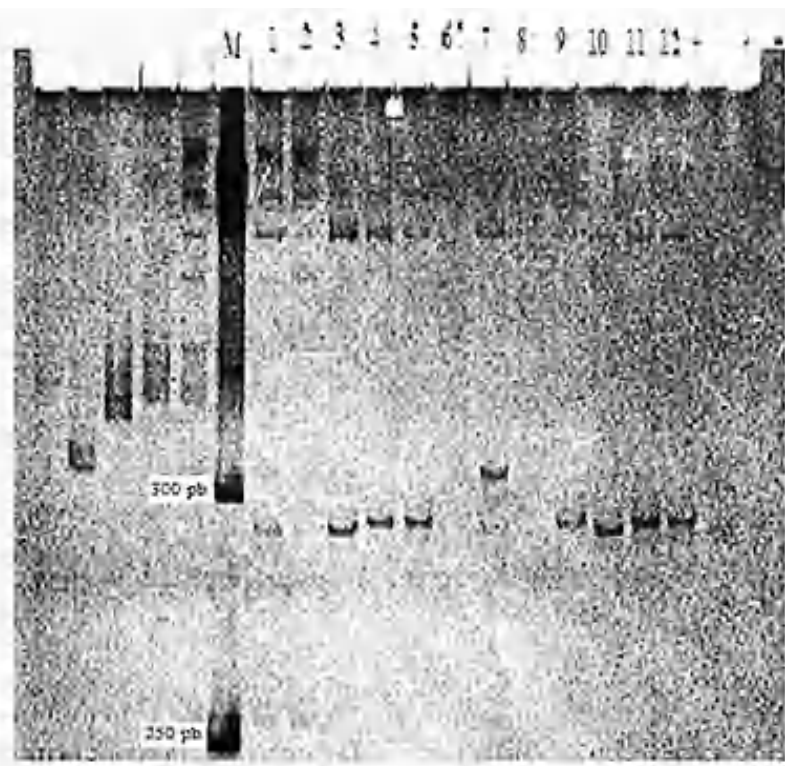


Figure 61: Profil électrophorétique de l'amorce SSR199 sur gel de polyacrylamide chez 12 cultivars de la lentille après l'amplification par PCR, ligne 1-12 représentent les cultivars.

Un dendrogramme a été construit sur la base de la distance génétique calculée à partir de l'allèle généré à partir de 12 cultivares de lentilles en utilisant 7 paires d'amorces. Les dendrogrammes préparés à partir de l'amorce SSR les cultivares ont été classés en trois grands groupes au distance 44% (Figure 61) .

L'analyse de dendrogramme permet de distinguer cinq groupes.

- **Le premier groupe** est composé d'un seul cultivare Flip90-31.
- **Le second groupe** est composé d'un seul cultivare Idlep3
- **Troisième groupe** est composé des cultivares Dahra, Ibla et Redjes.
- **Quatrième groupe** est composé des cultivares Metropole et Balkane755.
- **Cinquième groupe** est composé des cultivares Syrie229, Nile45, Idlep1, Idlep2.

Discussion

Le choix des marqueurs de type SSR s'est fait en raison de leur disponibilité et de leur relative facilité d'emploi, leur distribution sur l'ensemble du génome, leur spécificité de locus, leur caractère co-dominant, mais surtout parce que les microsatellites sont considérés comme des marqueurs génétiques importants dans un large éventail de cultures, y compris la lentille (Kumar *et al.*, 2015).

Rappelons que le protocole de l'ICARDA a fourni un ADN exempt d'impureté et avec des rendements réguliers et plus abondants. Ainsi l'application à la lettre du ce protocole sur les feuilles fraîches de la lentille a occasionné l'obtention d'ADN génomique translucide et de bonne qualité et quantité.

Nos résultats, en confrontation à ceux des auteurs (Hamweih *et al.*, 2009; Fikiru *et al.*, 2010; GAAD *et al.*, 2017) sont similaires .

Le nombre d'allèles détecté la valeur moyenne de diversité génétique et le PIC sont supérieurs par comparaison à ceux obtenus par d'autres auteurs (Jin *et al.*, 2008; Zaccardelli *et al.*, 2012; Bermejo *et al.*, 2014 ; Dikshit *et al.*, 2015 ; Kushwaha *et al.*, 2015, et Kumar *et al.*, 2015). Par ailleurs ces valeurs sont inférieures par rapports à d'autres auteurs: (Babayeva Verma *et al.*, 2014; Andeden *et al.*, 2015; Mekonnen *et al.*, 2015; Idrissi *et al.*, 2015, 2016; Gupta *et al.*, 2016 , Singh *et al.* 2016; Gaad *et al.*, 2018).

À noter que le dendrogramme (Figure 61) montre qu'il n'existe pas une relation entre l'origine géographique des cultivares et la distance génétique, ce qui suggère que la variabilité génétique est indépendante de l'origine géographique.

Gaad *et al.*, 2018) signale que l'analyse du dendrogramme a révélé que quelques accessions algériennes (ALG30 et ALG16) ont partagé le même profil génétique avec les accessions de l'ICARDA (IG8 et ILL1828), cela pourrait être expliqué par l'échange de la semence dans le cadre des programmes de recherche supportés par l'ICARDA pour améliorer la lentille.

D'après Babayeva *et al.*, (2009), cela est dû aux échanges de germoplasme provenant de différents environnements et souvent partageant des parents communs. De plus, l'intervention humaine pourrait avoir abouti au mouvement de matériel génétique à travers différents endroits, aboutissant à une expansion rapide de la variabilité génétique (Bakoume *et al.*, 2015). Pour Fiocchetti *et al.*, (2009), ce phénomène pourrait être attribué à l'influence d'activité humaine comme l'échange de graine entre les agriculteurs ou des mélanges variétaux imprévus.

Il est aussi, intéressant de faire remarquer que la méthode SSR n'a pas différencié entre les deux types de lentilles, *Microsperma* et *Macrosperma*, les mêmes résultats sont obtenus par Bacchi *et al.*, (2010) en se basant sur les deux systèmes de marqueurs AFLP et SSR.

La différenciation des cultivares de la lentille sur la base des résultats moléculaires ne reflète pas les résultats basés sur les critères agro-morphologiques. Ainsi, la variabilité moléculaire et celle phénotypique sont indépendantes.

Selon Dalamu *et al.*, (2012), la raison principale de cette différence, peut-être expliquait par le contrôle de plusieurs gènes (effet poly-gènes) des caractères quantitatifs qui sont fortement influencés par l'environnement.

Conclusion

Les cultivares de lentilles testés pour l'analyse de la diversité génétique à l'aide de marqueurs SSR présentaient un niveau significatif de polymorphisme. 19 paires d'amorces sont testées et seulement 7 paires d'amorces sont retenues et évalués pour leur polymorphisme.

Le dendrogramme construit, à l'issue de l'analyse statistique de ces marqueurs a montré un degré élevé de diversité génétique et un réarrangement significatif des cultivares. À 44% de similitude, on a obtenu un dendrogramme composé de cinq groupes. Cependant, les cultivares proches génétiquement mais éloignées géographiquement, aussi, on remarque que, la méthode SSR n'a pas différencié entre les deux types de lentilles *Microsperma* et *Macrosperma* .

À l'avenir, un grand nombre de cultivares devraient être analysés avec un plus grand nombre d'amorces pour distinguer la variation génétique dans les géotypes de lentilles. La connaissance de la diversité génétique parmi les cultivares de lentilles peut être appliquée dans le future programme de sélection pour l'amélioration de la culture de lentilles en ce qui concerne le rendement et les différents traits de qualité, afin de répondre à la demande croissante des agriculteurs et des consommateurs.



Synthèse des Travaux

Synthèse des Travaux et Perspectives

Cette recherche visait à étudier la diversité morphologique, cytogénétique, biochimique et moléculaire de 12 cultivares de lentille (*Lens culinaris*).

Les résultats présentés ici fourniront des informations et des outils utiles pour développer de nouvelles variétés de lentilles en Algérie.

Les résultats obtenus par l'étude agro-morphologique indiquent :

- La présence d'une forte variation phénotypique (**inter-génotypique**) pour différentes caractéristiques végétales importantes d'un point de vue agronomique, permettant son utilisation en analyse génétique et son éventuelle inclusion dans des programmes de sélection.
- Des rendements plus uniformes aux graines *Microsperma* que les graines *Macrosperma*, probablement, en raison des conditions de croissance limitées. Alors que, des différences importantes de rendement en graine sont enregistrées entre les cultivares. Seuls, les cultivares Idlep3 et Flipe90-31 qui marquent les rendements les plus élevés ce qui suggère que ce sont les cultivares les plus adaptés.
- Les analyses en composantes principales (ACP) et classement hiérarchique ascendant (CHA) ont permis de ressortir cinq groupes qui se différencient par les aspects morphologiques et les composantes du rendement de sorte que :
 - **-Le premier groupe** : Il est composé de l'individu Idlep3 de type *Macrosperma* se caractérise par de floraison et maturité précoce.
 - **-Le deuxième groupe** : Il est constitué des individus Métropole type *Macrosperma* caractérisé par floraison et maturité tardive
 - **-Le troisième groupe** Il est composé de les individus Idlep2 et Idlep1, Dahra, Syrie229 et Idlep4 type *Microsperma*
 - **-Le Quatrième groupe** : Il est constitué des individus Balkane755, Ibla et Redjes type *Macrosperma*.
 - **-Le cinquième groupe** : Il comporte les individus Flip90-31 et Nile45 de type *Macrosperma*

Au cours de ce travail nous avons pu déterminer des mécanismes cytogénétiques importantes sur le génome de l'espèce *Lens culinaris* Medik:

Études mitotique et méiotique

- Globalement, les caryotypes des cultivares étudiés sont symétriques tant pour la forme que pour la taille des chromosomes. Les caryotypes sont presque conformes à ceux observés par les auteurs (Gaffarzadeh et al.2007, Hammouda et Khalfallah.2015), concernant les types chromosomiques, mais avec des différences importantes dans la localisation et le nombre de satellites.

- Le cultivare **Dahra** présente un taux de polymorphisme majoritaire par rapport aux autres cultivares, des bandes hétérochromatiques (C+) épaisses et intenses, présence des satellites (1^{er} et la 2^{ème} paire), un chromosome B ainsi qu'une construction secondaire, ce qui la rend un génotype modèle pour l'espèce *Lens culinaris* Medik.

- Un pourcentage important de polymorphisme hétérochromatique intra et inter-génotypique est décelé dans les profils des bandes C, témoignant un taux important d'hétérochromatine C+ .

- La présence des chromosomes B chez les cultivares étudiés en nombre de 1 à 2 .

-Deux facteurs jouant un rôle important dans l'adaptation du végétal aux Conditions difficiles du milieu: **Le taux d'hétérochromatine et le nombre des chromosomes B** (Sarvella 1959;Stebinn, 1971, Amirouche, 2007, Hammouda etKhalfallah, 2008 ; 2013, 2015, Hammouda et al. ,2021). le principal rôle du chromosome B est physiologique en agissant sur **la fertilité du pollen** Stebbins (1971). Ils peuvent aussi provoquer l'instabilité méiotique et mitotique, exemple chez le Riz (Jones and Houben, 2003)

-La comparaison des régions organisatrices nucléolaires (N.O.R.) marquées sur les chromosomes des cultivares a montré trois groupes:

- **Groupe1 (4 N.O.R.)** composé de trois cultivares (Métropole, Flip 90-31, Syrie 229).
- **Groupe 2 (3N.O.R)** est composé de quatre cultivares (Idlep1, Idlep 3, Belkane755, Dahra).
- **Groupe 3 (2 N.O.R)** contient trois cultivares (Nile 45, Idlep2, Redjes).

Corrélation entre le Taux d'hétérochromatine et nombre de N.O.R

Pour la première fois, on a pu mettre en évidence une corrélation positive entre le taux

d'hétérochromatine et le nombre des organisateurs nucléolaires (NOR) chez la lentille cultivée (Fabacée). Des travaux antérieurs (Hammouda D., 2013 et 2017) réalisés sur les chromosomes des Poacées ont montré une corrélation positive entre le taux hétérochromatine constitutive et l'augmentation du nombre des chromosomes B chez les triticales (8x et 6x). chez les plantes androgénétiques du Nil par (Lespinasse et *al.*, 1987).

- Nos résultats sont originaux, nous avons pu déterminer par la technique du N-banding, les **chromosomes marqueurs** 1,2,3,4 chez tous les cultivares, alors que les chromosome 5,6,7 en sont dépourvus.

- L'hétérochromatine de *Lens culinaris* peut être décrite comme **N+C+** qui coïncidé avec la localisation des séquences d'ADN (GAA)_n, (GAG)_n des satellites (organismes nucléolaires).

-Les anomalies meiotiques (les chromosomes B, les chromosomes retardataires, les micronoyaux,) conduisant à la fois à des facteurs génétiques (hybridations) et des facteurs environnementaux dans les populations et peuvent prendre du temps à disparaître ou devenir une caractéristique permanente des plantes (Hammouda, 2021). Ces anomalies sont connues, aussi, pour jouer un rôle dans l'induction de perturbations de la méiose (méiose irrégulière) chez les végétaux.

-Seul le cultivare **Syrie 229**, montre une **migration anormale** de chromosome à un seul pôle ce résultat a suggéré que cette anomalie dite « Orientation anormale » était causée par le stress environnemental qui affectait les plantes au cours de la période de floraison comme les basses ou hautes températures, stress hydriques, attaques parasitaires.

Étude palynologique

Les résultats de l'analyse palynologique attestent que la variabilité s'exprime en termes de taille (longueur et largeur des grains de pollen, sillons et pores), de forme des grains de **pollen** « **prolate** » de type « **tricolporate** ».

L'évaluation de taux de viabilité a révélé un très grand pourcentage (95% à 100%) de viabilité qui se traduit par un déroulement normal de la microsporogénèse (ou gametogenèse). Ce qui signifie, l'existence d'une corrélation entre les deux études (**méiotique et palynologique**). Un taux élevé de viabilité est également, considéré comme un indicateur de l'adaptation des espèces à certaines conditions écologiques.

Études biochimique et moléculaire

Les résultats biochimiques montrent une forte variabilité génétique intra-spécifique et inter-génotypique. Le cultivare **Idlep3** est caractérisé par des bandes spécifiques (ou marqueur spécifique), suivi du cultivare **Flip90-31**, que nous pouvons proposer pour améliorer la sélection végétale.

La relation génétique découverte dans le cadre de cette étude pourrait constituer la base de futures programmes systématiques de sélection des lentilles.

Des bandes spécifiques (marqueurs) étaient particulières dans les cultivares **Idlep3**, **Flip90-31** et **Dahra**.

La différenciation des cultivares de la lentille sur la base des résultats moléculaires SSR ne reflète pas les résultats basés sur les critères agro-morphologiques. Ainsi, la diversité moléculaire et celle phénotypique sont différents.

Selon Dalamu *et al.* (2012), la raison principale de cette différence, peut-être expliquait par le contrôle par plusieurs gènes (effet poly-gènes) des caractères quantitatifs qui sont fortement influencés par l'environnement.

Interet économique

Cette hétérogénéité observés chez *Lens culinaris* dans cette étude a montrée une corrélation entre les quatre aspects (agromorphologique, cytogenétique, biochimique et moléculaire) par un taux très élevé en polymorphismes (**morphologique, cytogénétique, biochimique et moléculaire**) ce qui présente un intérêt majeur à l'échelle **agronomique**.

Nos cultivares pourraient être bien adaptés aux conditions défavorables de milieu car leur richesse en Hétérochromatine, chromosome B et taux de viabilité des grains de pollens élevé se traduit sur le champ par une adaptation et une résistance face aux facteurs environnementale défavorable, **particulièrement**, les cultivares **Idlep3**, **Flipi90-31** et **Dahra** qui marquent des rendements les plus élevés et se caractérisent par des bandes spécifiques (ou marqueur spécifique). Donc, **nous pouvons les proposer aux agronomes de les utiliser dans les croisements des lentilles pour la sélection végétale.**

Perspectives

Ce travail a pu fournir des données de base sur le génome de l'espèce étudiée, mais il serait mieux d'enrichir cette étude en utilisant des techniques cytogénétiques modernes tel que :

- L'hybridation *in situ*, afin de localiser les gènes ribosomiques pour conférer une caractérisation complète et précise au génome.

- Le Séquencage pour réaliser la carte génétique.



Références Bibliographiques

1. **AbboS., Miller T.E., Reader S.M., Dunfordrp., king I .(1994).** Detection of ribosomal DNA sites in lentil and chickpea by fluorescence in situ hybridization *Genome*;37,713-716p.
2. **Abdul-Razzak Tahir1, and D.A. Omer. (2017).** GENETIC VARIATION IN LENTIL GENOTYPES BY MORPHO-AGRONOMIC TRAITS AND RAPD-PCR N.. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(2):, Page: 468-480.
3. **Abraham Reda., (2015).** Lentil (*Lens culinaris* Medik) current status and future prospect of production in Ethiopia. *Advances in plants and agriculture research*.2: Pp : 1-2.
4. **Ahmad H., Alam I.M., Khawaja H.I.T .(1992).** Karyotypic studies in *lens culinaris* *Pakphyton*, 4:181-189.
5. **Ait Abdallah. (2011).** Culture et cout de production des grandes cultures. 84.ISBN: 978-9961-881-18-7.
6. **Aghili, P., Imani A. A. and Alaei, Y. (2012).** A study on genetic diversity in lentil genotypes using seeds morphologic and protein traits. *Life Science Journal* 9(4): 4099-4106.
7. **Alghamdi, Salem S., Altaf, M. Khan., Megahed, H., Ammar, Ehab H. El-Harty., Migdadi, Hussein M (2014).** Phenological, Nutritional and Molecular Diversity Assessment among 35 Introduced Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Genotypes Grown in Saudi Arabia. *Int J Mol Sci.* 15(1) ,277–295.
8. **Amirouche N and Misset M.T.(2007).** Morphological variation and distribution of cytotypes in the diploidtetraploid complex of the genus *Dactylis* L. from Algeria *Plant Syst.Evol.* DOI.10.1007/s00606-006-0502.
9. **Andeden, E. E., Baloch, F. S., Çakir, E., Toklu, F. and Özkan, H. (2015).** Development, characterization and mapping of microsatellite markers for lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Plant Breed.* 134 : 589-98.
10. **Anuradha Bhartiya, J.P. Aditya and Sher Singh.(2015)** .Assessment of variability for agro-morphological traits in elite lentil (*Lens culinaris*) lines using multivariate analysis, *Indian J. Agric. Res.*, 49 (6) 2015 : 539-543.
11. **Arano H. et Saito H., (1980).** "Cytological studies in family *Umbelliferae* 5. Karyotypes of seven species in subtribe *Seselinae*", *Chromosoma*, ser. 2, 17 (1980), pp. 471-480.
12. **Arrighi F.E and Hsu T.C .(1979).** Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetic*, 10:81-86.
13. **Babayeva, S., Akparov, Z., Abbasov, M., Mammadov, A., Zaifzadeh, M. and Street, A. E. K. (2009).** Diversity analysis of central Asia and Caucasian lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm using SSR fingerprinting. *Genet. Resour. Crop Evol.* 56 : 293-98.

14. **Bacha F. et Ouane S. M (2003).** Etude de l'effet du stress hydrique sur les activités des enzymes nitrate réductase et nitrogénase de la culture du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). Institut National de la Recherche agronomique d'Algérie., 13 :1111-1992.
15. **Bacchi M, Leone M, Mercati F, Preiti G, Sunseri F, Monti M.(2010)** .Agronomic evaluation and genetic characterization of different accessions in lentil (*Lens culinaris* Medik.) Italian J Agron. 2010;5:303–314. doi: 10.4081/ija.2010.303.
16. **Bakoume, C., Wickneswari, R., Siju, S., Rajanaidu,N., Kushairi, A. and Billotte, N. (2015).**Genetic diversity of the world's largest oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) field gene bank accessions using microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* **62** : 349-60.
17. **Begiga G. (2006).** *Lens culinaris* Medik. Fiche protabase. Brink M et Belay G (Editeurs). PROTA (plante resources of Tropical African/ Ressources végétales de l'Afrique tropicale). Wageningen, Pays Bas.
18. **Benbrahim N., Gaboun F., Taghouti M. (2016).** Heritability of yield and yield components of Zaer lentil landrace.VII International Scientific Agriculture Symposium.Agrosym 2016.1133-1141.
19. **Benhizia H., Benhizia Y., Ghernoub L., Siljak-Yakovlev S., Khalfallah N., 2013.** Meiotic behaviour and karyotype features of endangered endemic fodder species *Hedysarum perrauderianum* (Fabaceae) in some populations fromAlgeria. *Caryologia*.
20. **Benzecri J.P. (1973).**L'analyse des données. Tome 2: L'analyse des correspondances.
21. **Bentzer B., v Bothmer R., Engstrand L., Gustafsson M., Snogerup S.,(1971).** Some sources of error in the determination of arm ratios of chromosomes. *Bot Notiser*, 124: 66-74.
22. **Bhatty R.S 1998.**Composition and quality of lentil (*Lens culinaris*Medik).A reviewCanadian Institute of Food Science and Technology 21, 144–160.
23. **Bicer, B.T. and Sakar, D. (2008).** Heritability and path analysis of some economical characteristics in lentil.*Journal of Central European Agriculture*, 9 (1): 191-196.
24. **Brink., Belay, (2006).** Céréales et légumes secs, ressources végétales de l'Afrique tropicale.FondationProta, Wageningen, Pays-Bas. P: 102.
25. Bushreen J., and Vahidy A. 2007:Giemsa N-banding pattern in some wild diploid species of *Hordeum*. *Pak.J.Bot.*, 39 (2): 421-429.
26. **Camatchou,2005.** B chromosomes. In .Gregry TR (ed) *The evolution of the genome*.Elsever, San Diego, PP 223-286.
- 27.27.

- Chahota, R.K., Kishore, Dhiman, N.; Sharma, T.R.; Sharma, S.K. (2007).** Predicting transgressive segregants in early generation using single seed descent method-derived *micro-macrosperma* gene pool of lentil (*Lensculinaris* Medikus). *Euphytica*, **156**: 305-310.
- Cokkizgin, A., Colkesen, M., Kayhan, K., & Aygan, A. (2005).** A research on yield and yield components in different winter lentil (*Lens culinaris* Medic.) cultivars under Kahramanmaras conditions. *Journal of Akdeniz University Agriculture Faculty*, *18*(2), 285-290.
- Cokkizgin et Shtaya, 2013.** Lentil: Origin, Cultivation Techniques, Utilization and Advances in Transformation. *Agricultural Science* Volume 1, Issue 1. P: 55- 62.
- Cristóbal,M.D.,Pando,V.,andHerrero,B.(2014).**Morphologicalcharacterizationoflentil(*Lensculinaris* Medik.)landracesfromCastilla Y León,Spain. *Pak.J.Bot.* *46*,1373–1380.
- Cubero, J. I., (1984).** Genetic Resources and Their Exploitation – Chickpeas, Faba Beans and Lentils: Taxonomy, Distribution and evolution of the Lentil and its Wild Relatives, (Edi.: J. R. Witcomb and W. Erskine; Pub.:The Hague Nijhoff).
- Dalamu, T., Behera, T. K., Gaikwad, A. B., Saxena,S., Bharadwaj, C. and Munshi, A. D. (2012).**Morphological and molecular analyses define the genetic diversity of Asian bitter gourd (*Momordica charantia* L.). *Aust. J.Crop Sci.* **6** : 261-67.
- Dikshit, H. K., Singh, A. and Singh, D. (2015).**Genetic diversity in *Lens* species revealed by EST and genomic Simple Sequence Repeat Analysis. *PLoS ONE* **10** : 1-15.
- Defani-Scoarize, M. A., Pagliarinis, M. S. et Aguiar, G, (1995).** Evaluation of meiotic behavior in double cross maize hybrids and their parents. *Maydica* *40* :319-324).
- Djerbi M, (1994).** Précis de la phoeniciculture. F.A.O. Rome. 191p.
- Dounia H.,Elham A., Abdel-Hady A (2008).**N-and Cbanding Analysis of Chromosomes in Wheat,*Triticumaestivum*L. Variety —Mahon-demias|.The *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology (JGEB)*. EGYPT. *6*(1): 85-88
- Edeoga HO., Ikem IC, (2002).** Structural morphology of the pollen grains in three Nigerian Species of *Boerhavia L.* *New Bot* *29*:89-95.
- El-Nahas, A., El-Shazly, H.S. and Omran, A. (2011)** Molecular and biochemical markers in some lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotypes. *Ann. Agric. Sci.* **56**,105-112.
- Erdtman G., 1952.** Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. Ed.Almqvist and Wiksell, Stockholm.
- Erdoğan C (2015).** Genetic characterization and cotyledon color in lentil *Chilean journal of*

agricultural research, vol.75 no.4 Chillán dic. 2015.

Eriksson, L., E. Johansson, N. Kettaneh-Wold and S Wold.1999. *Introduction to multi and megavariate data analysis using projection methods (PCA & PLS)*. Umetrics AB,Umea.

Erskine, W., and Sarker, A. 2004. Lentil. In: Corke, H., and Walker, C.E. (eds) *Encyclopedia of Grain Sciences*. Elsevier, London, UK, pp 142–150

Erskine, W., Muehlbauer, F.J., Sarker, A., and Sharma, B. 2009. Introduction. In: Erskine, W., Muehlbauer, F.J., Sarker, A., Sharma, B. (eds) *The lentil: Botany, Production and Uses*. CAB International, Cambridge, UK, pp 1-3.

Erskine, W. (1996). Seed-size effects on lentil (*Lens culinaris*) yield potential and adaptation to temperature and rainfall in West Asia. *The Journal of Agricultural Science*, **126**:335-341.

Erskine, W., Chandra, S.; Chaudhry, M.; Malik, I.A.; Sarker, A.; Sharma, B.; Tufail, M. and Tyagi, M.C. (1990). A bottleneck in lentil: widening its genetic base in South Asia. *Euphytica*, **101**: 207–211.

Erskine W, Muehlbauer F J, Saker A, Sharma B. 2009. *The Lentil: Botany, Production and Uses*. CAB International,UK. p. 456.

FAO. (2016). FAOSTAT statistics database - Agriculture. [2017-04-23].<http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>.

FAO. 2006. Deuxième rapport national sur l'état des ressources phylogénétiques, INRAA.FAO (Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture).

FAOSTAT, 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Production:crops: 2016.

Fiocchetti, F., Laddomada, B., Roselli, M., Crino, P.and Lucretti, S. (2009). Fingerprinting of three typical *macrosperma* Italian lentil (*Lens culinaris* Medik.) landraces using fluorescence-based AFLP markers. *Sci. Hortic.* **121** : 383-87.

Furness C.A., Rudall P.J., 2004. Pollen aperture evolution - a crucial factor for eudicot success? *Trends in Plant Sci*, 9: 154-158.

Jahier J., Chevre AM., Delourme R., Eber F., Tanguy AM, (1992). Techniques de cytogénétique végétale. INRA, France, 184p.

Jha TB, Mahanti A, Ghorai A. (2015). Karyotype analysis of Indian lentils through EMA-based Giemsa staining. *Caryologia*. 68(4):280–288.

Jones R. N. (2012). B chromosomes in plants. *Plant Biosystems*, 146 (3): 727-737

Jones R.N and Rees H .(1982).B chromosomes. Ed Academic Press. London and New York.

Jones R.N., Viegas W., Houben A .(2008). A Century of B Chromosomes in plants – so what?

Annals of Botany,101: 767-775.

Hammouda D. and Abdel-hady I., 2008: N and C-banding analysis of chromosomes in wheat, *Triticum aestivum* L.Variety “Mahon-émias”. The Journal of Genetic Engineering and Biotechnology J.G.E.B, Egypt, vol 6, n1, p: 85-88.

Hammouda Dounia., (2013). *Evolution et organisation du génome chez xTriticosecale Wittmak.* Thèse de Doctorat en Sciences, Génétique et Amélioration des Plantes, Université de Constantine1, Algérie, 114p.

Hammouda D.et Khalfallah N.(2008): Comparative analysis of D and R genomes in two lignes (XTriticosecale Wittmack) and their genitors (*Secale cereale* L., *Triticum aestivum* L.)by N-banding. *Caryologia.* vol61, n3, p 245-252.

Hammadi H, Hammouda D, Djeghar R. 2018. Distribution of heterochromatic variability in several genotypes of *Lens culinaris* Medik (SSP microsperma and macrosperma). *Intl J Sci Res* 7: 1112.

HAMIDA HAMMADI ,DOUNIA HAMMOUDA-BOUSBIA, GHANIA CHAIB, ANFEL TIR.2021.Genetic diversity in several genotypes of Algerian lentil using biochemical markers. *BIODIVERSITAS*(22)6: 3494-2500.

Hammouda D, Khlaflah N. 2015. Etude comparative de la caryomorphologie chez six génotypes du *Lens culinaris* Medik. *Eur Sci J* 11: 212-214.

Hamwieh A., Udupa S., Sarker A., Jung C. et Baum M. 2009. Development of new microsatellite markers and their application in the analysis of genetic diversity in lentils.*Breeding Science* 59:77-86.

Hah, Z., Shah, S. H., Peoples, M. B., Schwenke, G. D., & Herridge, D. F. (2003). Crop residue and fertiliser N effects on nitrogen fixation and yields of legume-cereal rotations and soil organic fertility. *Field Crops Research*, 83, 1-11.

Harlan, J. R. (1992). *Crops and man* (p. 284). Second Ed. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.

Hanelt, P. (2001). Lens Mill. In P. Hanelt (Ed.), *Mansfeld's encyclopedia of agricultural and horticultural crops* (Vol. 2, 849–852). *Lens culinaris* Medicus Vorl. Churpf. Phys.-Okon. Ges., 2, 361 (1787).

Hallouet Pascal., Borry Anne., (2009). *Multiplication cellulaire Mémo- guide de biologie et de physiologie humaines*, Pp: 48-52.

Hawtin, G. C., Singh, K. B., & Saxena, M. C. (1980). Some recent developments in the understanding and improvement of Cicer and Lens. In R. J. Summerfield & A. H. Bunting (Eds.),

Advances In Legume Science (pp. 613-623).

Houben A., Nasuda S., takaskiR .(2011).Plant B Chromosomes. Chapter 5, p 97-111.

ITGC. (2013). Culture de lentille .www.itgc.dz.

ICARDA, 2014. ICARDA-Morocco Min Prep DNA Extraction Procedure. International Center for Research in Dry Area. 2p.

Idrissi, O., Udupa, S. M., Houasli, C., Keyser, E.D., Van Damme, P. and Riek, J. D. (2015).Genetic diversity analysis of Moroccan lentil(*Lens culinaris* Medik.) landraces using simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphisms reveals functional adaptation towards agroenvironmental origins. *Plant Breed.* **134** :322-32.

Idrissi, O., Udupa, M. S., Keyser, E. D., Van Damme,P. and Riek, J. D. (2016). Functional genetic diversity analysis and identification of associated simple sequence repeats and amplified fragment length polymorphism markers to drought tolerance in lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris* Medik.) landraces.*Plant Mole. Biol. Reporter* **34** : 659-80.

IPGRI. 1985. Descriptors for lentil (*Lens culinaris* Medik.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

Gaad D., Laouar M., Udupa S.M., McPhee K., Henkrar F., Abdelguerfi A. 2017. Diversity study of Algerian's Accessions of lentil (*Lens Culinaris* Medik.) by microsatellite.markers. *Research on Crops Journal*, 18, 4: 730-735.

Gaad D., Laouar M., Gaboun F., Abdelguerfi A. 2018. Collection and agro morphological characterization of Algerian accessions of lentil (*Lens culinaris*). *Biodiversitas*, 19 (1): 183-193. ISSN: 1412-033X-E-ISSN: 2085-4722. DOI: 10.13057/biodiv/d190125.

Gaffarzadeh-Namazi, L. R. Asghari-Zakaria, N. et K. Babaeian Kazemi-Tabar, (2007). Etude comparative de la morphologie des chromosomes et Patterns C-bandes dans plusieurs génotypes de *Lens culinaris* *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10:. 1811 -1816.

Galasso, I., T. Schmidt and D. Pignone., (2001). Identification of *Lensculinaris* sp. *Culinaris* chromosomes by physical mapping of repetitive DNA sequences. *Chromosome Res.*, 9 : 199-209.

Garcia B., Busby S., Barber C., Shabanowitz J., ALLIS C., Hunt D., (2004). Characterization of phosphorylation sites on histone H1 isoforms by tandem mass spectrometry. *Journal of Proteosome Research* 3. Pp: 1219-1227.

Ghorai., (2015). *Karyotype Analysis of Indian lentils through EMA based Giemsa staining*, Caryologia. Pp: 280-288.

Gill B. S and Friebe B 2009. Cytogenetic Analysis of Wheat and Rye Genomes.*Plant Genetics*

and Genomics:Crops and Models, Vol. 7: p 121.

Grewa S., Elgin S., (2007). Transcription and RNA interference in the formation of heterochromatin. *Nature* 447: Pp: 399-406.

Gupta, D. S., Cheng, P., Sablok, G., Thavarajah,D., Thavarajah, P., Coyne, C. and McGee,R. (2016). Development of a panel of unigene-derived polymorphic EST-SSR markers in lentil using public database information. *The Crop J.* **4** : 425-33.

Kara, K. (2008). *Field crops* (191, p. 307). Ataturk University, Faculty of Agricultural Engineering, Erzurum, Turkey.

Karadavut U .(2009). Path analysis for yield and yield components in lentil. *Turkish J. Field Crops*, 14: 97-104.

Karim Baziz,.(2015). Organisation du génome et étude palynologique de quelques espèces algériennes du genre *Astragalus* L.these doctorat en science .Un.Freres Mentouri Constantine

Kaur, S., Cogan, N., Pembleton, L., Shinozuka, M., Savin, K., Materne, M. and Forster, J. (2011) Transcriptome sequencing of lentil based on second-generation technology permits large-scale unigene assembly and SSR marker discovery. *BMC Genomics*, doi: 10.1186/1471-2164-12-265.

Khazaei, H., Caron, C.T., Fedoruk, M., Diapari, M., Vandenberg, Al., Coyne, C.J., McGee, R. and Bett, K.E._(2016) Genetic diversity of cultivated Lentil (*Lens culinaris* Medik.) and its relation to the world's agro-ecological zones. *Front. Plant Sci.* **7**, 1093.

Kumar S K, Barpete S, Kumar J, Gupta P, Sarker A. (2013).Global lentil production: Constraints and strategies. *SATSA Mukhapatra - Annual Technical Issue*, 17, 1–13.

Kumar, S., Hamwiah, A., Manickavelu, A., Kumar, J., Sharma, T.R. and Baum, M. (2014) "Advances in Lentil Genomics". In: "*Legumes in Omics Era*", S. Gupta, N. Nadarajan, and D.S. Gupta (Ed.), pp. 111- 130. NewYork: Springer Science + Business Media.

Kumar J. and Abbo S.,(2001). Genetics of flowering time in chickpea and its bearing on productivity in semiarid environments. *Advances Agronomique.*, 72:107-138.

Karadavut U .(2009). Path analysis for yield and yield components in lentil. *Turkish J. Field Crops*, 14: 97-104.

Kumar, S., Rajendran, K., Kumar, J., Hamwiah, A., and Baum, M. (2015). Current knowledge in lentil genomics and its application for crop improvement. *Front Plant Sci.* **6**,78.

Levan A., Fredga K., Sandberg A.A., 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220

Ladizinsky G, Hymowitz T. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary

studies. *Theor Appl Genet* 54: 145-151. DOI: 10.1007/BF00263044

Ladizinsky, G. (1987) Pulse domestication before cultivation. *Econ. Bot.* 41: 60-65

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259): 680-685. DOI: 10.1038/227680a0

Lazaro A, Ruiz M, Rosa D, Mart I. 2001. Relationships between agro/morphological characters and climatic parameters in Spanish landraces of lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Genet Resour Crop Evol* 48: 239-249.

Malek M.A. 2012. Morphological characterization of lentil accessions: Qualitative characters. *Bangladesh J. Bot.* 41 (2):187-190.

Mbagwu., FN., Chime EG., Unamba CIN, (2008). Palynological studies of five species of Asteraceae. *J Pl Sci* 3(1): 126 – 129.

McVicar, R., P. McCall, C. Brenzil, S. Hartley, K. Panchuk, P. Mooleki, and Risula, D. (2010). Lentil in Saskatchewan. <http://publications.gov.sk.ca/documents/20/86381/Lentils%20in%20Saskatchewan.pdf>. (Accessed: April 20, 2012).

Maghni B., Khedim R., Ait-Hammou M, (2013). Etude palynologique de la flore spontanée de la forêt domaniale de Tiaret. Vol 9: 1112-5888p. *Ecologie-Environnement*.

Malan V., Romana S., (2012). *Diagnostic des anomalies chromosomiques par CGH array en pathologie constitutionnelle : la fin du caryotype en première intention* Archives de Pédiatrie, 19 : Pp: 437-442.

Mamecier Demounem A., (2012). *Dico de bio*. Edition de boeck, 3^e édition. Louvain la neuve. Belgique. 48p.

Marie, A. J., Loren L., Rudolf O., et James R , (2007). Chromosome Malorientations after Meiosis II Arrest Cause Non disjunction. *Mol Biol Cell.* 2007 May; 18(5): 1645–1656.

Maria Teruel, Josefa Cabrero, and Framisco Perfectti, (2009). In order to increase the knowledge of molecular content.

Maria D. Cristobal, Valentin P, Baudillio H (2014). MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF LENTIL (*LENS CULINARIS* MEDIK.) LANDRACES FROM CASTILLA Y LEÓN, SPAIN. *Pak. J. Bot.*, 46(4): 1373-1380.

Mehra RC, Butler MG, Beckman T. 1986. N banding and karyotype analysis of *Lens culinaris*. *J Hered.* 77(6):473–474.

Mekonnen, F., Mekbib, F., Kumar, S., Ahmed, S. and Sharma, T. R. (2015). Molecular diversity and population structure of the Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medik.) genotype assessment using SSR markers. *J. Crop. Sci. Biotech.* 19 : 1-15.

- Milne L, (2005).** A grain of truth. how pollen brought a murderer to justice. reed new Holland publ., sydney, australia.
- Mondal M M A, Puteh A B, Malek M A, Ismail M R, Rafii M Y and Latif M A (2012).** Seed yield of mungbean (*Vigna radiate* (L.)Wilczek) in relation to growth and developmental aspects.Sci. World J. Volume 2012, Article ID 425168, 7 pages,doi:10.1100/2012/425168.
- Mondal, M.A.; Puteh, A.; Malek, M.; Roy, S.; Yusop, M.(2013).** Contribution of morpho-physiological traits on yield of lentil (*Lens culinaris* Medik) *Aust. J. Crop Sci.* 2013, 7, 167–1172.
- Muehlbauer, F.J. (2011).** Lentil: In compendium of chickpea and lentil diseases and pest. Washington State University, Pullman: The American Phytopathological Society Press, Pullman: USA, pp 3-5.
- Muehlbauer, F. J., Kaiser, W. J., Clement, S. L., & Summerfield, R. J. (1995).** Production and breeding of lentil. *Advances in Agronomy*, 54, 283-332.
- Obaton., (1980).** Activité nitrate réductase et nitrogénase en relation avec la photosynthèse et les facteurs de l'environnement. Bulltin ASF., 55-60.
- Omar Idrissi., (2012).** Comparaison de lignées avancées de lentille sous stress hydrique durant la phase de floraison et formation des gousses. Nature and technologie. B- sciences agronomiques et biologiques, 8: 54p.
- Ozdemir, S. (2002).** *Grain legume crops* (p.142). Hasad Publishing, Istanbul, Turkey.
- Özler H., Kaya Z., Pehlivan S, (2009).** Pollen Morphology Of Some Centaurea L.Psephellus Cass. and Cyanus Miller. *Taxa Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 51(2): 53–66.
- Piergiovanni AR (2000)** The evolution of lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivation in Italy and its effects on the survival of autochthonous populations. *Genet Resour Crop Evol* 47:305–314.
- Pinar N.M., Akan H., Ceter T., Aytac Z., Ekici M., Acar A., Akdogan S, (2014).**Comparative pollen morphology of annual *Trigonella* L. (Fabaceae) in Turkey. *Plant Syst Evol.*300:689–708 .
- Pulse Canada. (2016).** Lentils. <http://www.pulsecanada.com/food-health/what-is-a-pulse/lentil>.
- Rahman M.M., Sarker A., Kumar S., Ali A. et Lutfor M. 2009.** Breeding for short season environments. In Erskine W, Muehlbauer FJ, Sarker A, Sharma B (ed.) *The Lentil:Botany, Production and Uses*. CAB Intern, Cambridge, pp121–136
- Raghuvanshi, R. S., & Singh, D. P. (2009).** The lentil: botany, production and uses. In W. Erskine, F. J. Muehlbauer, A. Sarker, & B. Sharma (Eds.), *Food Preparation and Use* (p. 408-424).
- Renault-miskovsky J et Petzold M, (1992).** Spore et pollen .Ed. La Duraulie, Paris, 360p.
- Ressayre, A., B. Godelle, C. Raquin, and P.H. Gouyon, (2002).** Aperture pattern ontogeny in

angiosperms. *Journal of Experimental Zoology* 294: 122–135.

Roy S., Islam M.A., Sarker M.Y., Ismail M.R., M.A., Rafii Mondal M.M.A. et

Saskatchewan Pulse Growers., (2000). *Pulse production manual*. Saskatchewan Pulse Growers, Saskatoon SK.

Ruisi, P. M. Longo, F. Martinelli, G. Di Miceli, A. S. Frenda, S. Saia, F. Carimi, D. Giambalvo and G. Amato (2015). MORPHO-AGRONOMIC AND GENETIC DIVERSITY AMONG TWELVE SICILIAN AGRO-ECOTYPES OF LENTIL (*LENS CULINARIS*). The Journal of Animal & Plant Sciences, 25(3): Page: 716-728.

Samouelian F., Gaudin V., Boccara M., 2009. Génétique moléculaire des plantes. Quae Ed., 208p.

Sandhu J. S. AND Sarvjeet S. (2007). Chapter · September 2007. DOI: 10.1007/978-1-4020-6313-8_1 CHAPTER 1 HISTORY AND ORIGIN.

Sehirali, S. (1988). *Grain legume crops*. Ankara University, Faculty of Agricultural Engineering, Ankara, Turkey 1089 (314), p. 435.

Shapiro J.A., Vonr., (2005). *Pourquoi l'ADN répétitif est essentiel à la formation du génome*. Examen biologiques de la Cambridge philosophical society. U.S. Bibliothèque nationale de médecine.

Siljak-Yakovlev S., (1986). Etude cytogénétique et palynologique de *Compositae* endémiques ou reliques de la flore yougoslave. Thèse d'Etat, Université de Paris-Sud.

Siljak-Yakovlev S., CARTIER D., (1986). *Hétérochromatin patterns in some taxa of crepispraemorsa complex*. Caryologia, Pp: 39, 27-32.

Singh, D., Singh, C. K., Sewak, R., Tomar, S. and Taunk, J. (2016). Molecular assortment of *Lens* species with different adaptations to drought conditions using SSR markers. *PloS ONE* 11 : 1-27.

Sobia Rasheed¹, M. Hanif¹, Siddique Sadiq², Ghulam Abbas², M. Jawad Asghar and M. Ahsanul Haq (2008). inheritance of seed yield and related traits in some lentil (*Lens culinaris* Medik) GENOTYPES *Pak. J. Agri. Sci., Vol. 45(3), 2008*.

Statistics Canada. 2016. Principle field crop areas. <http://www.statcan.gc.ca/daily-quotidien/160629/dq160629a-eng.htm>. (Accessed: June 29, 2016).

Soyema Khatun, Md. Monjurul Alam Mondal, Md Ibrahim Khalil, Md. Mahi Imam Mollah, Md. Kamruzzaman. (2016). Impact of Morpho-Physiological Traits on Seed Yield of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) *International Journal of Agriculture Innovations and Research*.

Thavarajah D, Thavarajah P, Wejesuriya A, Rutzke M, Glahn RP, Combs Jr GF,

- Vandenberg A.** 2011. The potential of lentil (*Lens culinaris* L.) as a whole food for increased selenium, iron, and zinc intake: preliminary results from a 3 year study. *Euphytica* **180**, 123- 128.
- Timir baran Jha., Apurba M etAnimesh Vandenberg A., Slinkard AE., (1990).** *Genetics of seed coats color and pattern in lentil.* Journal of Heredity. 81: Pp : 484–488.
- Toklu, F., B.T. Bicer and T. Karakoy.(2009).** Agromorphological characterization of Turkish lentil landraces. *Afr. J. Biotechnol.*, 8(17): 4121-4127.
- Togay, N., & Anlarsal, A. E. (2008).** The effects of different planting densities and sowing methods on yield and yield components of lentil (*Lens culinaris* Medic.) in Van conditions. *Yuzuncu Yil Univ. J. Agric. Sci.*, 18(1), 35-47.
- Towill L.E, (1985).** Low temperature and freeze-vacuum drying preservation of pollen. Dans:K.K. Katho (éd.). Cryopreservation of plant cells and organs. CRC Press Inc., Boca Raton:transgressivesegregants in earlygenerationusing single seeddescentmethod-derived tropicale. Fondation Prota, Wageningen, Pays-Bas. P:102.
- Tuba, B.D.; Sakar, D(2008).** Studies on variability of lentil genotypes in southern Anatolia of Turkey. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj*, 36, 20–24.
- Tuhin P, Ghosh S, Mondal A, De KK. 2016.** Evaluation of genetic diversity in some promising varieties of lentil using karyological characters and protein profiling, *J Genet Eng Biotechnol* 14 (1): 39- 48. DOI: 10.1016/j.jgeb.2016.03.003.
- Turleau C ., Prieur M, (2000).**Types, fréquences et mécanismes de formation des anomalies chromosomiques. Service de cytogénétique Necker Enfants Malades.
- Tyagi SD, Khan MH.,(2011).**Correlation, path coefficient and genetic diversity in lentil (*Lens culinaris* Medik) under rainfed conditions. *Int Res J Plant Sci.*;2:191–200.
- Tullu, A., I. Kusmenoglu, K.E. Mcphee and F.J. Muehlbauer.(2001).** Characterization of core collection of lentil germplasm for phenology, morphology, seed and straw yields. *Genet. Resour. Crop Ev.*, 48: 143-152.
- UPOV, 2013.** Lentille: principes directeurs pour la conduite de l'examen de la distinction, de l'homogénéité et de la stabilité. Union internationale pour la protection des obtentions végétales. TG/210/2(proj.4).
- Villodre JM., Garcia-Jacas N, (2000).** Pollen studies in subtribe Centaureinae (Asteraceae):the Jacea group analyzed with electron microscopy. *Botanical Journal of the Linnean society*133:473-484.
- Walker J.W., Doyle J.A, (1975).** The bases of angiosperm phylogeny: palynology. *Ann Missouri Bot Garden*, 62: 664-723.

- Whyte, R. O., Leissner, G. N., & Trumble, H. C. (1953).** Legume in agriculture. *Fao agricultural studies*, 21, 323-325.
- Wodehouse R.P, (1928).** The Phylogenetic Value of Pollen-Grain Characters. *Annals Bot*,XLII: 891-936.
- Wodehouse R.P, (1935).** Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine. McGraw-Hill Book Company, New York London. 574.
- Wolfe , K. H, (2001) .** Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews. Genetics* 2 : 333 – 341 .
- Wong, M.M.L., Gujaria-Verma, N., Ramsay, L., Yuan, H.Y., Caron, C., Diapari, M., Vandenberg, A., and Bett, K.(2015).** Classification and characterization of species within the genus *Lens* using genotyping-by sequencing (GBS). *PLoS ONE* 10(3): e0122025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122025>.
- Yadav S. S., Redden R., Chen W and Sharma B., (2007).** Chickpea breeding and management. Cambridge library of Congress. (Livre).
- Younis et al., (2008) .** Younis N, Hanif M, Sadiq S, Abbas G, Asghar MJ, Haq MA. Estimation of genetic parameters and path analysis in lentil. *Pak J Agri Sci.* 2008;45:44–48.
- Zaghoun Omar., (2011).** *Maladies fongiques de la lentille. Institut Technique des Grandes Cultures.* Algérie, ALGERIE. Pp: 3 - 8.
- Zaccardelli, M., Lupo, F., Piergiovanni, A.R., Aghetti, G., Sonnante, G., Daminati, M.G., Sparvoli, F. and Lioi, L. (2012)** Characterization of Italian lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm by agronomic traits, biochemical and molecular markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 59, 727-738.
- Zohary, D., (1972).** The wild progenitor and place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Econ Bot* 26: 326–332.



Annexes

Annexe 1 : les moyennes des paramètres agro-morphologiques de 12 génotypes.

Genotypes	HP 30	HP 60	HP M	NBP	NBS	Nleaflet LF	SF	DF
Idlep1	6.1	22.33	32.33	1	2.66	16.66	6.51	74.33
Idlep2	7.36	23.16	29.66	1	1.33	15.66	5.65	77
Idlep3	4.93	20.43	26.66	1	4	13.33	4.99	71.33
Metropole	6.16	17.83	25.33	1.33	2.33	14.66	7.75	73.33
Ibla	5.12	24	33.83	2.33	3.33	13.33	7.13	75.33
Balkane755	5.96	17.43	27	1	2.66	14	6.83	73.33
Nile45	6.3	15.16	23.66	1.33	2	13.33	7.05	71.66
Syrie229	7	21.16	30.5	1.33	2.66	14.33	7.46	72.33
Flip90-31	6.6	22.33	30	2	5.33	12.33	6.81	71.33
Redjes	7.03	19.23	33.66	1.66	2.66	13.66	8.15	75.33
Dahra	7	20.1	28.83	1.33	1.33	16	6.05	74.33
Idlep4	8.43	18.83	32	2	2.33	15.33	6.35	75

Continu tableau

DM	NP/P	NG/P	S1000	BIO /P	harvest index
103.66	26.66	12.33	11.71	2.45	78.32
105.33	20.66	12.33	13.23	2.23	76.96
97.33	15.33	16.33	9	1.86	79.6
116.33	27.66	9.33	12.51	2.52	64.89
107.66	27.66	33.66	14.16	3.08	58.58
115.33	22.33	25	12.31	1.46	72.12
103.33	23.33	31.33	18.65	2.76	67
101.33	17.33	7.37	12.12	2.14	77.03
100.33	32.33	40.66	16.59	3.15	58.7
114.33	21.66	31	16.35	2.79	68.54
105.33	20.66	15.66	13.51	2.01	78.51
104.33	33.33	20.33	11.99	1.89	82.04

Annexe 2 : Statistiques descriptives des propriétés physiques des graines des génotypes de lentilles .

Variable	Observations	Minimum	Maximum	Moyenne	Ecart-type
HP 30	12	4.930	7.360	6.531	0.678
HP 60	12	15.160	24.000	20.097	2.656
HP M	12	23.660	33.830	29.218	3.173
NBrP	12	1.000	2.330	1.469	0.388
NrBS	12	1.660	3.660	2.718	0.600
Nfo/F	12	12.330	16.660	14.385	1.301
SF	12	4.990	8.150	6.728	0.890
NJF	12	71.330	77.000	73.636	1.679
NJM	12	97.330	116.330	106.246	6.107
NGo/P	12	20.000	37.330	29.719	4.868
NG/P	12	16.660	39.660	29.328	6.612
PMG	12	37.320	75.160	54.892	10.252
RBIO /P	12	2.760	3.890	3.213	0.400
IR	12	46.110	59.210	54.612	4.201
PG	12	1.600	1.940	1.763	0.097

Analyse de la variance (Variable HP 30) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	15.160	1.378	3.115	0.010
Erreur	24	10.620	0.442		
Total corrigé	35	25.780			

Analyse de la variance (Variable HP 60) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	232.760	21.160	5.951	0.000
Erreur	24	85.340	3.556		
Total corrigé	35	318.100			

Analyse de la variance (Variable HP M) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	332.222	30.202	12.717	< 0.0001
Erreur	24	57.000	2.375		
Total corrigé	35	389.222			

Analyse de la variance (Variable NBrP) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	6.333	0.576	2.073	0.066
Erreur	24	6.667	0.278		
Total corrigé	35	13.000			

Analyse de la variance (Variable NrBS) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	34.972	3.179	1.449	0.215
Erreur	24	52.667	2.194		
Total corrigé	35	87.639			

Analyse de la variance (Variable Nfo/F) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	55.889	5.081	6.532	< 0.0001
Erreur	24	18.667	0.778		
Total corrigé	35	74.556			

Analyse de la variance (Variable SF) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	26.225	2.384	3.602	0.004
Erreur	24	15.884	0.662		
Total corrigé	35	42.109			

Analyse de la variance (Variable NJF) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	103.417	9.402	16.923	< 0.0001
Erreur	24	13.333	0.556		
Total corrigé	35	116.750			

Analyse de la variance (Variable NJM) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	1230.750	111.886	335.659	< 0.0001
Erreur	24	8.000	0.333		
Total corrigé	35	1238.750			

Analyse de la variance (Variable NGo/P) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	782.556	71.141	5.426	0.000
Erreur	24	314.667	13.111		
Total corrigé	35	1097.222			

Analyse de la variance (Variable NG/P) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	1693.889	153.990	14.983	< 0.0001
Erreur	24	246.667	10.278		
Total corrigé	35	1940.556			

Analyse de la variance (Variable PMG) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	3467.520	315.229	378.654	< 0.0001
Erreur	24	19.980	0.833		
Total corrigé	35	3487.500			

Analyse de la variance (Variable RBIO /P) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	4.883	0.444	12.342	< 0.0001
Erreur	24	0.863	0.036		
Total corrigé	35	5.747			

Analyse de la variance (Variable PG) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	0.313	0.028	3.025	0.011
Erreur	24	0.226	0.009		
Total corrigé	35	0.540			

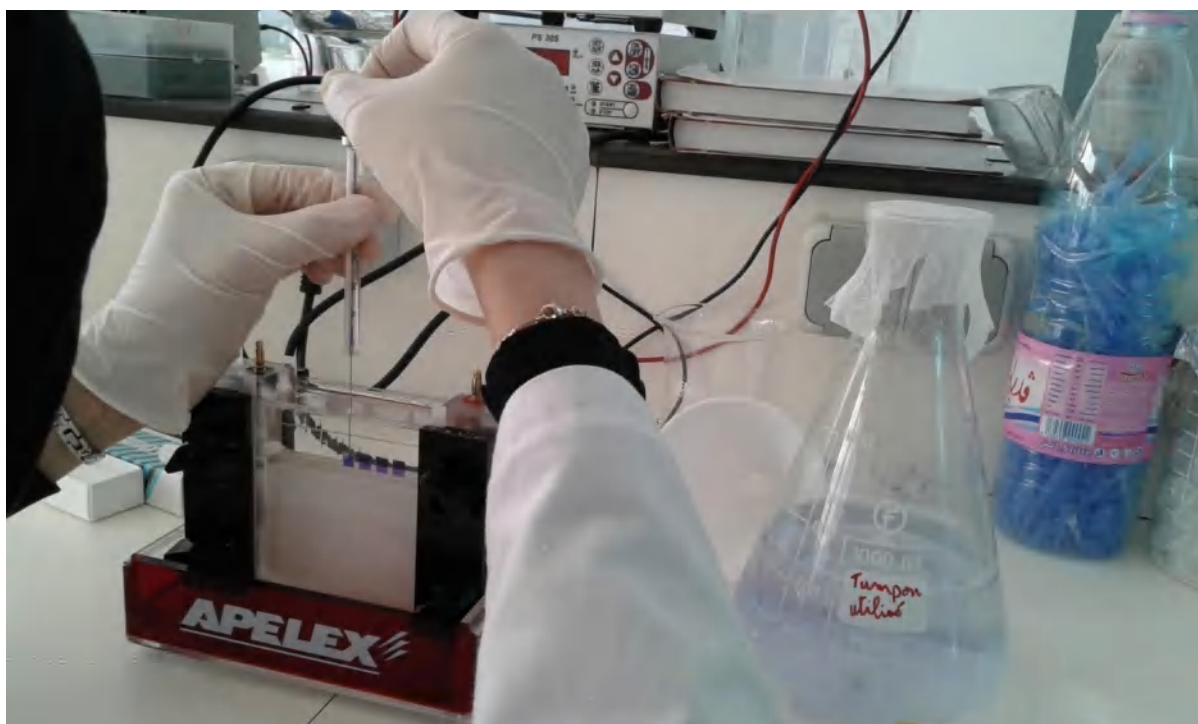
Analyse de la variance (Variable IR) :

Source	DDL	Somme des carrés	Moyenne des carrés	F	Pr > F
Modèle	11	587.544	53.413	4.177	0.002
Erreur	24	306.886	12.787		
Total corrigé	35	894.430			

Annexes 2: Le pourcentage de viabilité de 7 géotypes chez *Lens culinaris*.

Géotypes	Grains de pollen colorés	Grains de pollen Non colorés	Total	Pourcentage de la viabilité
Balkane 755	200	/	200	100 %
Syrie 229	199	1	200	99.5%
Flip90-31	200	/	200	100%
Idleb 2	194	6	200	97%
Idleb 3	190	10	200	95%
Ibla	198	2	200	99%
Idleb 4	199	1	200	99.5%
Idlep1	198	2	200	99%
Métropole	200	/	200	100%
Dahra	194	6	200	97%
Nil 45	197	3	200	98.5%
Moyenne				98.59%

Annexe3: Extraction et Séparation des protéines



Annexe 4 : Préparation des solutions essentielles pour l'extraction.

➤ **Solution Stock de CTAB x2 : (100ml)**

Une solution Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) est préparée avec les composants ci-dessous :

0,2 ml de β -mercaptoéthanol qui dénature les protéines.

10 ml de Tampon Tris HCl (1 M) inactivant les désoxyribonucléases (ADNase).

25 ml de NaCl (5 M) permet une stabilisation d'ADN, où les ions Na^+ se lient avec les ions négatifs.

4 ml de EDTA (0,5 M) qui est un chélateur d'ions bivalents surtout les cations Mg^{2+}

et qui permet également une inactivation des désoxyribonucléases.

2 g de CTAB poudre qui favorise la destruction de la membrane cellulaire et nucléaire et libération du contenu cellulaire.

compléter par l'eau distillée jusqu'à 100 ml

➤ **Solution stock de 1 M Tris-HCl**

12,114g de Tris base

Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100ml

Ajuster le pH à 8 avec la solution HCl concentrée.

➤ **Solution stock de Na Cl**

73,05g

Compléter par l'eau distillée jusqu'à 250 ml

➤ **Solution stock d'EDTA**

18,6g d'EDTA

Compléter par l'eau distillée jusqu'à 100ml

Ajuster le pH8 avec les pelletes de NaOH.

➤ **Solution de Chloroforme / Isoamyl alcool:**

Chloroforme / isoamyl alcool (24 : 1)	Pour 25 mL	100 mL
Chloroforme (Scharlau)	24 mL	96 mL
Isoamyl alcool ou 3- Methylbutanol (Sigma)	1 mL	4 mL

➤ **Solution de 70% Ethanol:**

70% Ethanol	Pour 100 mL
Ethanol absolu ou Ethanol Anhydrous denatured (Amresco)	70 mL
Eau distillée	30 mL

➤ **Gel de 1% agarose:**

Solution d'agarose	Pour 90 mL	Pour 300 mL
Agarose (Promega)	1.08 g	3.6 g
5 X TBE	18 mL	60 mL
Eau distillée	Compléter jusqu'à 90 mL	Compléter jusqu'à 300 mL

➤ **Solution de 40% acrylamide:**

40% Acrylamide	Pour 50 mL	Pour 250 mL

Acrylamide (Promega)	19.33 g	96.65 g
Bis acrylamide ou N, N'-Methylenebisacrylamide (Sigma)	0.67 g	3.35 g
Eau distillée	50 mL	250 mL

➤ **Solution de bromure d'éthidium (BET):**

Solution diluée de Bromure d'éthidium	Pour 1 L
Bromure d'éthidium (10 mg/mL)	100 µL
Eau distillée	1 L

➤ **Préparation de gel d'acrylamide 8 %, pour les plaques de 150 ml :**

22,5 ml d'acrylamide 40%

15 ml de TBE × 5

On complète par l'eau distillé jusqu'à 150 ml

❖ Après la préparation des plaques, On ajout les deux agents gélifiants suivants

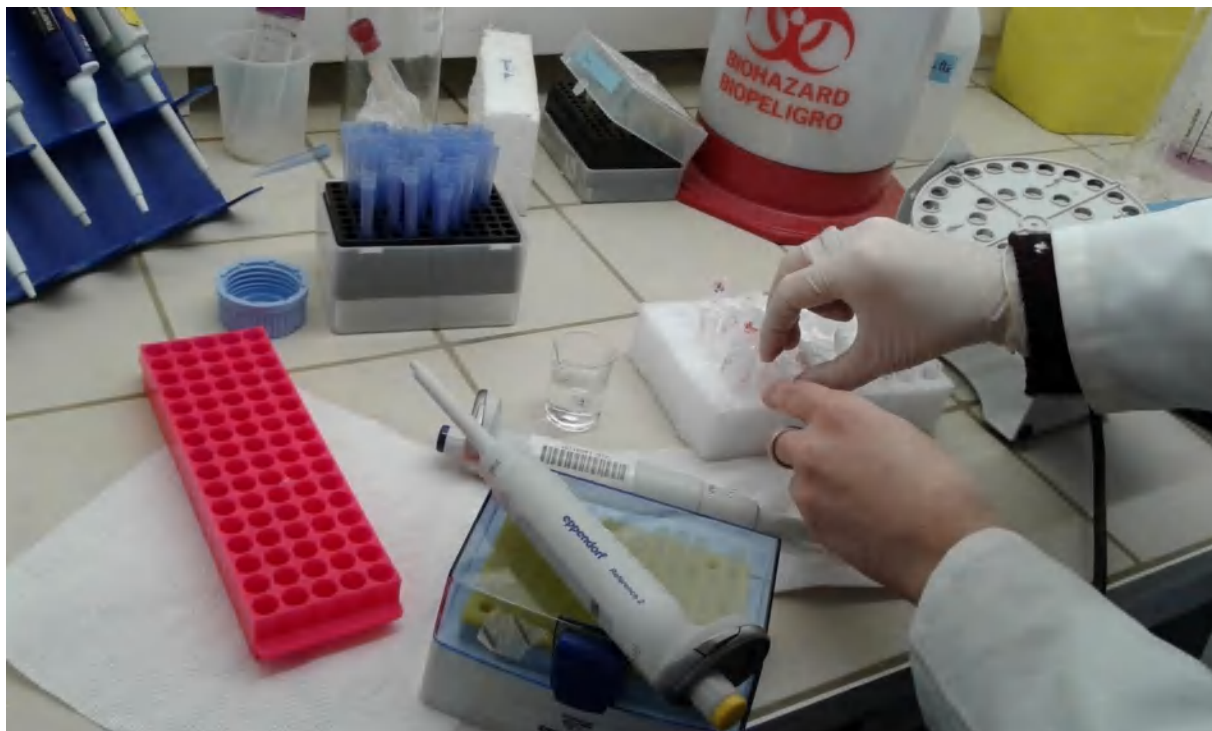
400 µL d'APS (25%)

111 µL de TEMED

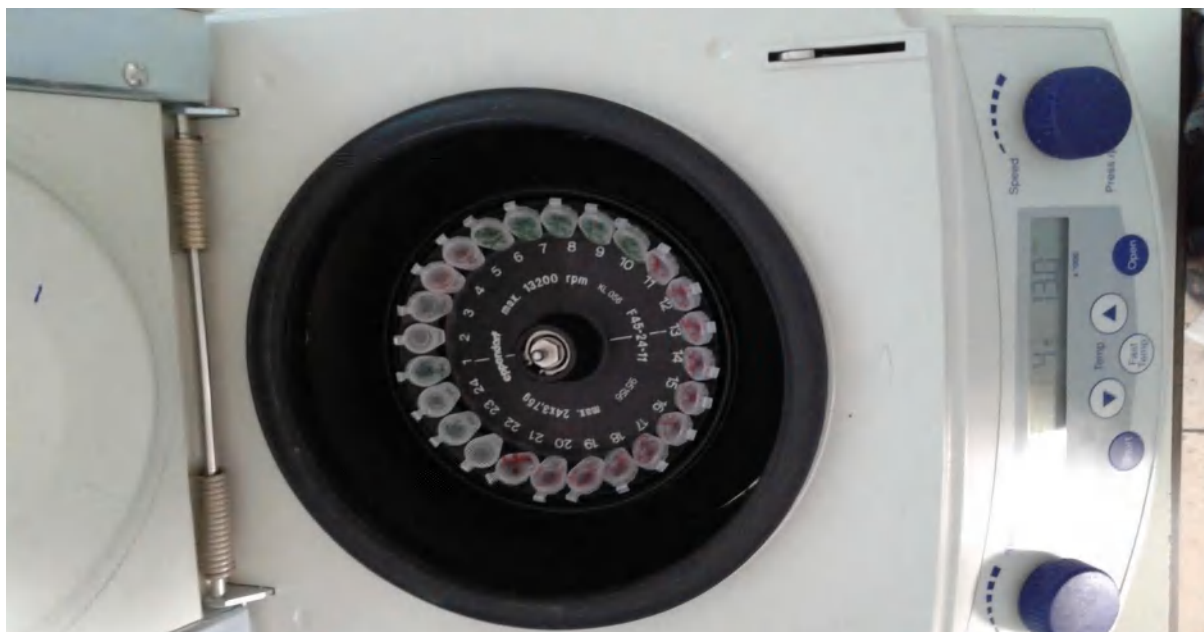
➤ **Préparation de solution NAOH :**

Le rinçage des plaques avec NAOH permet d'éviter la fixation du gel sur la plaque. (40g de poudre NAOH+ 1L d'eau ultra pure).

Annexe 5: extraction de l'extraction d'ADN.









Annexe 6: Protocole ICARDA de l'extraction d'ADN.

- Préchauffer le mortier et le pastel à 65 °C;
- Préchauffer la solution CTAB solution dans un bain marie à 65 °C;
- Ecraser 50-100 mg des jeunes feuilles. Puis, ajouter 1500 µl de la solution CTAB et continuer à écraser;
- Incuber le contenu dans un bain marie à 65 °C pendant 45 – 60 min. Mélangé doucement tous les 15 à 20 min;
- Après incubation, ajouter 500 µl de chloroforme iso amyle-alcool. Mélanger vigoureusement pendant 15 min;
- Centrifugé à 13000 tours pendant 15 min (à une température ambiante);
- Prélever 1 ml de surnageant dans un autre tube eppendorf (capacité 1.5 ml);
- Ajouter 666 µl of isopropanol et mélange bien. Laisser précipiter l'ADN pendant 30 min à une température ambiante;
- Centrifuger à 13000 tours pour 10 min;
- Récupérer le culot et jeter le surnageant;
- Laver le culot avec 1 ml de 70% éthanol;
- Centrifuger à 13000 tours pour 5 min;

- Jeter le surnagent et sécher le culot;
- Suspendre le culot dans 100 μ l de 0.5 x TE solution et conserver le stock ADN à 4 ° C.

Annexe 07 : électrophorétique des amorces SSR317-1,SSR130,SSR184 sur gel de polyacrylamide.

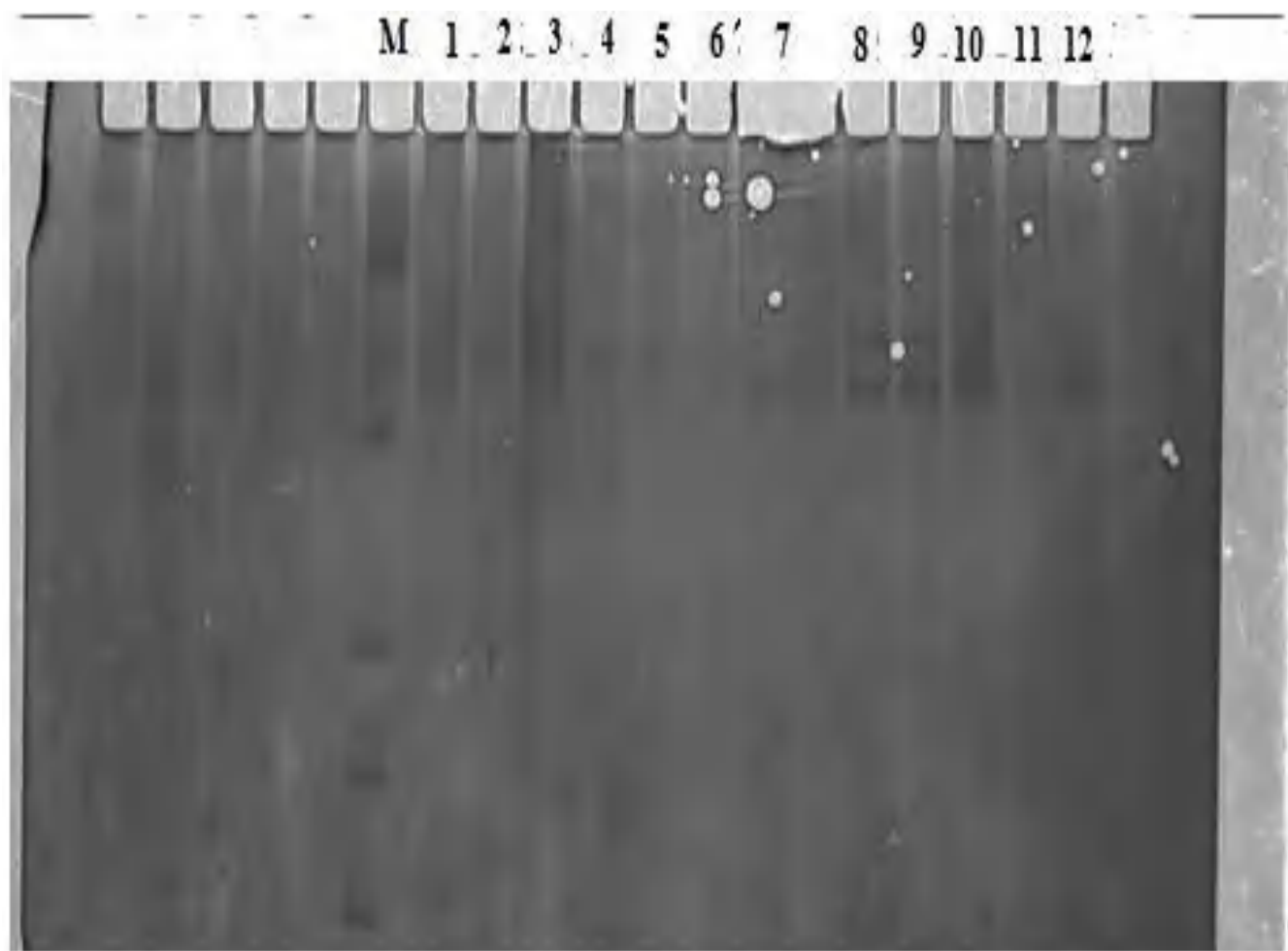


Figure : Profil électrophorétique de l'amorce SSR317-1 sur gel de polyacrylamide chez 12 génotypes de la lentille après l'amplification par PCR, lignee 1-12 représentent les génotypes.

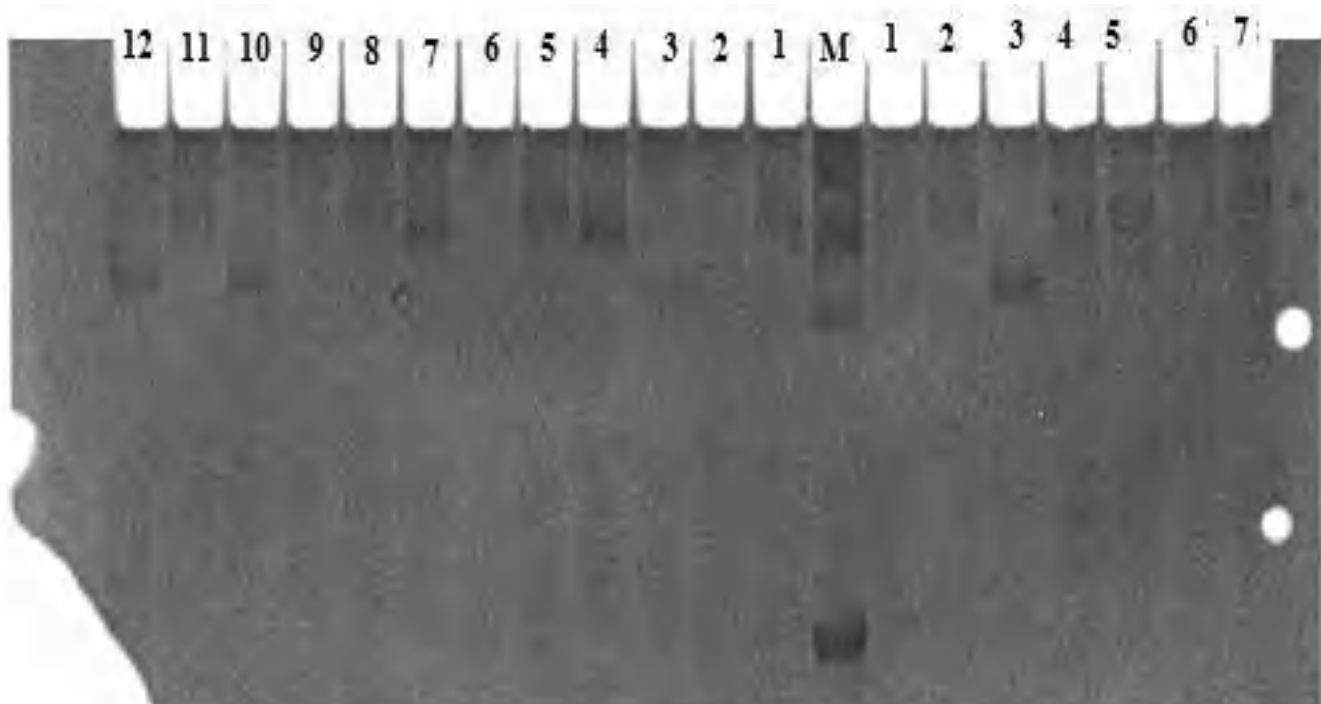


Figure: Profil électrophorétique de l'amorce SSR184 sur gel de polyacrylamide chez 12 génotypes de la lentille après l'amplification par PCR, ligne 1-12 représentent les génotypes.

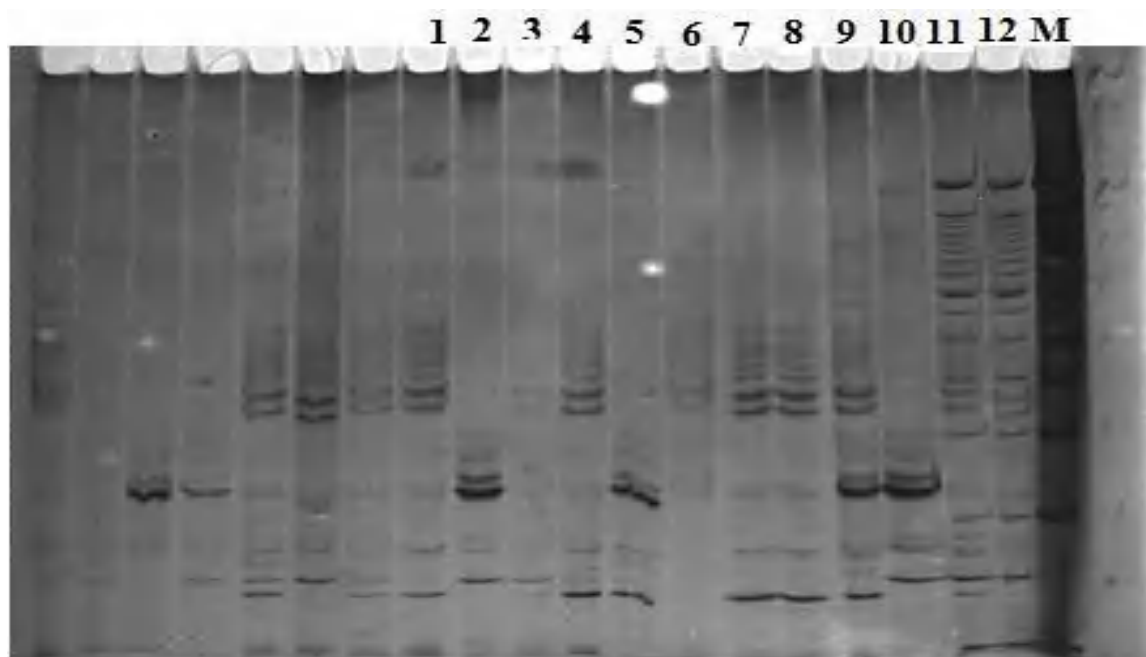


Figure : Profil électrophorétique de l'amorce SSR130 sur gel de polyacrylamide chez 12 génotypes de la lentille après l'amplification par PCR, ligne 1-12 représentent les génotypes.

Thème : Analyses morphologique, cytogénétique et moléculaire du *Lens culinaris* Medik(Ssp *Macrosperma* et *Microsperma*) : importance de cette espèce en agronomie.

Résumé

La lentille (*Lens culinaris*), une des principales cultures légumineuses alimentaires cultivées en Algérie. L'objectif de ce travail est l'évaluation de la variabilité génétique de 12 génotypes à travers des approches agro-morphologiques, cytogénétiques, biochimiques et moléculaires.

Des nombreux travaux sont effectués à différents niveaux (plante, graine, cellule, chromosome, protéine et ADN). Ces travaux consistent à étudier la caractérisation agro morphologique réalisée sur 15 paramètres quantitatifs, d'établir une étude cytogénétique détaillée (analyse du caryotype, NORs, N-banding et C-banding, méiose et palynologie), l'analyse biochimique pour mettre en évidence la teneur en protéines par la technique SDS-PAGE. Parallèlement, une caractérisation moléculaire effectuée à partir de 7 marqueurs microsatellites proposés.

Les génotypes Idlep3 et Flip90-31 ont révélés un potentiel de rendement élevé et l'existence d'une différence significative selon les paramètres morphologiques qui expliquent une variation inter-génotypique importante, les scores PC1 (F1) et PC2 (F2) sont calculés comme 36,87 et 21,93 % de la variance totale, respectivement. Selon le clustering hiérarchique ascendant, l'analyse a révélé cinq groupes majeurs avec une différentiation des types de graines (*Macrosperma* et *Microsperma*).

Les résultats cytogénétiques montrent une régularité entre la mitose et la méiose. Les caryotypes sont symétriques. une corrélation positive est mise en évidence entre le taux d'hétérochromatine et le nombre de NOR. a partir des bandes C et N. Nos résultats sont originaux, consternant la détermination des chromosomes marqueurs 1, 2,3,4 , alors que les chromosomes 5,6,7 en sont dépourvues. A noter également, la présence de satellites et de chromosomes B de types (euchromatique et hétérochromatique), dans ce cas là, pourrait être expliquée comme une manifestation de leur adaptation. Egalement, nous avons observé des anomalies méiotiques, et l'existence d'une variabilité par l'étude les caractères biométriques de pollens des différentes génotypes ce qui reflète la grande diversité.

Le polymorphisme du motif de bandes protéiques (84 %) a révélé une variabilité inter-génotypique. Le gel obtenu a montré quarante bandes allant de 13 à 21 avec un poids moléculaire de 10 à 120 KDa. Le génotype Idlep3 est caractérisé par des bandes spécifiques, suivi du génotype Flip90-31.

Une grande variabilité génétique caractérise les génotypes de lentille. Le nombre d'allèles par locus varie de 2 (SSR317-1) à 6 (SSR19,SSR 151) et l'indice PIC variait entre 0,42 à 0,75 . La fréquence de l'allèle le plus courant à chaque locus varie de 42 %(SSR317-1) à 75 % (SSR28, SSR19). Sur la base des coefficients de similarité génétique 44%, l'analyse de dendrogramme révélé une grande diversité observée chez les génotypes, et il sépare les génotypes en cinq groupes. Signalons, qu'il n'existe pas une relation entre l'origine géographique des génotypes et la distance génétique.

La relation génétique découverte dans cette étude pourrait constituer à la base de futurs programmes de sélection systématique de lentilles.

Les génotypes Idlep3 et Flipe90-31 marquent les rendements les plus élevés et se caractérisent par des bandes spécifiques (ou marqueurs spécifiques) ,ce qui suggère que ce sont les génotypes les plus adaptés. Donc, nous pouvons les proposer aux agronomes de les utiliser dans les croisements des lentilles pour la sélection végétale.

Mots clés : Bandes C, Bandes N, Caryotype, Chromosomes marqueurs, chromosomes B , *Lens culinaris*, NORs, Polymorphisme , Satellites, SDS-PAGE, SSR.

Laboratoire de recherche : laboratoire de Génétique, Biochimie et Biotechnologies Végétales

Jury d'évaluation :

Président :	BOUSBA Ratiba	Professeur Uni. Frères Mentouri-Constantine1.
Directeur de la thèse :	HAMMOUDA Dounia	Professeur Uni. Frères Mentouri- Constantine1
Examineurs :	CHAIB Ghania	Professeur Uni. Frères Mentouri-Constantine1.
	KANOUNI Malika	Professeur Uni. Om-EL Bouaghi.
	BOUNAR Rabeh	Professeur Uni. Mohamed Boudiaf-M'sila.
	BAZIZ Karim	M. C.A Uni. Hadj Lakhdar-Batna.