

République Algérienne Démocratique et Populaire  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

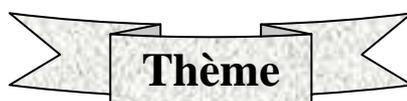
Université Mentouri Constantine  
Faculté des sciences de la nature et de vie  
Département de Biologie Végétale et Ecologie



N° d'ordre : 189/Mag/2010  
N° de série : 007/SN/2010

## MEMOIRE

En vue d'obtention du diplôme de magistère en biotechnologies végétales  
Ecole Doctorale



# Contribution à l'étude cytogénétique de quelques espèces du genre *Medicago* (L).

Présenté par

*Melle HALMI SIHEM*

Soutenu le 22 /06 /2010

### Devant le jury :

Président :	Mr D. KHELIFI	Professeur à l'université Mentouri Constantine
Rapporteur :	Mme N. KHALFALLAH	Professeur à l'université Mentouri Constantine
Co-rapporteur :	Mme M. ABDELGUERFI	Maître de recherche à L'INRAA
Examineurs :	Mr A. ABDELGUERFI	Professeur à L'I.N.A
	Mme D.SATTA	Professeur à l'université Mentouri Constantine

2009-2010

# Remerciements

*Au terme de ce travail, qu'il me soit permis d'exprimer mes plus vifs remerciements à :*

*Mme KHALFALLAH NADRA, professeur à l'Université Mentouri pour avoir accepté de diriger ce travail et avoir bien voulu y consacrer son temps, ses conseils et sa précieuse aide tout au long de la conduite de cette étude.*

*Mme ABDELGUERFI M, Maître de recherche à l'Institut National de Recherche Agronomique d'Algérie (INRAA) pour m'avoir proposé ce sujet de thèse et avoir co-dirigé mes recherches.*

*Mr KHELIFI D, professeur à l'Université Mentouri pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de mémoire. Qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.*

*Mr ABDELGUERFI A, professeur à l'Ecole Nationale Supérieure Agronomique (ENSA ex. I.N.A) sans lui je n'aurais pas abordé ce sujet et qu'il me fasse l'honneur de se déplacer et de faire partie du jury.*

*Mme SATTA D, professeur à l'Université Mentouri pour avoir accepté d'examiner ce travail, qu'elle trouve ici ma profonde reconnaissance.*

*Je tiens à remercier aussi : Mme BENAMARA M et Mr BAAZIZ K, pour leurs précieux conseils.*

*Je remercie également, Mme TOURKI M et Mr BELBEKRI N, ingénieurs de laboratoire pour leur aide et tous les moyens qu'ils ont mis à ma disposition pour mener à bien ce travail.*

*Je remercie, pour leur aide, toutes les personnes qui ont bien voulu m'apporter leur appui dans la réalisation de ce mémoire.*

***HALMI SIHEM***

# liste des tableaux

Page

<b>Tableau 1</b> : Classification de différentes espèces du genre <i>Medicago</i> Selon Lesins et Lesins (1979) .....	6
<b>Tableau 2</b> : Espèces spontanées en Algérie .....	8
<b>Tableau 3</b> : Caractères morphologiques des espèces de la section des <i>Intertextae</i> .....	10
<b>Tableau 4</b> : Données écologiques des populations étudiées .....	25
<b>Tableau 5</b> : Nomenclature chromosomique proposée par Levan et <i>al.</i> , (1964) .....	30
<b>Tableau 6</b> : Mise au point de la technique d'étude .....	34
<b>Tableau 7</b> : Données numériques concernant la garniture chromosomique de 3 populations... de <i>Medicago intertexta</i> .....	36
<b>Tableau 8</b> : Données numériques concernant la garniture chromosomique de 4 populations ... de <i>Medicago ciliaris</i> .....	38
<b>Tableau 9</b> : Données numériques concernant la garniture chromosomique de 3 populations... de <i>Medicago granadensis</i> .....	40
<b>Tableau 10</b> : Données numériques concernant la garniture chromosomique .....	41
de <i>Medicago muricoleptis</i> .....	
<b>Tableau 11</b> : Données caryologiques concernant les quatre espèces étudiées .....	42
<b>Tableau 12</b> : Détermination du nombre de nucléoles par cellules chez les quatre taxons étudiés .....	47

# liste des figures

Page

<b>Figure 1</b>	: Distribution géographique du genre <i>Medicago</i> dans le monde .....	4
<b>Figure 2</b>	: <i>Medicago intertexta</i> (L.) Mill .....	11
<b>Figure 3</b>	: <i>Medicago ciliaris</i> (L.) All .....	12
<b>Figure 4</b>	: <i>Medicago granadensis</i> Willd .....	13
<b>Figure 5</b>	: <i>Medicago muricoleptis</i> Tineo .....	14
<b>Figure 6</b>	: Cycle de développement de la luzerne .....	15
<b>Figure 7</b>	: Différents états de la chromatine.....	21
<b>Figure 8</b>	: Présentation schématique des différents types de chromosome.....	22
<b>Figure 9</b>	: Caryogrammes des trois populations de <i>M. intertexta</i> .....	35
<b>Figure 10</b>	: Caryogrammes des quatre populations de <i>M. ciliaris</i> .....	37
<b>Figure 11</b>	: Caryogrammes des trois populations de <i>M. granadensis</i> .....	39
<b>Figure 12</b>	: Caryogramme de <i>M. muricoleptis</i> .....	41
<b>Figure 13</b>	: Histogramme de la longueur totale (LT) des chromosomes chez les quatre espèces étudiées .....	43



# Sommaire

Page

**Introduction** ..... 1

## ***Chapitre I : Revue Bibliographique***

### **1 Présentation du genre *Medicago***

1.1 Caractères généraux ..... 3  
1.2 Distribution géographique du genre *Medicago* ..... 3  
1.3 Historique de la classification du genre *Medicago* ..... 5  
1.4 Position systématique ..... 7  
1.5 Les espèces spontanées rencontrées en Algérie ..... 8  
1.6 La section des *intertextae* ..... 10  
1.7 Le cycle de développement ..... 15

### **2 Les principaux travaux** ..... 16

### **3 Rappel de quelques notions de cytogénétique**

3.1 La chromatine ..... 20  
    3.1.1 L'euchromatine (chromatine diffuse) ..... 20  
    3.1.2 L'hétérochromatine (chromatine condensée) ..... 20  
        a) L'hétérochromatine facultative ..... 20  
        b) L'hétérochromatine constitutive ..... 20  
    3.1.3 Rôle de l'hétérochromatine ..... 21  
3.2 Le chromosome ..... 21





<b>5 Le fluochrome banding (chromomycineA3)</b> .....	46
<b>6 Nitrates d'argent (Ag-banding)</b> .....	47
<b><i>Conclusion et perspectives</i></b> .....	49
<b><i>Références bibliographiques</i></b> .....	51
<b><i>Annexe</i></b>	

# Introduction



## Introduction

La pauvreté des sols d'Afrique du Nord et la rareté des sources en matières azotées destinées aux animaux justifient l'introduction des légumineuses fourragères telles que la luzerne (*Medicago*), le trèfle, le pois et le soja dans l'assolement (Hireche, 2006).

La flore d'Algérie est particulièrement riche en espèces, la diversité de l'Algérie en climats et sols lui donne une place privilégiée pour la culture et l'exploitation des plantes. Un très grand nombre de ces espèces poussent à l'état naturel et endémique, certaines se révèlent d'une grande valeur agronomique, car elles sont utilisées comme fourrage pour le bétail ou sous forme de plantes alimentaires, d'autres ont une application médicinale (Amrani, 2006).

Dans le but de valoriser les ressources phytogénétiques en Algérie, la connaissance des espèces à intérêt fourrager et pastoral représente une préoccupation essentielle. C'est le cas des espèces appartenant au genre *Medicago*, plantes annuelles, bisannuelles ou vivaces qui sont capables de résister aux conditions de sécheresse.

Les espèces du genre *Medicago* possèdent un intérêt agronomique grâce à leur aptitude à la fixation symbiotique de l'azote, permettant une production abondante en protéines végétales (Etienne et *al.*, 2001), et grâce à leur capacité d'enrichissement des sols en azote organique (la symbiose) ; ils sont souvent utilisés dans les systèmes de rotation avec les céréales (Yahia et Fyad-Lameche, 2003). En Algérie, ces plantes assurent l'amélioration de la flore des jachères pâturées et entrent facilement dans la rotation avec les céréales (Chebouti et *al.*, 2000). Par ailleurs, des travaux ont été entrepris pour utiliser des extraits foliaires des luzernes (cas de *M. sativa*) comme aliment destiné à des populations souffrant de carence alimentaire forte, en particulier chez les enfants (Hireche, 2006).

La section des *Intertextae* du genre *Medicago* inclut quatre espèces annuelles diploïdes : *M. ciliaris* (L.), *M. intertexta* (L.), *M. granadensis* (L.) et *M. muricoleptis* (L.) avec un niveau de ploïdie  $2n = 2x = 16$  (Jules, 1992).

Notre travail entre dans le cadre d'un projet de recherche, développé en collaboration entre l'INRAA et l'ENSA (ex. INA), sur l'étude taxonomique de la section des *Intrtextae* par l'utilisation d'une approche pluridisciplinaire. Les aspects en relation avec la morphologie, la biométrie, l'écologie, la symbiose et la biologie moléculaire ont été étudiés (Laouar, 2005) et notre



travail porte sur l'étude cytogénétique des différents taxons de la section des *Intertextae* qui vise une meilleure connaissance des génomes.

Donc notre contribution consiste en une approche cytogénétique pouvant représenter un complément d'information aux questions d'ordre taxonomique relatif à ces taxons.

Les outils utilisés sont ceux de la cytogénétique classique et du fluochrome banding.

Ainsi, outre l'introduction et la conclusion, le mémoire est structuré en trois chapitres.

Dans le premier chapitre nous effectuons une synthèse bibliographique basée essentiellement sur la présentation du genre *Medicago*, les principaux travaux sur ce thème et le rappel de quelques notions en cytogénétique. Le deuxième chapitre comporte le matériel d'étude et les méthodes expérimentales appliquées. Les résultats et la discussion constituent le troisième chapitre.

# **Chapitre I**

## **Revue Bibliographique**



## **Chapitre: Revue Bibliographique**

### **1 Présentation du genre *Medicago***

#### **1.1 Caractères généraux**

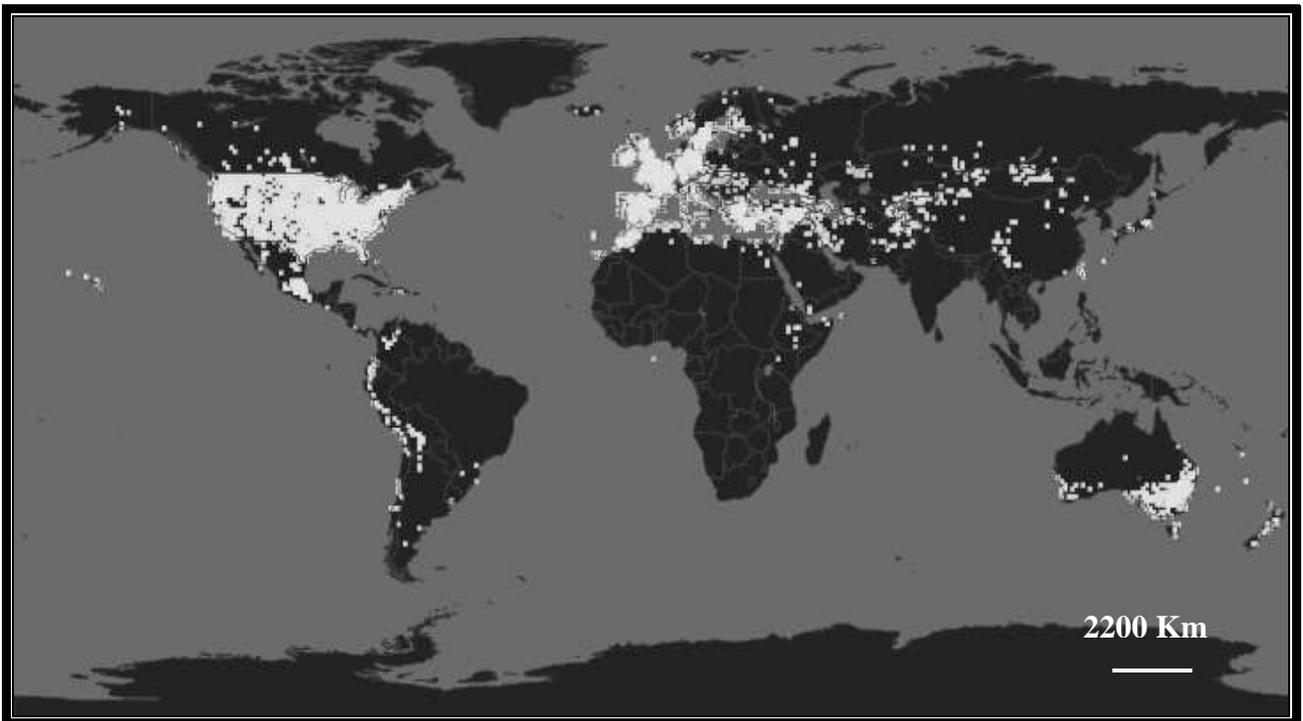
Les espèces du genre *Medicago* sont soit herbacées ou arbustives, à de fortes racines pivotantes pouvant atteindre plusieurs mètres de profondeur, ses tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentés au sommet et présente des inflorescences en grappe, les stipules sont larges de forme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

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

#### **1.2 Distribution géographique du genre *Medicago***

L'origine des espèces du genre *Medicago* ne fait pas l'unanimité selon les auteurs. En effet, pour Lapeyronie (1982), elles sont distribuées dans le bassin méditerranéen (le sud de l'Europe, l'Afrique du Nord, le proche Orient), certaines ont été introduites en Amérique du Nord, en Australie et en Europe du Nord. D'après Derek et Ernest (1997), elles sont originaires d'Europe, d'Asie et d'Afrique et se sont répandues dans d'autres continents sous forme de mauvaises herbes. Les travaux de Mathieu (2003) et Hireche (2006) affirment qu'au cours de XIX siècle, Les luzernes (les espèces du genre *Medicago*) ont conquit l'ensemble de la zone méditerranéenne, ensuite elles ont envahi d'autres parties du monde, en particulier les continents américain et australien à l'occasion des différents courants de la colonisation humaine (Fig. 1).

Les luzernes s'accommodent des sécheresses périodiques, elles sont adaptées à tous les types de sols qui ne sont pas trop humides (Lapeyronie, 1982).



**Figure 1: Distribution géographique du genre *Medicago* dans le monde**  
(Source: Prolea, 2002)

□ Genre *Medicago*



### **1.3 Historique de la classification du genre *Medicago***

Le genre *Medicago* est proche du genre *Melilotus* et *Trigonella*. Il comprend un grand nombre d'espèces diploïdes, tétraploïdes, exceptionnellement hexaploïdes (*M. arborea*, *M. saxatilis*). Le nombre chromosomique de base est  $x = 8$ , exceptionnellement  $x = 7$  (*M. polymorpha*, *M. praecox*, *M. rigidula* et certaines formes de *M. murex*).

Plusieurs classifications du genre *Medicago* furent proposées par plusieurs botanistes et taxonomistes (Urban, 1872 in Schoutteten, 2004 ; Heyn, 1963; Lesins et Lesins, 1979; Ernest *et al.*, 1998).

Lesins et Lesins (1979) recensent 55 espèces herbacées, 34 annuelles et 21 pérennes, parmi lesquelles une dizaine sont cultivées et dont la plupart sont présentes dans les pâturages ou parcours, notamment méditerranéens. Ils divisent le genre en 4 sous genres (*Lupularia*, *Orbicularia*, *Falcago*, *Spirocarpus*) et 14 sections (Tab.1) (Schoutteten, 2004).

Selon Ernest *et al.* (1998) le genre *Medicago* comporte 86 espèces (annuelles, bisannuelles et vivaces) représentant l'ensemble des 12 sections et 8 sous sections.

En Algérie, parmi les espèces les plus connues du genre, *Medicago ciliaris* et *Medicago intertextes*. Constituent les principales ressources en légumineuses fourragères (André et Hubert, 1992 ; Laouar et Abdelguerfi, 2003 ; Hireche, 2006). Leur classification n'est pas claire. En effet, selon la littérature ancienne et récente, quatre différentes classifications attribuées aux deux taxa existent et sont rapportées par Laouar et Abdelguerfi (2003):

1- *M. intertextata* et *M. ciliaris* considérées chacune comme espèce (Battandier et Trabut, 1890; Julien, 1894; Quézel et Santa, 1962; Lesin et Lesins, 1979; Small et Jomphe, 1988).

2- *M. ciliaris* est considérée comme une sous-espèce de *M. intertextata* (Bonnier 1927).

3- les deux taxons sont des variétés de *M. intertextata*, c'est-à-dire *M. intertextata* var. *intertextata* et *M. intertextata* var. *ciliaris* (Heyn 1963).

4- *M. intertextata* est considérée comme une sous-espèce de *M. ciliaris* (Jauzien, 1995).

**Tableau 1:** Classification de différentes espèces du genre *Medicago* selon Lesins et Lesins (1979)

Sub- genus	Section	Sub-section	Espèce	Nombre chromosomique (2n)	Type d'espèce
<i>Lupularia</i>	-	-	<i>M. lupulinae</i>	16,32	A,B
			<i>M. secundiflora</i>	16	A,B
<i>Orbicularia</i>	<i>Carstiensae</i>	-	<i>M. carstiensis</i>	16	P
	<i>Platycarpae</i>	-	<i>M. platycarpa</i>	16	P
			<i>M. ruthenica</i>	16	P
	<i>Orbiculres</i>	-	<i>M. orbicularis</i>	16	A
	<i>Hymenocarpos</i>	-	<i>M. radiata</i>	16	A
	<i>Heyniana</i>	-	<i>M. heyniana</i>	16	A
<i>Cretaceae</i>	-	<i>M. cretacea</i>	16	P	
<i>Falcago</i>	<i>Falcago</i>	<i>Falcatae</i>	<i>M. falcata</i>	16,32	P
			<i>M. sativa</i>	16,32	P
			<i>M. glomerata</i>	16	P
			<i>M. glutinosa</i>	32	P
			<i>M. prostrata</i>	16,32	P
		<i>Rupestres</i>	<i>M. rhodopea</i>	16	P
			<i>M. saxatilis</i>	48	P
			<i>M. rupestris</i>	16	P
			<i>M. cancellata</i>	48	P
			<i>M. daghestanica</i>	16	P
	<i>Daghestanicae</i>	<i>M. pironae</i>	16	P	
		<i>M. dxhawakhetica</i>	32	P	
	<i>Papillosae</i>	-	<i>M. papillosa</i>	16,32	P
	<i>Arobeae</i>	-	<i>M. arobea</i>	32,48	P
<i>Marinae</i>	-	<i>M. marina</i>	16	P	
<i>Suffruticosae</i>	-	<i>M. hybrida</i>	16	P	
		<i>M. suffruticosa</i>	16	P	
<i>Spirocarpus</i>	<i>Rotatae</i>	-	<i>M. rotata</i>	16	A
			<i>M. bonarotina</i>	16	A
			<i>M. noeana</i>	16	A
			<i>M. shephardii</i>	16	A
			<i>M. rugosa</i>	30	A
			<i>M. scutellata</i>	30	A
	<i>Pachyspirae</i>	-	<i>M. soleirolii</i>	16	A
			<i>M. tornata</i>	16	A
			<i>M. littoralis</i>	16	A
			<i>M. truncatula</i>	16	A
			<i>M. rigidula</i>	14	A,B
			<i>M. murex</i>	14,16	A
			<i>M. constricta</i>	14	A
			<i>M. turbinata</i>	16	A
<i>Leptospirae</i>	-	<i>M. doliata</i>	16	A	
		<i>M. sauvagei</i>	16	A	
		<i>M. laciniata</i>	16	A	
		<i>M. minima</i>	16	A	
		<i>M. praecox</i>	14	A	
		<i>M. coronata</i>	16	A	
		<i>M. polymorpha</i>	14	A,B	
		<i>M. arabica</i>	16	A	
		<i>M. lanigera</i>	16	A	
		<i>M. disciformis</i>	16	A	
<i>Intertextae</i>	-	<i>M. tenoreana</i>	16	A	
		<i>M. intertexta</i>	16	A	
		<i>M. ciliaris</i>	16	A	
		<i>M. muricoleptis</i>	16	A	
			<i>M. granadensis</i>	16	A

A : Annuelle ; P : Pérenne ; B : Bisannuelle

(Jules, 1992)



#### 1.4 Position systématique

<u>Règne</u> :	<i>Plantae</i>
<u>Embranchement</u> :	Spermatophytes
<u>Sous- embranchement</u> :	Angiospermes
<u>Classe</u> :	Dicotylédones
<u>Sous- classe</u> :	Rosidées
<u>Ordre</u> :	Fabales
<u>Famille</u> :	Fabaceae
<u>Sous-famille</u> :	<i>Faboideae</i>
<u>Tribus</u> :	<i>Trifolieae</i>
<u>Genre</u> :	<i>Medicago</i> (L.)

(Small et Jomphe, 1989)



### 1.5 Les espèces spontanées rencontrées en Algérie

Le genre *Medicago* en Algérie est représenté par de nombreuses espèces spontanées dont les plus importantes sont décrites par Quézel et Santa en 1962 (Tab2).

**Tableau 2:** Espèces spontanées en Algérie

Nom d'espèce	Type de la plante	Gousse	Fleur	Habitat
<i>M. intertexta</i>	Annuelle	Glabre de 12 à 15 mm	Jaune	Pâturages, Tell Algéro-Constantinois
<i>M. ciliaris</i>	Annuelle	Velue hirsute, plus ou moins glanduleuses de 10-15 mm	Jaune	Pâturages, prairies, Tell à sol semi salin
<i>M. falcata</i>	Vivace	Courbée en faucille ou en anneaux, pubescente	Jaune	Pâturages argileux
<i>M. lupulina</i>	Annuelle ou bisannuelle	Réniforme, fortement arquée de 2-3 mm de diamètre	Jaune	Pâturages
<i>M. secundiflora</i>	Annuelle ou bisannuelle	Brun clair de 2-2.5 mm	Jaune	Pâturages
<i>M. marina</i>	Vivace	Contournée en hélice	Jaune	Sables maritimes
<i>M. sativa</i>	Vivace	glabre ou pubescente, à 2-3 tours de spire	Violettes ou jaunes lavées de brun	Cosmopolite
<i>M. scutellata</i>	Annuelle	Hémisphérique à spires emboîtées de 13-15 mm	Jaune	Sols argileux du Tell
<i>M. orbicularis</i>	Annuelle	Ovoïde à 5-6 tours de spires	Jaune	Pâturages du Tell
<i>M. rugosa</i>	Annuelle	Ne dépassant pas de 9 mm	Jaune	Pâturages de Constantine et Alger
<i>M. soleirolii</i>	Annuelle	Glabres	jaune	Pâturages du Tell Constantinois
<i>M. rigidula</i>	Annuelle	Glanduleuse- fortement pubescente de 10 mm	Jaune	Broussailles, Montagnes
<i>M.tuberculata</i>	Annuelle	Tronquée à sa base, Glabre de 10 mm	Jaune	Pâturages arides



<i>M. truncatula</i>	Annuelle	Tronquée à ses deux extrémités De 7-8 mm	Jaune	Tell - Pâturages
<i>M. littoralis</i>	Annuelle	Ovoïde ou globuleuse de 10 mm	Jaune	Pâturages
<i>M. murex</i>	Annuelle	Glabres ou faiblement hispidés	Jaune	Tell Algéro- Constantinois
<i>M. minima</i>	Annuelles	Contournée en hélice, pubescente de 3-4 mm	Jaune	Sols pauvres
<i>M. arabica</i>	Annuelle	Glabre de 5-7 mm	Jaune	Tell Algéro- Constantinois
<i>M. laciniata</i>	Annuelle	Ovoïde ou sphéroïdale de 5-6 mm	Jaune	Paturages arides- Montagnes
<i>M. hispida</i>	Annuelle	Fortement réticulée- striée de 5-9 mm	Jaune	Tell - Pâturages



### 1.6 La section des *Intertextae*

Les quatre espèces de la section des *Intertextae* : *M. ciliaris*, *M. intertextae*, *M. muricoleptis* et *M. granadensis* sont diploïdes ( $2n = 2x = 16$ ) (Schlarbaum *et al.*, 1983) et leurs principaux caractères morphologiques sont indiqués dans le tableau 3 et les figures 2, 3, 4 et 5.

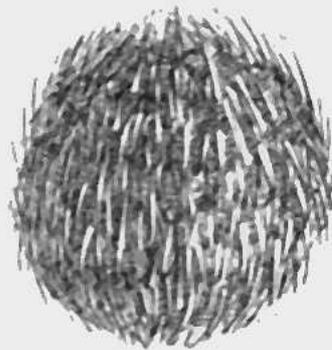
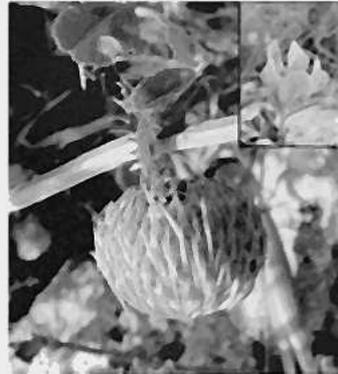
**Tableau 3:** Caractères morphologiques des espèces de la section *intertextae*

Caractères morphologiques	<i>M. ciliaris</i>	<i>M. intertextae</i>	<i>M. muricoleptis</i>	<i>M. granadensis</i>
Longueur du fruit (mm)	14.3	16.3	7.4	5.7
Largeur du fruit (mm)	11.8	12.5	10.6	8.8
Nombre du fruit	6.7	7.4	5.0	5.0
Longueur des épines (mm)	2.5	4.7	2.0	2.0
Nombre des épines	18	19	25	21
Longueur des feuilles (mm)	15.8	15.9	10.4	14.1
Présence des Anthocyanines dans les feuilles (1 : non, 2 : oui, 3 : parfois)	2	3	1	2
Longueur de la fleur (mm)	7.0	7.0	6.0	4.5
Taille de la plante (mm)	400	400	230	250

(Schlarbaum *et al.*, 1983)

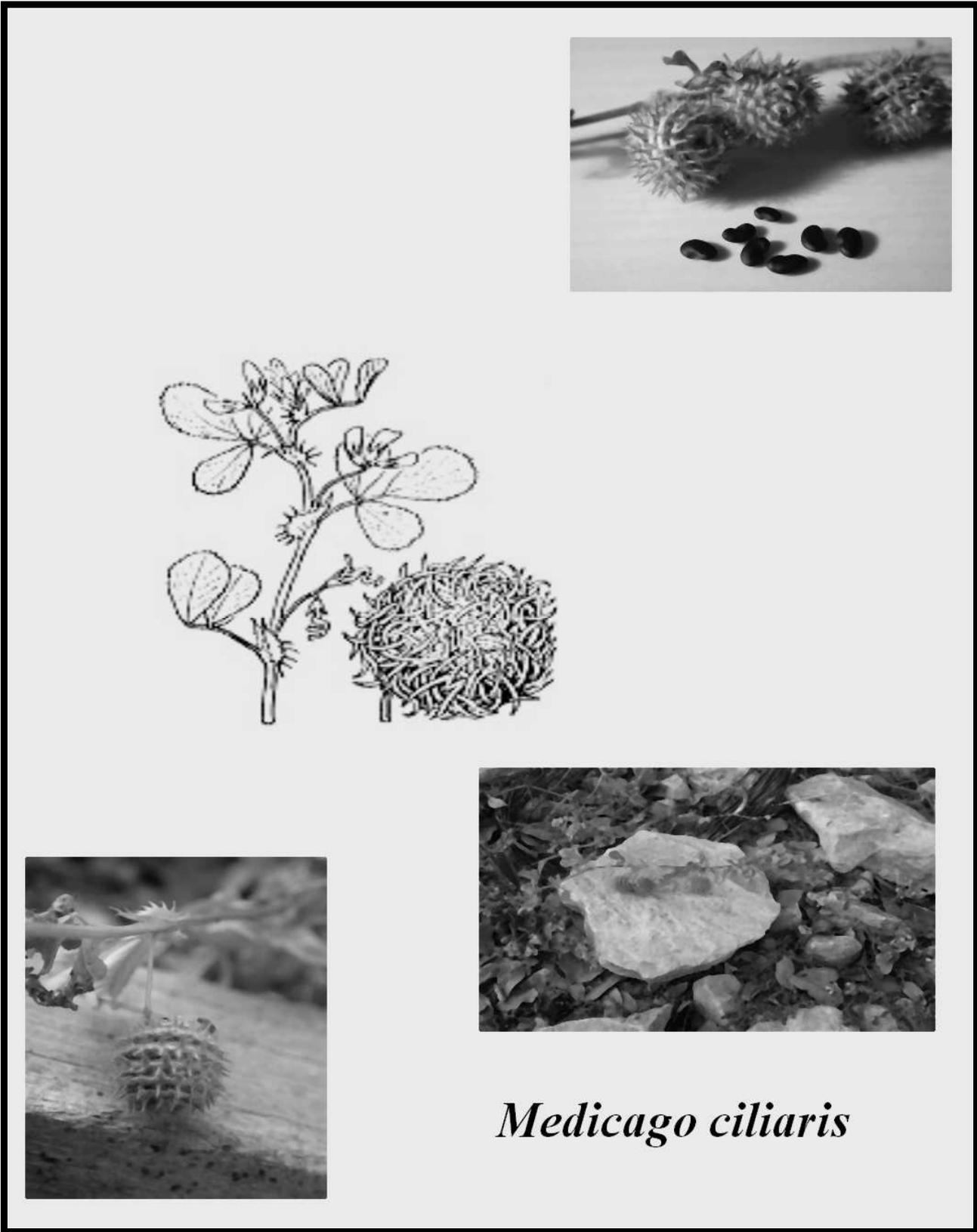


*Medicago intertexta*



**Figure 2: *Medicago intertexta* (L.) Mill.**

(Source: Small, 1989 et Bena, 2001)



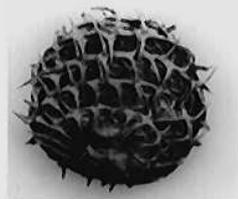
*Medicago ciliaris*

**Figure 3: *Medicago ciliaris* (L.) All**

(Source: Small, 1989 et Bena, 2001)



*Medicago granadensis*



**Figure 4: *Medicago granadensis* Willd**

(Source: Small, 1989 et Bena, 2001)



*Medicago muricoleptis*

**Figure 5: *Medicago muricoleptis* Tineo**

(Source: Small, 1989 et Bena, 2001)



## 1.7 Le cycle de développement

D'après Mathieu (2003), le cycle de développement des espèces du genre *Medicago* passe par différents stades végétatifs (Fig.6) :

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

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

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

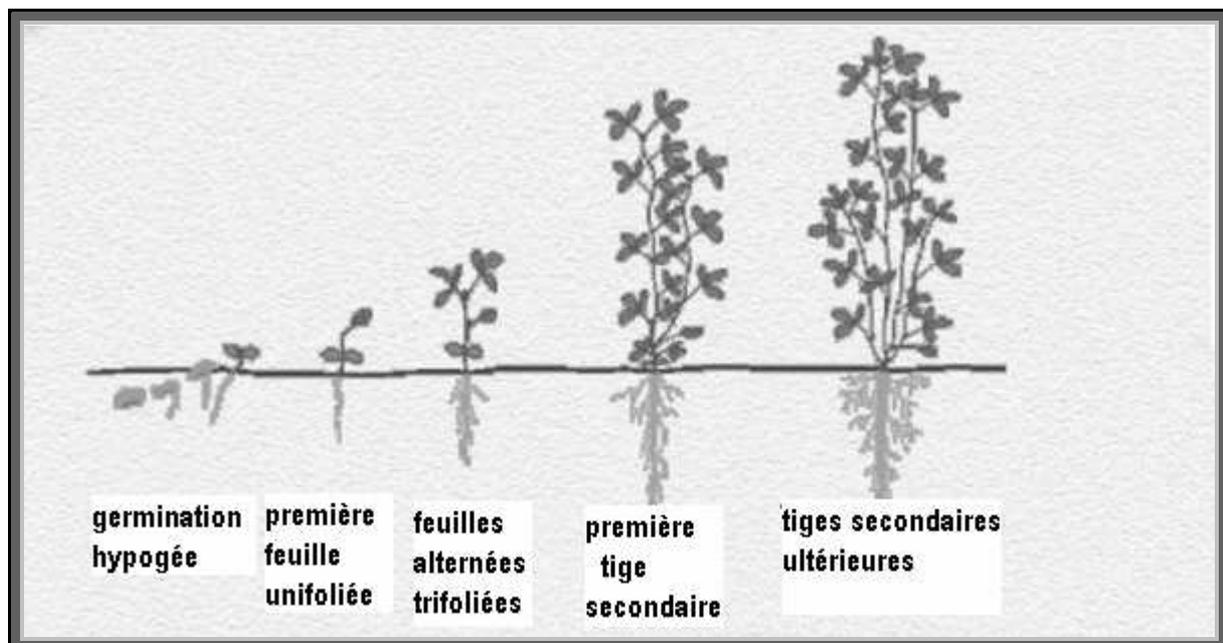
Au cours de son développement la première tige croît en produisant des feuilles alternées. Les feuilles sont en général de type trifoliées mais il existe des feuilles multifoliées à 4, 5, 6 voire de 7 folioles portées sur un pétiole.

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

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

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

**Stade 6** : floraison, maturité.



**Figure 6 : Cycle de développement de la luzerne pérenne**

(Source : Prolea, 2002)



## **2 Les principaux travaux**

Beaucoup de travaux de recherches ont été réalisés sur les différentes espèces du genre *Medicago*. Nous présentons quelques uns d'entres eux.

➤ Les recherches de Chakass (1984) constituent une contribution biosystématique à l'étude d'espèces annuelles de quatre sections du genre *Medicago* (L.) sous genre *Spirocarpos* et d'une espèce vivace du sous-genre *Medicago*, section *Marinae*. Il a notamment tenté de dégager des nouveaux critères de classification basés sur la corrélation entre divers caractères foliaires et polliniques.

➤ Dans le travail de Classen et *al.* (1992), les auteurs se sont intéressés à l'étude des substances phénoliques de 47 espèces de *Medicago*. Les extraits des tissus foliaires séchés ont été examinés par chromatographie bidimensionnelle sur plaques de polyamide ensuite ces données phénoliques sont soumises à une analyse taxonomico – numérique.

➤ Biroljk (1993) a donné un aperçu sur les connaissances acquises sur la variabilité génétique des espèces pérennes et annuelles du genre *Medicago* au Maroc. L'étude concerne 15 espèces annuelles et spontanées. Leur classification basée sur les données enzymatiques s'accorde partiellement avec la classification botanique. Néanmoins, l'utilisation des isozymes a permis de lever la difficulté d'identification entre des espèces morphologiquement très proches.

➤ Une étude comparative de la production des gousses de plusieurs populations de *M. orbicularis* (L.) Bart et la relation avec les milieux d'origine a été faite par Chebouti et *al.* (1995). Les résultats montrent que le poids total des gousses est fortement lié au nombre de gousses et au poids moyen d'une gousse.

➤ Une technique de coloration des bandes C au Giemsa a été appliquée par Bauchan et Hossain (1997) afin d'examiner la quantité et l'emplacement de l'hétérochromatine constitutive chez la plante diploïde ( $2n = 2x = 16$ ) *Medicago sativa ssp. falcata* (L.) Arcangeli. La plupart des accessions montraient des bandes centromériques sur tous les chromosomes et une bande hétérochromatique au niveau des organisateurs nucléolaires (NOR) et des satellites (SAT).



Cependant, les auteurs observent aussi chez certains chromosomes la présence des bandes C intercalaires et télomériques.

➤ L'étude de Chebouti et Abdelguerfi (1997) concerne le comportement de 48 populations de *Medicago orbicularis* mises en essai dans deux zones agro-écologiques différentes : El-Harrach (sub-humide) et Beni-slimane (semi-aride). Afin de caractériser ce matériel végétal, ils ont pris en compte le développement végétatif hivernal et printanier (largeur et hauteur maximales) et la floraison (début et fin floraison). Les résultats montrent que les populations se sont mieux développées à El-Harrach qu'à Beni-Slimane et aussi les populations les plus précoces ont présenté une largeur hivernale forte au niveau des deux sites.

➤ Une étude portant sur 54 populations de *M. truncatula* mises en essai dans une région sub-humide et une région semi-aride a été faite par Siziani et Abdelguerfi (2001) elle a permis d'étudier les liens entre la floraison et le développement végétatif d'une part, entre la floraison et l'altitude et la pluviométrie du milieu d'origine des populations d'autre part. Les résultats montrent que les liens entre la précocité de floraison et l'altitude et la pluviométrie du milieu d'origine des populations diffèrent d'une zone d'essai à une autre. En zone sub-humide les liens ont été bien établis. En zone semi-aride seule la pluviométrie semble déterminer la précocité, il est donc intéressant d'associer en plus de l'altitude, d'autres facteurs comme la température, la répartition annuelle de la pluviométrie, la latitude, la longitude pour mieux distinguer les populations selon leur provenance.

➤ L'étude de l'effet du déficit hydrique sur le développement et le rendement fourrager chez quatre populations de *Medicago truncatula* (L.) Gaertn a été réalisé par Chebouti et Abdelguerfi (2002). Les résultats obtenus montrent que le déficit hydrique a causé des réductions importantes des différents paramètres étudiés chez toutes les populations de *M. truncatula*.

➤ En 2007 Rabhi et al. (2007) ont étudié les effets de l'interaction salinité-déficience ferrique sur l'acquisition du fer et l'acidification racinaire induite par le manque de fer chez *Medicago ciliaris* (L.). Les résultats ont montré que la croissance et la teneur en chlorophylle des plantes sont beaucoup plus affectées par les effets conjugués de la salinité et de la déficience en fer que par leurs effets individuels.



➤ Khelifi et *al.* (2008), ont étudié le comportement de seize cultivars de luzerne pérenne *Medicago sativa* L. conduits sous deux régimes hydriques dans deux régions sub-humide et semi-aride en Algérie. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence des différences de comportement des 16 cultivars testés. Les meilleurs rendements sont enregistrés sous irrigation et sous climat sub-humide.

### **Principaux résultats de recherche sur la section des *Intertextae*.**

La flore algérienne est extrêmement riche en légumineuses spontanées et particulièrement en *Medicago*. Ces espèces, se développant vigoureusement dans les zones arides et semi-arides. Elles constituent un patrimoine génétique riche et diversifié.

➤ L'étude de la relation entre les caractères biologiques et les facteurs du milieu du complexe d'espèces *M. ciliaris* - *M. intertexta* a été effectuée par Laouar et Abdelguerfi (1999b). Elle a pour objectif de comparer, d'une part, l'influence du milieu d'origine sur le comportement et, d'autre part, la relation entre l'ensemble des caractères biologiques (phénologiques et morphologiques) des deux taxa. Des relations similaires et d'autres différentes ont été remarquées pour les deux taxa.

➤ Abdelguerfi et Laouar (2000a) ont effectué une recherche sur la caractérisation des différents types d'infrutescences chez le complexe d'espèce *M. ciliaris* - *M. intertexta*. Les résultats montrent que plus le nombre de gousse/infrutescence est augmenté plus le poids des gousses, le nombre de graines/gousses et le poids des graines diminuent chez *M. ciliaris*. Par contre chez *M. intertexta*, les plants produisant surtout les infrutescences à trois gousses.

➤ Abdelguerfi et Laouar (2000b), ont étudié l'effet des conditions bioclimatiques d'origine sur le comportement et la floraison des 63 populations de *Medicago ciliaris* (L.) Krock. Les résultats montrent que le gradient de précocité de la floraison des populations de *M. ciliaris* est en relation avec les étages bioclimatiques (Semi-aride, Sub-humide et Humide).

➤ Laouar et *al.* (2001) ont effectué un travail sur l'effet du stress hydrique sur le comportement physiologique de dix populations de *Medicago intertexta*. Les résultats ont montré



une grande variabilité entre les différentes populations. Pour l'ensemble des populations le stress hydrique a causé une réduction significative de la quantité de matière sèche.

➤ Les taxons *M. ciliaris* et *M. intertexta* ont fait l'objet d'études réalisées par Abdelguerfi-Laouar et *al.* (2003) sur leur écologie et leur répartition en Algérie. Les résultats montrent que *M. ciliaris* se développe généralement sur des sols lourds et très riches en sodium, il a une dispersion plus large et présente des exigences climatiques moins strictes que celles de *M. intertexta*. Par ailleurs, la répartition géographique de *M. intertexta* est limitée au nord-est de l'Algérie, sous bioclimat sub-humide et humide, sur sols pauvres en calcium et à moins de 250 m d'altitude en moyenne.



### **3 Rappel de quelques notions de cytogénétique**

#### **3.1 La chromatine**

En dehors des divisions cellulaires l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) est sous la forme de chromatine interphasique (Fig. 7). A l'aide de colorants, on peut révéler sur les chromosomes, des zones de coloration plus ou moins intenses reflétant le degré de condensation de la chromatine. On distingue : l'euchromatine (chromatine diffuse) et l'hétérochromatine (Chromatine condensée) (Harry, 2001)

##### **3.1.1 L'euchromatine (chromatine diffuse)**

Elle est constituée de chromatine décondensée durant l'interphase ce qui permet la transcription des séquences codantes qu'elle contient.

##### **3.1.2 L'hétérochromatine (chromatine condensée)**

Elle correspond à une zone fortement colorée qui reste condensée dans le noyau cellulaire durant l'interphase.

On distingue deux types d'hétérochromatine : hétérochromatine constitutive et hétérochromatine facultative (Anthony et *al.*, 2002; Harry, 2001; Dorkeld, 1994).

###### **a) L'hétérochromatine facultative**

Elle correspond a un état de condensation non permanent entraînant l'inactivation des séquences codantes impliquées. (Différences dans le comportement de deux chromosomes homologues)

###### **b) L'hétérochromatine constitutive**

Elle représente, à l'inverse, un état de condensation permanent de certaines zones, affectant les deux chromosomes homologues. Elle est composée des séquences d'ADN moyennement ou hautement répétées riches en paires de bases GC et AT et se trouve dans des régions spécifiques notamment au niveau des centromères et des télomères (Harry, 2001).

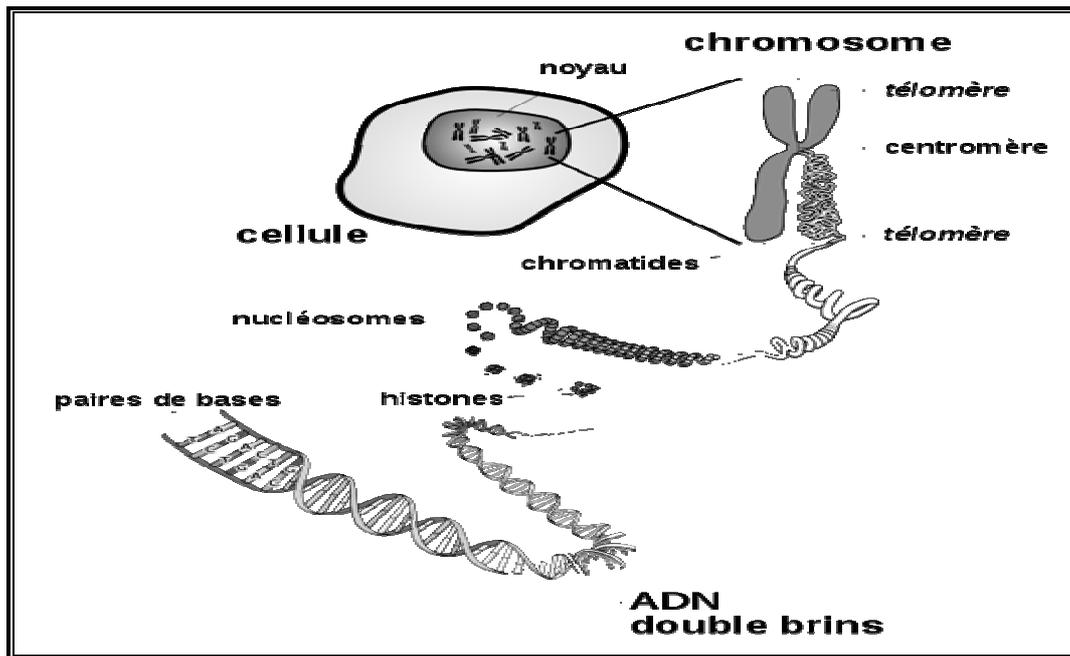


Figure 7 : Différents états de la chromartine

(Source : Michel, 2008)

### 3.1.3 Rôle de l'hétérochromatine

L'hétérochromatine joue un rôle important dans la régulation de la méiose (attraction des homologues, régulation des crossing over, formation des chiasmats) surtout dans les conditions écologiques difficiles.

Siljak-Yakovlev (1986) a mis le point sur le rôle très significatif que peut jouer l'hétérochromatine constitutive dans l'adaptation et l'évolution des espèces végétales, ainsi que dans la protection des zones vitales du génomes (organisateurs nucléolaires et centromères).

L'hétérochromatine est révélée à l'aide d'une technique de coloration différentielle, le C-banding

### 3.2 Les chromosomes

Ceux sont des structures en forme de bâtonnets faites de 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 (Fig. 8) :

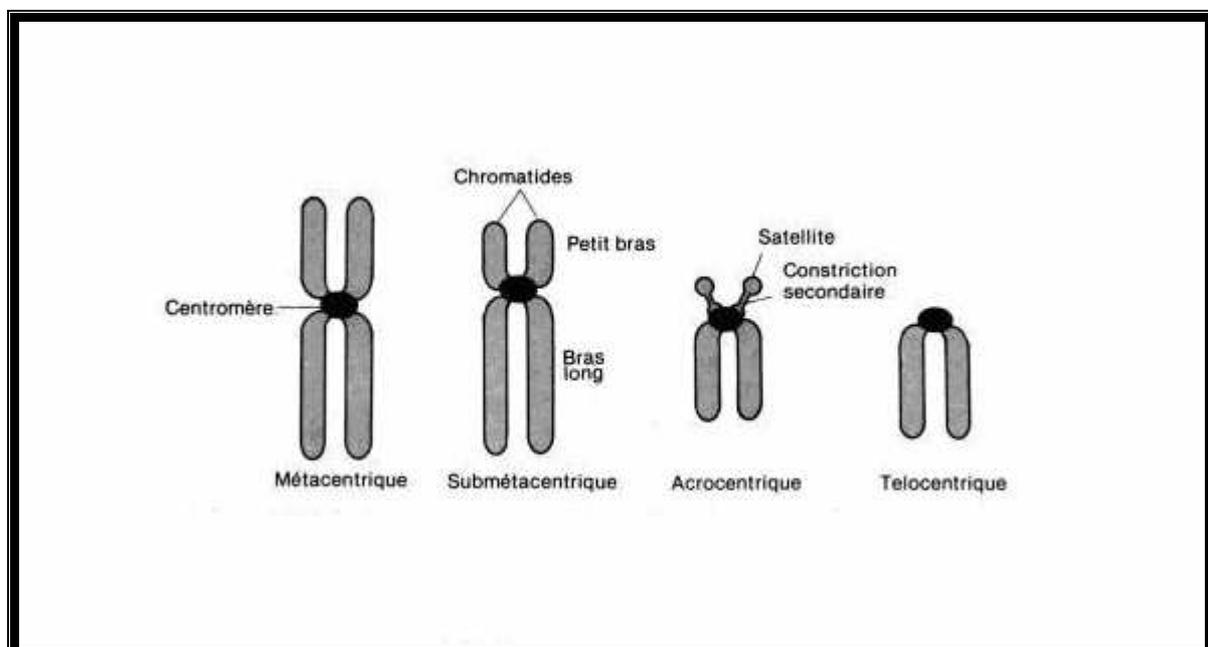
\* **Chromosomes métacentriques** : le centromère est en position centrale (position médiane) ce qui lui donne des bras de longueurs à peu près égales.

\* **Chromosomes sub-métacentriques** : le centromère est presque en position centrale ; les chromatides de ce chromosome présentent des bras de longueur inégale (un petit bras « p » et un long bras « q »).

\* **Chromosomes acrocentriques** : le centromère est plus proche de l'une des deux extrémités (les télomères) le bras court est très bref.

\* **Chromosome télocentrique** : présente un centromère très proche de ses télomères.

En cas de perte du centromère (anomalie), le chromosome est dit **acentrique**. D'autres anomalies peuvent provoquer l'apparition d'un chromosome possédant deux centromères nommé **chromosome dicentrique**. Celui-ci est instable et peut se casser (lors de la méiose) (Lemondet et Clement, 1983).



**Figure 8** : Présentation schématique des différents types de chromosome

(Source : Andre *et al.*, 1983)



### **3.3 Chromosomes surnuméraires**

Les chromosomes surnuméraires ont été signalés pour la première fois par Langley (1927 in Gorenflot et Raicu, 1980) chez *Zea mays*.

D'après Jones (1975 in Gorenflot et Raicu, 1980), 591 espèces végétales appartenant à 219 genres présentent des chromosomes B.

Les chromosomes surnuméraires ou chromosomes B sont des chromosomes facultatifs, plus petits que les chromosomes A, ont une réplication tardive dans le cycle cellulaire. Leur origine et leur rôle sont mal connus. Dans les espèces animales ou végétales où on les rencontre, ils semblent être avantageux lorsqu'ils sont en faible nombre et désavantageux lorsqu'ils deviennent trop nombreux (Gorenflot et Raicu, 1980).

La position du centromère chez ces chromosomes est souvent terminale, ils sont de type hétérochromatique en ne présentent pas une homologie avec les chromosomes A.

Gorenflot et Raicu (1980) signalent que les cellules qui présentent plusieurs chromosomes B sont évidemment plus riches en ADN, particulièrement en ADN répétitifs.

### **3.4 Le noyau interphasique**

C'est le centre vital de la cellule, il est délimité par une double membrane. Le noyau occupe environ 10% de volume total de la cellule.

Les chromosomes occupent des territoires distincts dans le noyau pendant l'interphase sans dispersion de la chromatine dans tout le volume du noyau. Ces observations démontrent que le matériel génétique n'est pas distribué au hasard dans un noyau interphasique, il existe des sites d'assemblage des machineries de réplication, transcription et maturation nécessaires au fonctionnement des gènes. (Hernandez et *al.*, 2004)

Dans le noyau, on observe des zones fortement colorables « **nucléoles** ».

### **3.5 Le nucléole**

C'est une structure nucléaire, plus ou moins sphérique, il n'est pas délimité par une membrane. Il est connu depuis les années 1960 comme étant le centre de synthèse des Acides RiboNucléiques ribosomiaux (ARNr), le nucléole contient les gènes codant pour les ARNr. (Hernandez et *al.*, 2004)



Le nombre de nucléoles est généralement inférieur à 10, très souvent un seul nucléole par noyau.

La taille du nucléole reflète son activité, dans les cellules végétales dormantes on observe un nucléole très petit, alors que chez les cellules actives il occupe 28 % du volume du noyau.

Les nucléoles sont mis en évidence par de nouvelles techniques en utilisant les Nitrates d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ).

### **3.6 Les organisateurs nucléolaires**

Ce sont des régions chromosomiques associées au nucléole. Chaque organisateur nucléolaire correspond à un groupe de gènes d'ARNr répétés en tandem sur un chromosome.

En cytogénétique classique, les Régions Organisatrices Nucléolaires sont mises en évidence par la coloration au Giemsa (N-banding) ou avec la coloration aux Nitrates d'argent (Ag-NORs) (Jiménez *et al.*, 1988).

La précipitation d'argent sur le site Nucleolar Organizer Regions (NORs) est liée à l'activité transcriptionnelles (Hubel, 1985).

# **Chapitre II**

## **Matériel et Méthodes**



## Chapitre II : Matériel et Méthodes

### 1 Matériel

Le matériel d'étude est constitué de graines de quatre espèces diploïdes à  $2n = 2x = 16$  chromosomes, *Medicago intertexta*, *M. ciliaris*, *M. granadensis* et *M. muricoleptis* appartenant à la section des *Intertextae*.

Onze populations représentant les quatre espèces étudiées proviennent de milieux différents (Tab. 4).

**Tableau 4** : Données écologiques des populations étudiées

Nom d'espèce	Numéro de population	Code	Lieu de récolte	Altitude	pluviométrie
<i>M. intertexta</i>	1	M.int 756	Bejaïa	20 m	850 mm
	3	M.int 35	Jijel	10 m	1149 mm
	7	M.int 253	Tipaza	30 m	625 mm
<i>M. ciliaris</i>	4	M.cil 58	Souk Ahras	860 m	649 mm
	6	M.cil 242	Khenchla	980 m	450 mm
	12	M.cil 11	Blida	80 m	799 mm
	15	M.cil 204	Relizane	250 m	448 mm
<i>M. granadensis</i>	2	GAUS100	Syrie	25 m	-
	8	GAUS 96	Palestine	100 m	-
	11	GAUS 98	Palestine	200 m	550 mm
<i>M. muricoleptis</i>	10	MAUS 95	Italie	290 m	800 mm



## 2 Méthodes

### 2.1 Conditions de la germination

Elle est effectuée en deux étapes:

- **scarification**

Elle est importante pour lever la dormance tégumentaire des graines du genre *Medicago*.

- **stérilisation**

Elle se fait dans un mélange d'eau de javel (12°) et d'eau distillée (1:1) pendant 1 minute suivie d'un rinçage à l'eau distillée.

Les graines sont mises à germer dans les boîtes de Pétri tapissées de papier filtre humide à température ambiante.

Lorsque les apex racinaires atteignent environ 1 à 1,5 cm de longueur (c'est à ce stade que la zone de division cellulaire est plus active), les prélèvements sont effectués. Ce qui correspond au 2<sup>ème</sup> jour pour *M. granadensis* et au 4<sup>ème</sup> ou 5<sup>ème</sup> jour pour *M. intertexta*, *M. ciliaris* et *M. muricoleptis*.

Les prélèvements s'effectuent préférentiellement le matin à 9h, où la période est favorable à l'observation d'un grand nombre de divisions cellulaires pour *M. intertexta*, *M. ciliaris* et *M. granadensis* et à 14h pour le taxon *M. muricoleptis*.

### 2.2 Techniques d'observation des méristèmes racinaires

Différentes méthodes sont décrites pour l'étude des chromosomes, elles mettent en jeu l'application d'agents chimiques pour le prétraitement, la fixation et la coloration des cellules en divisions. Ces méthodes sont largement décrites dans le cahier des « Techniques de cytogénétique végétale » (Jahier 1992).

L'emploi d'une technique adéquate doit permettre une bonne séparation des chromosomes avec des détails morphologiques permettant l'établissement correct du caryotype.

- **Prétraitement**

Cette première étape a pour but :

- ✓ de bloquer les divisions mitotiques en métaphase.
- ✓ de contracter les chromosomes.
- ✓ d'obtenir un grand nombre de plaques métaphasiques.



Trois agents mitoclasiques ont été utilisés :

- **la 8 Hydroxy quinoléine**, solution de 0.02 Mol / Litre à 16 °C. Les apex racinaires sont immergés dans cette solution pendant 2h 40 mn.
- **l'eau glaciale (0 °C)** pendant 18 heures.
- **La colchicine à 0.05 %** pendant 2h à température ambiante.

### • Fixation

Le but de cette étape est :

- ✓ De détruire toute vie cellulaire.
- ✓ De bloquer les divisions cellulaires en conservant l'intégrité structurale des chromosomes.
- ✓ De protéger les chromosomes de l'action de l'agent mitoclasique de prétraitement.

La fixation est réalisée dans une solution composée d'éthanol et d'acide acétique en proportion 3:1, pendant :

- 48 h à 4 °C pour *M. intertexta*, *M. ciliaris* et *M. granadensis*.
- 30 mn à la température ambiante pour *M. muricoleptis*.

### • Stockage

Le matériel végétal peut être conservé pendant plusieurs mois dans une solution d'éthanol 70 % à 4 °C.

### • Hydrolyse

Pour obtenir un meilleur étalement des cellules, l'hydrolyse est une étape nécessaire elle se fait dans une solution d'acide HCl (1N) à 60 °C pendant 5 mn.

### • Macération enzymatique

Pour permettre la pénétration du colorant dans la cellule nous avons plongé les pointes racinaires dans l'enzyme R (Annexe) pendant 10 mn à température variant entre 30-37 °C.

### • Coloration

Afin de mettre en évidence les zones méristématiques, les racines hydrolysées sont colorées par la solution de l'acéto-orcée pendant 30 mn jusqu'à coloration intense.



- **Montage entre lame et lamelle**

La zone méristématique hydrolytique, colorée, isolée est déposée sur une lame dans une goutte de l'acéto-orcéine et écrasée entre lame et lamelle pour assurer la dissociation des cellules. Cette dissociation est plus difficile si les tissus ont été préalablement stockés dans l'alcool acétique pendant une longue durée.

- **Observation microscopique**

Les cellules en division sont repérées au microscope photonique à l'aide d'un objectif de faible grossissement (X 10) puis grossissement (X 40) pour une bonne visualisation de l'image. Le dernier grossissement est celui de l'objectif (X 100) à immersion.

Pour établir un caryotype les plaques métaphasiques sont photographiées à l'aide d'un microscope ZEISS Axio scope sur lequel est monté une camera Sony M35 à un grossissement X2500

## **2.3 Établissement du caryotype**

Différents paramètres caractérisent un caryotype, tel que le nombre chromosomique de base, la longueur totale des chromosomes, la longueur relative de chaque paire chromosomique, la présence de satellite, le degré de symétrie qui tient compte des longueurs totales des chromosomes et des positions centromériques.

La détection des chromosomes homologues et la détermination de l'emplacement de chacun d'eux dans le caryogramme et la position des centromères sont faites d'après la méthode de Levan et *al.* (1964).

Les idiogrammes sont construits d'après des mesures effectuées sur quatre plaques métaphasiques appartenant à plusieurs individus différents de la même population.

Les lames sont rigoureusement sélectionnées pour éviter les erreurs possibles dues aux différents niveaux de spiralisation des chromosomes. Le degré de spiralisation des chromosomes devrait être relativement le même pour toutes les plaques, les différences de longueur des chromosomes d'une lame à une autre ne dépassant pas le seuil de 10 %.

Les mesures effectuées sont les suivantes :

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

$$LT = BC + BL$$



- Longueur totale relative de tous les chromosomes

$$\text{LTR} = (\text{LT} / \sum \text{LT}) \times 100$$

- Valeur moyennes des rapports bras longs / les bras courts

$$r = \text{BL} / \text{BC}$$

- Différence entre la longueur du bras long et celle du bras court

$$d = \text{BL} - \text{BC}$$

- Indices centromériques pour chaque paire chromosomique

$$\text{Ic \%} = (\text{BC} / \text{BL}) \times 100$$

- Indice d'asymétrie du caryotype

$$\text{Ias} = (\sum \text{BL} \times 100) / \sum \text{LT}$$

- Rapport R entre la paire chromosomique la plus longue et la plus courte de la garniture chromosomique

Les résultats sont présentés sous forme d'un tableau selon la nomenclature chromosomique (Tab. 5) proposée par Levan et *al.* (1964)

**Tableau 5:** Nomenclature chromosomique proposée par Levan et *al.* (1964)

Position de centromère	d	r	Ic	Type chromosomique
Position médiane	00.0	01.0	50.0	M
Région médiane	00.0 – 02.5	1.0 – 1.7	50.0 – 37.5	m
Région Submédiane	02.5 – 05.0	1.7 – 3.0	37.5 – 25.0	Sm
Région subterminale	05.0 – 07.0	3.0 – 7.0	25.0 – 12.5	St
Région terminale	07.5 – 10.0	7.0 - ∞	12.5 – 00.0	t
Position terminale	10.0	∞	00.0	T

M : métacentrique  
 m : métacentrique senso largo  
 Sm : Submétacentrique  
 St : subtélocentrique  
 t : acrocentrique  
 T : télocentrique

r : bras long / bras court  
 d : bras long – bras court  
 Ic : indice centromérique



## **2.4 Méthodes d'étude de l'hétérochromatine**

### **2.4.1 Coloration au Giemsa « C-banding »**

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.

Nous utilisons la technique décrite par Bauchan et Hossain (1997) sur *Medicago sativa*.

Après prétraitement, fixation et hydrolyse (étapes décrites dans la technique d'observation des méristèmes racinaires) nous avons procédé aux étapes suivantes :

- **Délaméllation**

Le décollement des lamelles se fait par la neige carbonique (CO<sub>2</sub> liquide, -196 °C)

- **Déshydratation**

Toutes les lames sont rincées à l'éthanol 95 % et séchées pendant 24h à température ambiante

- **Dénaturation**

Les lames sont trempées dans une solution d'hydroxyde de baryum Ba (OH)<sub>2</sub> à 6 % pendant 5 mn à 55 - 60 °C

- **Rinçage**

Les préparations sont ensuite rincées à l'eau distillée pendant 2 mn ensuite avec l'eau de robinet pendant 45 mn

- **Renaturation**

Les lames sont transférées dans une solution 2XSSC (0.3 M de Chlorure de Sodium et 0.03 M de Citrate Trisodique) à 60 °C pendant 60 mn.

- **Rinçage**

A l'eau distillée pendant 10 mn

- **Coloration**

Incubation dans le Tampon Sorensen Phosphate pH = 6.8 avec 5 % de Giemsa pendant 20 mn

- **Montage**

Se fait avec le Depex après 24h



### **2.4.2 Technique d'obtention de protoplastes**

La technique d'obtention de protoplastes est proposée par Rosell et Villalobos en 1992 et comprend les étapes suivantes :

- Plonger les méristèmes racinaires dans un tampon citrate 0.01 M pendant 10 mn
- Transférer les méristèmes racinaires dans un verre de montre contenant une solution enzymatique (Annexe) que l'on place dans une étuve réglée à 37 °C pendant 20 mn.
- Triturer le méristème sur une lame dans une goutte d'acide acétique à 45 % sous loupe binoculaire à l'aide d'une aiguille
- Monter la préparation entre lame et lamelle.

### **2.4.3 Technique du fluorochrome-banding «Coloration à la chromomycineA3»**

#### **Étape 1 : La coloration**

- Incuber les protoplastes dans le tampon McILvain à pH 7 contenant 20 mM de  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  pendant 15 mn, on doit secouer les lames pour se débarrasser de l'excès du tampon.
- Rajouter sur la préparation une grosse goutte de chromomycine A3 (Annexe) pendant 10 mn à l'obscurité.
- Rincer avec le tampon McILvain à pH 7.
- Contre colorer les préparations avec le vert de méthyle à 0.01 % dissout dans un tampon McILvain à pH 5,5 pendant 10 mn.
- Rincer rapidement avec le tampon McILvain à pH 5,5.
- Bien sécher les lames.

#### **Étape 2 : Montage des lames**

- Monter les lames dans une goutte de Citifluor ou glycérol avec le tampon McILvain + 20 mM de  $MgCl_2$ , à pH 7

#### **Étape 3 : Observation microscopique**

- Observer au microscope à épifluorescence avec un filtre permettant une longueur d'onde d'excitation de 450 nm et d'émission de 560 nm



#### **2.4.4 Coloration aux nitrates d'argent AgNO<sub>3</sub>**

C'est une technique qui a été proposée par Howell et Black (1980), elle permet de mettre en évidence le nombre de nucléoles et par conséquent d'évaluer l'activité des NORs, elle comprend les étapes suivantes :

- Rincer les racines convenablement à l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à l'élimination totale du fixateur.
- Plonger les racines dans une solution de nitrates d'argent à 15 % et à pH = 5,5 à 60 °C pendant 16 heures.
- Rincer soigneusement les racines avec de l'eau distillée.
- Placer les racines dans une solution de révélation (1 % hydroquinone + formaldéhyde 10 %) pendant 5 mn avec agitation.
- Rincer les racines quand elles deviennent jaune marron.
- Ecraser la pointe racinaire entre lame et lamelle dans une goutte d'acide acétique à 45 %.

# **Chapitre III**

## **Résultats et Discussion**



## **Chapitre III : Résultats et Discussion**

### **1 Dénombrement chromosomique**

➤ Mise au point de la technique de coloration des mitoses :

Trois agents mitoclasiques (Tab. 6) ont été testés. Les conditions optimales d'obtention des plaques métaphasiques ont été remplies grâce à la 8 Hydroxy-quinoleine et l'eau froide. La colchicine à 0.05 % ne semble pas être un bon agent mitoclasique pour notre matériel.

**Tableau 6 :** Mise au point de la technique d'étude

Prétraitement	Durée	Résultats
8 Hydroxy-Quinoleine	2 h 37 mn à 16 °C	Bon étalement des chromosomes avec une bonne individualisation
L'eau froide	18 h – 20 h à 0 °C	Bon étalement des chromosomes
Colchicine 0.05 %	2 h à la température ambiante	Les chromosomes restent encore plus ou moins déspiralisés

### **2 Analyse des plaques métaphasiques**

Les mesures sont effectuées sur quatre plaques métaphasiques pour chaque population.

Les résultats obtenus montrent que le niveau de ploïdie chez les quatre taxons est  $2n = 2x = 16$ , les caryogrammes montrent la présence de deux types chromosomiques submétacentriques et métacentriques.

Onze idiogrammes sont tracés selon les populations récoltées : trois pour *M. intertexta*, quatre pour *M. ciliaris*, trois pour *M. granadensis* et un pour *M. muricoleptis*.

#### **2.1 *Medicago intertexta***

L'examen des planches 1, 2, 3 et le tableau 7 indique que le caryotype de *M. intertexta* se caractérise par la présence de 5 paires métacentriques et 3 paires submétacentriques. La constriction secondaire (CS) est portée par le bras court de la paire chromosomique 4 (Fig. 9).

La formule chromosomique est la suivante :

$$2n = 2x = 16 = 10 m + 6 sm \text{ (dont 2 CS).}$$

Les constriction secondaires peuvent jouer le rôle d'organiseurs nucléolaires (NORs), c'est-à-dire qu'ils contribuent à la reconstitution du nucléole qui restera visible pendant toute l'interphase.





La longueur totale des chromosomes chez les trois populations de cette espèce varie de **2.4 µm** à **5.7 µm**, alors que le rapport entre le BC/BL de tous les chromosomes est inférieur à **1.6**

La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte **R** varie de **1.4** à **2.3** et la valeur de l'indice d'asymétrie (**Ias**) varie de **57.48 %** à **60.7 %**

La différence entre les longueurs totales relatives de la 1<sup>ère</sup> paire et de la 8<sup>ème</sup> paire est de **10.78** pour la population 1, **5.26** pour la population 3 et **5.91** pour la population 7.

p.ch N° pop	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1								
3								
7								

**Figure 9** : Caryogrammes des trois populations de *M. intertexta*

P.Ch : Paires Chromosomiques

○ : Paire chromosomique portant la constriction secondaire

**Tableau 7:** Données numériques concernant la garniture chromosomique de 3 populations de *Medicago intertexta*

**Population N°1**

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic%	Tc
1	3,117± 0.15	2,663± 0.18	5,781	18,468	1,170	0,454	46,065	m
2	2,575± 0.05	2,464± 0.07	5,040	16,101	1,044	0,110	48,902	m
3	2,275± 0.21	1,699± 0.19	3,975	12,698	1,339	0,576	42,752	m
4	1,845± 0.02	1,758± 0.05	3,603	11,51	1,049	0,087	48,792	m-cs
5	2,436± 0.11	1,163± 0.13	3,599	11,50	2,093	1,272	32,326	sm
6	2,191± 0.01	1,278± 0.13	3,469	11,082	1,714	0,913	36,841	sm
7	1,834± 0.08	1,558± 0.18	3,393	10,839	1,176	0,275	45,935	m
8	1,717± 0.05	0,719± 0.12	2,436	07,782	2,385	0,997	29,534	sm
$\Sigma$	17,994	13,307	31,301					

R = 2,372 I as % = 57,485

**Population N°3**

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic%	Tc
1	2,826±0.28	1,695±0.12	4,543	15,875	1,666	1,130	37,326	sm
2	2,117±0.12	1,693±0.12	3,810	13,314	1,25	0,423	44,444	m
3	2,252±0.04	1,343±0.02	3,595	12,562	1,67	0,909	37,409	sm
4	1,940±0.04	1,546±0.04	3,487	12,185	1,254	0,394	44,336	m-cs
5	1,717±0.02	1,693±0.02	3,410	11,916	1,013	0,023	49,657	m
6	2,191±0.24	1,199±0.04	3,399	11,877	1,879	0,992	33,210	sm
7	2,020±0.02	1,301±0.02	3,322	11,608	1,552	0,719	39,169	m
8	1,840±0.02	1,205±0.04	3,046	10,644	1,526	0,634	39,587	m
$\Sigma$	16,906	11,68	28,586					

R = 1,491 I as % = 59,14

**Population N°7**

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic	Tc
1	3,246±0.12	2,327±0.08	5,574	15,401	1,394	0,918	41,760	m
2	3,258±0.04	1,699±0.02	4,958	13,699	1,917	1,558	34,278	sm
3	2,994±0.12	1,645±0.12	4,640	12,82	1,819	1,348	35,473	sm
4	2,399±0.16	2,196±0.12	4,595	12,696	1,092	0,203	47,791	m-cs
5	2,836±0.08	1,745±0.08	4,582	12,66	1,624	1,091	38,095	m
6	2,854±0.28	1,7±0.12	4,555	12,586	1,678	1,154	37,32	sm
7	2,399±0.04	1,699±0.16	4,099	11,326	1,411	0,699	41,463	m
8	1,981±0.24	1,205±0.04	3,186	08,803	1,642	0,775	37,839	m
$\Sigma$	21,97	14,221	36,191					

R = 1,749 I as % = 60,705

**BL :** bras long, **BC:** bras court, **LT:** longueur totale, **LTR :** longueur totale relative, **r:** BL/BC, **d:** BL-BC, **Ic:** indice centromérique , **TC:** type chromosomique, **Ias:** indice d'asymétrie, **R :** rapport entre la longueur de la paire la plus longue et la plus courte



## 2.2 *Medicago ciliaris*

D'après les planches 4, 5, 6, 7 et le tableau 8 ci-après, le caryotype de ce taxon comporte 6 paires métacentriques et 2 paires submétacentriques. La constriction secondaire (CS) est portée par le bras court de la paire chromosomique 2 (Fig. 10).

La formule chromosomique:

$$2n = 2x = 16 = 12 m + 4 sm \text{ (dont 2 CS).}$$

p. ch N° pop	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
	4							
6								
12								
15								

**Figure 10 :** Caryogrammes des quatre populations de *M. ciliaris*

P.Ch : Paires Chromosomiques

: Paire chromosomique portant la constriction secondaire

La longueur des chromosomes varie de **2.8 µm** à **6.2 µm**, le rapport **R** de **1.4** à **1.7** et l'indice d'asymétrie de **58.62 %** à **60.19 %**.

Au sein de chaque population la différence entre les longueurs totales relatives de la plus grande paire de chromosomes et celle de la plus petite n'est pas très importante, elle est de **6.88** pour la population 4, **5.97** pour la population 6, **5.80** pour la population 12 et **5.35** pour la population 15.

**Tableau 8 :** Données numériques concernant la garniture chromosomique de 4 populations de *Medicago ciliaris*

Population N°4

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic	Tc
1	3,754±0.08	1,893±0.04	5,648	16,619	1,983	2,060	33,516	sm
7	2,691±0.2	1,888±0.08	4,579	13,473	1,425	0,803	41,231	m-cs
2	2,544±0.02	1,981±0.04	4,525	13,314	1,284	0,563	43,774	m
3	2,464±0.02	1,785±0.12	4,250	12,505	1,380	0,679	42,004	m
4	2,549±0.08	1,6±0.02	4,149	12,208	1,593	0,949	38,563	m
5	2,231±0.28	1,609±0.12	3,840	11,299	1,386	0,622	41,897	m
6	2,485±0.2	1,198±0.04	3,683	10,837	2,074	1,487	32,527	sm
8	1,734±0.28	1,573±0.12	3,308	09,733	1,102	0,261	47,551	m
LT $\Sigma$	20,456	13,529	33,985					

R = 1,707 I as % = 60,191

Population N°6

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic%	Tc
1	3,531± 0.28	2,685± 0.08	6,216	15,214	1,315	0,845	43,196	m
2	3,135± 0.02	2,834± 0.08	5,970	14,612	1,106	0,301	47,47	m-cs
3	3,615± 0.12	2.24± 0.02	5,855	14,33	1,613	1,375	38,257	m
4	3,810± 0.04	1,981± 0.12	5,791	14,174	1,923	1,829	34,203	sm
5	2,836± 0.02	1,996± 0.16	4,833	11,829	1,421	0,840	41,300	m
6	2,575± 0.04	1,856± 0.04	4,432	10,847	1,387	0,719	41,886	m
7	2,540± 0.08	1,439± 0.02	3,979	09,739	1,765	1,101	36,165	sm
8	1,996± 0.28	1,780± 0.04	3,776	09,242	1,120	0,215	47,147	m
LT $\Sigma$	24,042	16,814	40,856					

R = 1,646 I as % = 58,845

Population N°12

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic%	Tc
1	2,967±0.12	2,135±0.08	5,103	16,185	1,389	0,831	41,853	m
2	2,627±0.12	2,056±0.12	4,683	14,852	1,277	0,571	43,903	m-cs
3	2,275±0.04	2,159±0.02	4,435	14,066	1,053	0,116	48,691	m
4	2,275±0.08	1,411±0.08	3,687	11,693	1,612	0,864	38,278	m
5	2,258±0.28	1,278±0.12	3,536	11,215	1,766	0,980	36,141	sm
6	2,275±0.04	1,137±0.16	3,413	10,824	2,000	1,137	33,333	sm
7	1,883±0.16	1,411±0.12	3,294	10,447	1,334	0,471	42,841	m
8	1,996±0.24	1,278±0.04	3,274	10,384	1,561	0,717	39,036	m
LT $\Sigma$	18,560	12,969	31,529					

R = 1,558 I as % = 58,866

Population N°15

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic	Tc
1	2,672± 0.07	1,508± 0.03	4,180	14,954	1,771	1,164	37,746	sm
3	2,333± 0.18	1,799± 0.03	4,132	14,783	1,296	0,534	43,538	m-cs
2	2,327± 0.06	1,717± 0.08	4,044	14,468	1,355	0,610	42,450	m
4	2,297± 0.09	1,270± 0.06	3,567	12,761	1,808	1,027	35,602	sm
5	1,834± 0.01	1,418± 0.14	3,253	11,638	1,293	0,416	43,600	m
6	1,745± 0.09	1,270± 0.09	3,016	10,79	1,374	0,475	42,116	m
7	1,473± 0.08	1,418± 0.1	2,892	10,346	1,038	0,055	49,047	m
8	1,699± 0.21	1,163± 0.12	2,863	09,598	1,460	0,535	40,646	m
LT $\Sigma$	16,387	11,566	27,953					

R = 1,459 I as % = 58,62

BL : bras long, BC: bras court, LT: longueur totale, LTR : longueur totale relative, r: BL/BC, d: BL-BC, Ic: indice centromerique , TC: type chromosomique, Ias: indice d'asymétrie, R : rapport entre la longueur de la paire la plus longue et la plus court



### 2.3 *Medicago granadensis*

Les chromosomes de cette espèce représentés dans les planches 8, 9 et 10 sont généralement de petite taille par rapport aux chromosomes de *M. intertexta* et *M. ciliaris* (Tab. 9), dont les mesures varient de **1.7 µm** à **3.7 µm**.

Le caryotype est composé de 4 paires de chromosomes métacentriques et 4 paires submétacentriques. La formule chromosomique est :

$$2n = 2x = 16 = 8 m + 8 sm \text{ (dont 2 CS).}$$

Les caryogrammes montrent la présence d'une constriction secondaire sur le bras court de la paire chromosomique N° 7 chez les populations 2 et 8, et sur la première paire chromosomique chez la population 11 (Fig. 11)

La différence entre les longueurs totales relatives de la 1<sup>ère</sup> paire et de la 8<sup>ème</sup> est de **6.11** pour la population 2, **3.11** pour la population 8 et **7.73** pour la population 11.

P.Ch N° Pop	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
2								
8								
11								

**Figure 11** : Caryogrammes des trois populations de *M. granadensis*

P.Ch : Paires Chromosomiques

○ : Paire chromosomique portant la constriction secondaire

**Tableau 9:** Données numériques concernant la garniture chromosomique de 3 populations de *Medicago granadensis*

**Population N°2**

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic%	Tc
1	1,996± 0.16	1,699± 0.06	3,695	16,124	1,174	0,296	45,988	m
2	1,745± 0.07	1,278± 0.02	3,023	13,192	1,365	0,467	42,266	m
3	1,881± 0.01	1,098± 0.01	2,979	13	1,713	0,782	36,858	sm
4	1,818± 0.03	1,114± 0.13	2,936	12,812	1,631	0,704	37,942	sm
5	1,999± 0.01	0,905± 0.09	2,905	12,677	2,208	1,094	31,153	sm
6	1,752± 0.04	1,027± 0.07	2,780	12,131	1,705	0,725	36,942	sm
7	1,278± 0.04	1,027± 0.07	2,305	10,058	1,243	0,250	44,566	m-cs
8	1,163± 0.1	1,129± 0.02	2,293	10,006	1,030	0,034	49,242	m
<b>LT<math>\Sigma</math></b>	<b>13,635</b>	<b>9,28</b>	<b>22,915</b>					

R = 1,611 I as % = 59,502

**Population N°8**

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic%	TC
1	1,278± 0.04	1,163± 0.1	2,442	14,723	1,487	0,114	47,661	m
2	1,418± 0.1	0,998± 0.07	2,416	14,566	1,415	0,420	41,300	m
3	1,505± 0.02	0,837± 0.02	2,343	14,126	1,372	0,667	35,723	sm
4	1,405± 0.02	0,798± 0.2	2,203	13,282	1,76	0,616	36,223	sm
5	1,470± 0.02	0,692± 0.04	2,162	13,035	1,133	0,577	32,007	sm
6	1,263± 0.1	0,746± 0.1	2,010	12,118	0,985	0,417	37,114	sm
7	1,137± 0.04	0,846± 0.04	1,984	11,961	0,963	0,291	42,667	m-cs
8	1,027± 0.02	0,898± 0.02	1,926	11,612	0,923	0,128	46,659	m
<b>LT<math>\Sigma</math></b>	<b>10,503</b>	<b>6,083</b>	<b>16,586</b>					

R = 1,267 I as % = 63,324

**Population N°11**

paire	BL $\mu\text{m}$	BC $\mu\text{m}$	LT $\mu\text{m}$	LTR	r	d	Ic	TC
1	2,045±0.04	1,437±0.04	3,482	15,581	1,423	0,608	41,269	m-cs
2	2,098±0.12	1,270±0.02	3,368	15,071	1,651	0,827	37,710	m
3	2,117±0.15	1,129±0.04	3,246	14,525	1,875	0,988	34,782	sm
4	1,799±0.02	1,029±0.12	2,828	12,654	1,505	0,670	36,386	sm
5	1,778±0.4	0,937±0.16	2,715	12,149	1,386	0,640	34,511	sm
6	1,652±0.12	0,888±0.15	2,540	11,366	1,571	0,664	34,960	sm
7	1,502±0.16	0,906±0.1	2,409	10,779	1,657	0,596	37,608	m
8	0,988±0.04	0,765±0.2	1,753	07,844	1,291	0,222	43,645	m
<b>LT<math>\Sigma</math></b>	<b>13,982</b>	<b>8,364</b>	<b>22,346</b>					

R = 1,92 I as % = 62,567

**BL** : bras long, **BC**: bras court, **LT**: longueur totale, **LTR** : longueur totale relative, **r**: BL/BC, **d**: BL-BC, **Ic**: indice centromerique , **TC**: type chromosomique, **Ias**: indice d'asymétrie, **R** : rapport entre la longueur de la paire la plus longue et la plus courte



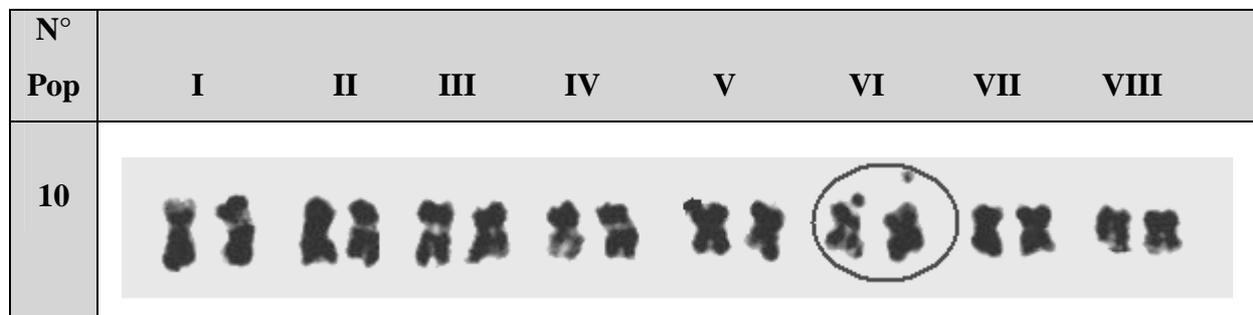
## 2.4 *Medicago muricoleptis*

Le caryogramme de ce taxon diploïde est représenté dans la figure 12 et les mesures sont indiquées dans le tableau 10.

La taille des chromosomes varie de **2.7 µm** à **4.9 µm**, la différence de la longueur totale relative des chromosomes est **7.2 µm**. La valeurs de l'indice d'asymétrie du caryotype (**I As % = 60,88 %**), le rapport de la taille entre la paire la plus longue et la plus courte est moins important **R = 1.79**

Le caryotype est composé de 4 paires métacentriques et 4 paires submétacentriques dont une satellifère.

$$2n = 2x = 16 = 8 m + 8 sm \text{ (dont 2 sat).}$$



**Figure 12 :** Caryogramme de la population 10 de *M. muricoleptis*

P.Ch : Paires Chromosomiques

○ : Paire chromosomique portant la constriction secondaire

**Tableau 10:** Données numériques concernant la garniture chromosomique de *Medicago muricoleptis*

### Population N°10

paires	BL µm	BC µm	LT µm	LTR	r	d	Ic%	Tc
1	3,273±0.02	1,717±0.08	4,990	16,28	1,906	1,556	34,404	sm
2	3,022±0.16	1,719±0.12	4,742	15,47	1,470	1,103	36,25	sm
3	2,836±0.12	1,552±0.4	4,389	14,32	1,827	1,284	35,370	sm
4	2,297±0.04	1,785±0.08	4,082	13,32	1,286	0,512	43,726	m
5	2,020±0.12	1,390±0.12	3,410	11,12	1,453	0,630	40,753	m
6	2,019±0.04	1,178±0.08	3,197	10,43	1,713	0,841	36,847	sm-sat
7	1,609±0.12	1,439±0.08	3,048	09,94	1,118	0,169	47,213	m
8	1,578±0.08	1,205±0.07	2,783	09,08	1,308	0,372	43,317	m
LTΣ	18,659	11,988	30,647					

$$R = 1,792 \quad I \text{ as } \% = 60,883$$

**BL** : bras long, **BC**: bras court, **LT**: longueur totale, **LTR** : longueur totale relative, **r**: BL/BC, **d**: BL-BC, **Ic**: indice centromérique , **Tc**: type chromosomique, **Ias**: indice d'asymétrie, **R** : rapport entre la longueur de la paire la plus longue et la plus courte



Le tableau 11 montre les différences entre les types chromosomiques, l'indice d'asymétrie (Ias %) et le rapport de taille entre la paire la plus longue et la plus courte R chez les quatre taxons.

**Tableau 11 :** Données caryologiques concernant les quatre espèces étudiées

nom d'espèce	2n	Formule chromosomique		Longueur totale des chromosomes dans la garniture (µm)	Indice d'asymétrie I as %	Rapport entre la paire la plus longue et la plus courte	Satellite (Sat) / Constriction secondaire (CS)
		Nombre de paires					
		Métacentrique (m) 	Submétacentrique (sm) 				
<i>M. intertexta</i>	16	5	3	2,4 - 5,7	59,11	1,86	CS
<i>M. Cliaris</i>	16	6	2	2,8 - 6,2	59,13	1,58	CS
<i>M. granadensis</i>	16	4	4	1,7 - 3,7	61,79	1,59	CS
<i>M. muricoleptis</i>	16	4	4	2,7 - 4,9	60,88	1,79	Sat



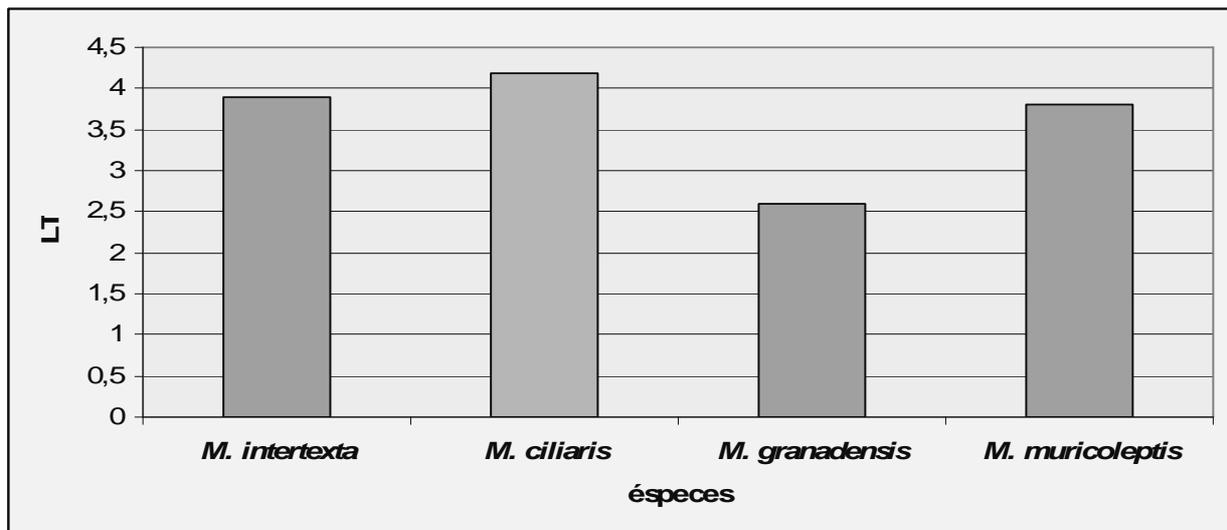
### 3 Discussion

Rappelons que le nombre chromosomique de base chez le complexe *Medicago* est  $x = 8$ . Des travaux le confirment : Lesins et Lesins (1979); Sehlarbaum et *al.* (1983); Bauchan et Hossain (1997, 1998); Marcela et *al.* (2008). Nos résultats sont conformes avec ceux de bibliographie.

Les taxons diploïdes *M. intertexta*, *M. ciliaris*, *M. granadensis*, *M. muricoleptis* ont des caryotypes voisins constitués de 8 paires de chromosomes (métacentriques et submétacentriques) mais leurs garnitures chromosomiques montrent la présence de certaines particularités :

- **Longueur des chromosomes**

D'après l'analyse des tableaux numériques on a constaté que *M. ciliaris* possède la plus grande taille chromosomique par rapport aux autres espèces comme le montre l'histogramme de la Figure 8.



**Figure 13 :** Histogramme de la longueur total (LT) des chromosomes chez les quatre espèces étudiées

- **La présence d'une constriction secondaire ou satellite**

L'analyse du caryotype des 4 espèces met en évidence un polymorphisme interspécifique relatif à la présence ou l'absence d'une constriction secondaire ou d'un satellite portés par des chromosomes différents (Pl. 1 à 11). *M. muricoleptis* se différencie des autres espèces par la présence d'un satellite. Cette différence singularise cette espèce des 3 autres. Son isolement reproductif décrit par Frenzel en 1968 pourrait expliquer cette particularité.



- **L'asymétrie**

Lewisky (1931) est le premier à avoir utilisé la notion d'asymétrie dans la description du caryotype. Stebbin (1957) adopte et développe le même concept sur un grand nombre d'espèces. Il propose une classification des caryotypes suivant leur degré d'asymétrie en se basant surtout sur le rapport des longueurs (BL/BC) (Siljak–Yakovlev, 1986)

Un caryotype symétrique présente des chromosomes approximativement de la même taille et de type méta ou submétacentrique, ce qui lui donne un aspect homogène. Un caryotype asymétrique possède des chromosomes de tailles différentes et de type subtélocentrique, télocentrique ou acrocentrique (Siljak–Yakovlev, 1986).

D'après les valeurs de cet indice, *M. ciliaris* et *M. intertexta* possèdent le caryotype le plus primitif (Ias = 59.13 % et 59,11 %). *M. muricoleptis* et *M. granadensis* présentent un caryotype tendant vers l'asymétrie (60.88 % et 61.79 %).

- **Evolution du caryotype dans la section des *Intertextae***

Selon Sinoto et Sato (1940 in Sehlarbaum et *al.* 1983) la section des *Intertextae* est considérée comme un modèle d'évolution du caryotype de la symétrie vers l'asymétrie. Le caryotype de *M. ciliaris* représente le caryotype de base de la section, et le caryotype de *M. granadensis* est le plus évolué. Nos résultats confirment cette hypothèse.

Lesins *et al.* (1971) proposent que dans la section des *Intertextae*, si on considère que l'évolution du caryotype s'est faite des grandes paires chromosomiques et symétriques vers les paires plus petites et asymétriques, *M. intertexta* et *M. ciliaris* sont les ancêtres de *M. granadensis* et *M. muricoleptis*. Cette proposition est appuyée sur la chorologie et l'interfertilité des espèces à partir desquelles Lesins *et al.* avancent deux hypothèses relatives à la spéciation au sein de cette section. La première hypothèse est que *M. muricoleptis* et *M. granadensis* sont issues d'une hybridation entre *M. ciliaris* et *M. intertexta*. La deuxième hypothèse est que les deux espèces ont évolué indépendamment à partir d'espèces communes du complexe.



- **La présence ou l'absence de chromosomes B**

Heyn (1963) est le premier à signaler la présence d'un chromosome B chez l'espèce *M. granadensis*. Agarwal et Gupta (1983) in Bauchan et Hossain (1999) montrent la présence de chromosomes B chez plusieurs espèces du genre *Medicago* : *M. ciliaris* All, *M. intertexta* Mill, *M. murex* Willd et *M. littoralis* Rohde.

Ce résultat a été aussi confirmé à l'aide des travaux de Schlarbaum et *al.* (1983) sur la section des *Intertextae* où ils ont signalé l'existence d'un chromosome B.

La présence des chromosomes surnuméraires chez *M. ciliaris* (pop 4 et 6) pourrait être expliquée par la grande amplitude altitudinale (980 mm et 860 mm). Chez *M. intertexta* et *M. muricoleptis* les facteurs du milieu (pluviométrie et altitude) ne semblent pas avoir l'effet sur cette caractéristique, d'autres facteurs du milieu, non pris en compte dans notre étude, pourraient avoir un effet. Toutefois, comme l'affirme Bidant (1971) in Laouar et Abdelguerfi (1999) les variations au niveau des populations peuvent être purement aléatoires ou en rapport avec des caractéristiques géographiques ou écologiques.

D'après Siljak-Yakovlev en 1986 le principal rôle du chromosome B est qu'il permet de meilleures adaptations des populations à un nouvel environnement.

- **la présence ou l'absence des liaisons inter-chromosomiques**

Un réseau de fibres interchromosomiques probablement d'origine hétérochromatique a été mis en évidence grâce à la coloration à l'acéto-orcéine chez *M. intertexta* (Pop.1), *M. ciliaris* (Pop. 6 et 12) et *M. muricoleptis* (Pop.10). Ces fibres se révèlent être très solides, puisqu'elles résistent à différents traitements qui normalement provoquent leur rupture (Pl. 15).

Ce résultat se rapproche de celui établi par Siljak-Yakovlev (1986) à propos d'associations entre les chromosomes chez l'espèce *Centaurea alpina*.

Selon l'auteur, la persistance de ces liaisons entre les chromosomes affaiblit le taux de la variabilité et entraîne une hérédité en bloc de certains caractères.



## 4 C-Banding

Nous avons effectué plusieurs tentatives de C-banding sur les quatre taxons étudiés. Cette technique s'avère difficile.

### ➤ Analyse du C-banding

Par la technique de coloration différentielle exposée au chapitre précédent nous avons pu mettre en évidence la présence de bandes hétérochromatiques sans pouvoir réaliser le caryotype complet (Pl. 12).

La mise en évidence des bandes nous a permis d'identifier trois types de bandes : télomériques, centromériques et intercalaires au niveau des bras longs et courts des chromosomes.

On remarque que les quatre espèces étudiées sont riches en hétérochromatine constitutive.

*M. ciliaris* et *M. muricoleptis* possèdent de l'hétérochromatine en plus grande quantité (les bandes intercalaires sont plus intenses) ceci est expliqué par Siljak-Yakovlev (1986) par l'existence d'une corrélation entre la quantité d'hétérochromatine et la répartition altitudinal des différents espèces. *M. ciliaris* occupe des habitats à des altitudes relativement élevées (980 m), alors que *M. muricoleptis* pousse à 290 m.

La surcharge en hétérochromatine pourrait être une réponse à des nouvelles conditions écologiques. Lespinase (1980), *in* Siljak-Yakovlev (1986).

Nos résultats sont conformes à ceux établis par Bauchan et Hossain (1999) sur *Medicago sativa ssp. falcata* (L.) Acrangeli, où ils ont remarqué l'existence de bandes d'hétérochromatine au niveau centromérique, télomérique et intercalaire sur le bras court et long de tous les chromosomes.

## 5 Le fluochrome banding (chromomycineA3)

La coloration à la chromomycine A3 (CMA3) a mis en évidence les séquences d'hétérochromatine répétées riches en base GC. Ainsi des bandes de CMA+ sont détectées sur la plupart des chromosomes chez *M. intertexta* et *M. muricoleptis*.

Chez *M. intertexta* la technique a révélé le marquage de 16 chromosomes avec des spots de CMA+ (pl. 13, a) :



03 paires chromosomiques présentent des bandes centromériques.

02 paires chromosomiques présentent des bandes centromériques et télomériques du bras court

02 paires chromosomiques présentent un marquage de CMA+ au niveau télomérique des bras courts.

01 paire chromosomique présente un marquage CMA+ au niveau télomérique des bras longs et courts ce qui pourrait correspondre aux régions des organisateurs nucléolaires et par conséquent aux constriction secondaires.

Chez *M. muricoleptis* 7 paires présentent des signaux au niveau centromérique et la 8<sup>ème</sup> paire au niveau télomérique des bras courts et aux satellites (pl. 13, b).

Les travaux de Cerbah *et al.* (1999) sur l'espèce *M. truncatula* montrent la présence des larges bandes riche en bases GC au niveau des centromères et les régions des NORs (constriction secondaire).

## **6 Nitrates d'argent (Ag-banding)**

La technique de coloration aux nitrates d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) a permis de mettre en évidence le nombre de nucléoles dans les cellules métaphasiques et révèle l'activité des gènes ribosomiques.

Le comptage des nucléoles est effectué sur 50 cellules étudiées du même individu (Tab. 12).

**Tableau 12:** Détermination du nombre de nucléoles par cellule chez les quatre taxons étudiés

Espèce	Nombre de cellules	1 nucléole	2 nucléoles
<i>M. intertexta</i>	50	45	5
<i>M. ciliaris</i>	50	42	8
<i>M. granadensis</i>	50	47	3
<i>M. muricoleptis</i>	50	48	2



Nos observations (planche 14 et le tableau 12) ont mis en évidence l'existence de un ou deux nucléoles avec une majorité de un nucléole par noyau. Le nombre de nucléoles correspond au nombre de sites NORs actifs chez ces espèces, ceci peut être expliqué par la fusion de deux NORs pour n'en former qu'un seul nucléole ou alors l'activation d'un seul site en interphase (Siljak-Yakovlev, 1986).

La constriction secondaire peut jouer le rôle d'organisateur nucléolaire c'est-à-dire qu'il contribue lors de la télophase à la reconstitution d'un nucléole qui restera visible pendant toute l'interphase (Gorenflot et *al.*, 1980).

La taille des nucléoles diffère d'une cellule à une autre. Elle est grande quand il n'y a qu'un seul nucléole et elle est relativement moyenne quand les nucléoles sont au nombre de deux.

D'après Van Gansen et Alexander (1997), chaque organisateur nucléolaire est le site de formation d'un nucléole. Cependant, comme les nucléoles fusionnent et ségrégent facilement leur nombre qui n'est pas stable ne peut pas être un indice du nombre d'organismes nucléolaires présent dans le noyau interphasique.

Hayes (2000) signale que les régions organisatrices nucléolaires colorées par la méthode Ag-NOR occupent des positions bien définies dans les chromosomes, parfois visibles comme une constriction secondaire, mais leur nombre varie d'un organisme à un autre.

# Conclusion et perspectives



## Conclusion et Perspectives

L'objectif de ce travail était une contribution à la caractérisation cytogénétique du complexe d'espèces de *Medicago* de la section des *Intertextae*. Au cours de ce travail, nous avons appliqué des méthodes de cytogénétique classique (coloration à l'acéto-orceine, aux nitrates d'argent et C-banding) et du fluochrome banding.

Le niveau de ploïdie a été confirmé  $2n = 2x = 16$ . Le caryotype pour chaque espèce se caractérise de la façon suivante :

### *Medicago intertexta* :

Cinq paires de chromosomes métacentriques dont une avec une constriction secondaire et trois paires submétacentriques. La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte (**R**) est comprise entre **1.4 et 2.3**. La longueur totale (LT) varie de **2.4 µm** à **5.7 µm**, la valeur de la longueur totale relative (LTR) est entre **12.46** et **12.59**

### *Medicago ciliaris* :

Six paires de chromosomes métacentriques dont une avec une constriction secondaire et deux paires submétacentriques. La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte (**R**) est comprise entre **1.4 et 1.7**. La longueur totale (LT) varie de **2.8 µm** à **6.2 µm**, la valeur de la longueur totale relative (LTR) est entre **12.43** et **12.49**

### *Medicago granadensis* :

Quatre paires de chromosomes métacentriques dont une avec une constriction secondaire et quatre paires submétacentriques. La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte (**R**) est comprise entre **1.26 et 1.92**. La longueur totale (LT) varie de **1.7 µm** à **3.7 µm**, la valeur de la longueur totale relative (LTR) est entre **12.49** et **12.51**

### *Medicago muricoleptis* :

Quatre paires de chromosomes métacentriques et quatre paires submétacentriques dont une avec un satellite. La valeur du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte (**R**) est égale à **1.79**. La longueur totale (LT) varie de **2.7 µm** à **4.9 µm**, la valeur de la longueur totale relative (LTR) est **12.49**

Cette section est caractérisée par la présence de chromosomes B. Leur présence pourrait expliquer l'adaptation de ces populations aux conditions de milieu difficiles.



Les caryotypes des quatre taxons montrent la présence des chromosomes métacentriques et submétacentriques. D'après les valeurs de l'indice d'asymétrie *M. ciliaris* et *M. intertexta* possèdent le caryotype le plus primitif. *M. muricoleptis* et *M. granadensis* présentent un caryotype tendant vers l'asymétrie.

La recherche des séquences répétées en tandem tels que l'hétérochromatine par l'application de la méthode de C-banding a montré l'existence de l'hétérochromatine constitutive localisée dans les régions centromérique, intercalaire et télomérique.

La coloration à la chromomycine A3 chez *M. intertexta* et *M. muricoleptis* a mis en évidence des bandes hétérochromatiques riches en base GC localisée principalement dans les centromères et les télomères. Chez ces deux espèces les régions des organisateurs nucléolaires montrent des signaux CMA+.

La coloration aux nitrates d'argent a mis en évidence l'existence de un ou deux nucléoles avec une majorité de un nucléole par noyau ce qui indique qu'il y a un site actif.

En perspectives, afin de mieux comprendre l'organisation du complexe *Medicago* et confirmer ou infirmer les relations phylogénétiques entre les espèces de la section des *Intertextae*, les pistes de recherche suivantes doivent être menées :

- analyse de marqueurs moléculaires tels que : la FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), la GISH (Genomic In Situ Hybridization). Ces méthodes permettront de comprendre l'organisation hétérochromatique, la localisation des gènes ribosomiques, l'homologie des génomes.

- étude de la taille du génome (cytométrie en flux).
- étude d'autres espèces du complexe *Medicago*.

# Références bibliographiques



## **Bibliographies**

**Abdelguerfi A., Laouar M., 2000a :** Etude de complexe d'espèces *Medicago ciliaris*- *M. intertexta* : caractérisation des différents types d'infructescences. Options méditerranéennes. Pp 39-42.

**Abdelguerfi A., Laouar M., 2000b :** Effet des conditions bioclimatiques du milieu d'origine sur le comportement et la floraison des populations de *M. ciliaris* (L.) Krock. Options méditerranéennes. Pp 241-243.

**Abdelguerfi-Laouar M., Abdelguerfi A., Bouznad Z., 2003 :** Autoécologie et distribution du complexe d'espèces *M. ciliaris* - *M. intertexta* en Algérie. Acta Bot. Gallica, 150 (3): 253-265.

**Amrani O., 2006 :** Valeur nutritive du chardon marie. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère. Batna.

**André G., Hubert B., 1992 :** Amélioration des espèces végétales cultivées. Quae. Paris. P 271.

**Anthony Griffiths J. F., David Suzuki T., Chrystelle S., 2002:** Introduction à l'analyse génétique. De Boeck Université. Paris. P 87

**Battandier J.A. et Trabut L., 1890 :** Flore de l'Algérie, Dicotylédones. Alger. Pp 292-295.

**Bauchan G. R., Hossain M. A., 1997:** Karyotype Analysis of C-Banded chromosomes of Diploid Alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *Caerulea* and ssp. *Falcate* and their hybrid. The journal of Heredity. 88 (6): 533-537

**Bauchan G. R., Hossain M. A., 1998:** Karyotype Analysis of N-Banded chromosomes of Diploid Alfalfa: *Medicago sativa* ssp. *caerulea* and ssp. *falcate* and their hybrid. The journal of Heredity. 89 (2): 191-193

**Bauchan G. R., Hossain M. A., 1999:** Identification of B chromosomes using Geimsa banding in *Medicago*. The journal of Heredity. 90 (3): 428-429



- Bena G., 2001:** Molecular phylogeny supports the morphologically based taxonomic transfer of the "medicagoid" *Trigonella* species to the genus *Medicago* L. *Pl. Syst. Evol.* 229: 217–236.
- Bioljk A., 1993 :** Le complexe des *Medicago* au Maroc: variabilité des ressources génétiques. Paris. Pp 307-322.
- Bonnier G., 1927 :** Flore complète portative de la France, de la Suisse et de la Belgique. Paris. P 425.
- Cerbah M., Zoltan K., Siljak-Yakovlev S., Kondorosi E., Kondorosi A., Toan H. T., 1999:** FISH Chromosome Mapping Allowing Karyotype Analysis in *Medicago truncatula* jernalong J5 and R-108-1. The American phytopathological society. Vol 12. Pp 947 - 950.
- Chakass M. A., 1984 :** Contribution biosystématique à l'étude des espèces de cinq sections du genre *Medicago* L. thèse de 3<sup>e</sup> cycle. Paris.
- Chebouti A., Abdelguerfi A., 1997 :** Etude du comportement de 48 populations de *Medicago orbicularis* (L.) Bart. dans deux zones agro-écologiques : Relation avec les conditions du milieu d'origine. *Options Méditerranéennes.* 39 :103-105.
- Chebouti A., Abdelguerfi A., 2002 :** Etude de l'effet du déficit hydrique sur le développement et le rendement fourrager chez quatre populations de *Medicago truncatula* (L.) Gaernt. *INRAA.* 10 : 27 -31
- Chebouti A., Abdelguerfi A., Mefti M., 1995 :** Etude comparative de la production de gousses de populations de *Medicago orbicularis* (L.) Bart ; relation avec les conditions du milieu d'origine. *Options Méditerranéennes.* Vol 12. Pp 21-25
- Chebouti A., Abdelguerfi A., Mefti M., 2000 :** Effet du stress hydrique sur le rendement en gousses et en graines chez trois espèces de luzernes annuelles : *Medicago aculeata*, *Medicago orbicularis* et *Medicago truncatula*. *Options Méditerranéennes.* Pp 163-166
- Classen D., Nozzolillo C., Small E., 1992:** Aphenolic-taxonomitric study of *Medicago* (leguminosae). *Can. J. Bot.* 60(12): 2477-2495.



**Derek Munro B., Ernest S., 1997 :** Les légumes du Canada. NRC Research Press. Pp 279-280.

**Dorkeld F., 1994 :** Un modèle objet dédié à la cartographie comparée des génomes de mammifères. Université Claude Bernard. Thèse de Doctorat. Lyon.

**Etienne P. J., Véronique C., Jérôme G., Philippe T., Charles R., David B., Thierry H., Jean D., Pascal G., 2001 :** La légumineuse modèle *Medicago truncatula* : approches génomiques et perspectives. CNRS-INRA. Pp1-10

**Ernest S., Stephen R. D., Deborah S., Erica J., Heidi L. Z., 1998:** Multiple independent losses of the plastid *rpoC1* intron in *Medicago* (Fabaceae) as inferred from phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. Can. J. Bot. 76(5): 791–803.

**Frenzel B., 1968:** The pleistocene vegetation of northern Eurasia. Science. 161 : 637- 649.

**Gorenflot R., Raicu P.; 1980 :** Cytogénétique et évolution. Masson. Paris. Pp 135-136

**Harry M., 2001:** Génétique moléculaire et évolutive. Maloine. Paris. P15

**Hayes H.; 2000 :** Notion de base de génétique, ADN et chromosomes. Laboratoire de génétique et biochimique et de cytogénétique. INRA. P18

**Hernandez Verdun D., Emilie L., 2004 :** Le nucléole: structure, fonctions et maladies associées. Médecine sciences. 20 : 37- 44

**Heyn C. C., 1963:** The annual species of *Medicago*. Vol 12. Publication of Hebrew university. Jerusalem. 12: 1 154

**Hireche Y., 2006 :** Réponse de la luzerne (*Medicago sativa* L) au stress hydrique et à la profondeur de semis. Université al hadj lakhdar. Thèse de magistère. Batna

**Howell W. M., Black D. A., 1980:** Controlled silver staining of nucleolar organizer regions with a protective colloidal developer. A 1-step method. Experientia 36. Pp 1014-1015



**Hubel H. R., 1985:** Silver staining as an indicator of active ribosomal genes. *Stain Technol.* 60: 285-294

**Jahier J., 1992 :** Techniques de cytogénétique végétale. INRA. Paris. Pp 57-67

**Jauzien Ph., 1995 :** Flore des champs cultivés. INRA éditions. Paris. P 232.

**Jiménez R., Burgos M., Diaz Guardia R., 1988:** A study of the Ag-staining significance in mitotic NOR's. *Heredity* 60: 125-127

**Jules J., 1992:** Plant Breeding Reviews. Wiley- Interscience. London. Pp 177 - 179.

**Julien A., 1894 :** Flore de la région de Constantine. Soc. Agric. Constantine. Pp 1-90.

**Khelifi H. E., Bellague D., Khedim A., Chedjerat A., M'hammedi Bouzina M., Merabet B. A., Laouar M., Bonmessaoud A., Lazali M., Alouane Y., Hadj-Omar K., Nabi M., Oumata S., Abdelguerfi A., 2008.** Etude de comportement de seize cultivars de luzerne pérenne (*Medicago sativa* L.) conduits sous deux régimes hydriques dans deux régions (sub-humide et semi-aride) de l'Algérie. *Options Méditerranéennes, série A, N° 79* : 323 - 326.

**Laouar M., 2005 :** Diversité Eco-Génétique chez les Fabacées et leurs Symbiotes : Cas de la Section des *Intertextae* du Genre *Medicago* L. Thèse de Doctorat, INA Alger.

**Laouar M., Abdelguerfi A., 1999a :** La variabilité de la production des gousses et des graines chez quelques populations spontanées en Algérie. *Options Méditerranéennes.* 39 : 111-117.

**Laouar M., Abdelguerfi A., 1999b :** Etude du complexe d'espèces *Medicago ciliaris*- *M. intertexta*. Relations entre les caractères biologiques et les facteurs du milieu. INA. Vol 20. Pp 40-52

**Laouar M., Abdelguerfi A., 2003 :** variabilité morphologique et phénologique chez deux taxa très proches : *Medicago ciliaris* et *Medicago intertexta*. INRAA. Pp 263- 264



- Laouar M., Kies N., Abdellaoui K., Bennour A., Bettahar N., Kadi S., Bouzza L., Abdelguerfi A., 2001 :** Effet du stress hydrique sur le comportement de 10 populations de *M.intertexta*. Options Méditerranéennes. N 45 : 167-171.
- Lapeyronie A., 1982 :** Les productions fourragères méditerranéennes - technique agricole et production méditerranéenne. Maisonneuve et Larose. Paris. Pp 307-315
- Lemonde A., Clément D., 1983 :** Biologie cellulaire et moléculaire. Presses Université Laval. Paris. Pp 396-398.
- Lesins K. A., Lesins I., 1979:** Genus *Medicago* (Leguminosae), a taxogenetic study. Plant ecology. Vol 50. N° 2: 228- 229
- Lesins K. A., Singh S. M., Erac A., 1971:** Relationship of taxa in the genus *Medicago* as revealed by hybridization. V. section *Intertextae*. Can. J. Genet. Cytol. 13: 335-346
- Levan A., Freda K., Scandberg A., 1964:** Secondary association between genetically equivalent bivalents. Hereditas. 52: 201-220.
- Lewisky G. A., 1931:** The morphology of chromosomes. Bull. App.Bot. Genet Plant Breed. 27: 19-174.
- Marcela R., Mercedes C., Josep A. R.; 2008:** Relationships of the woody *Medicago* species (section *Dendrotelis*) Assessed by Molecular Cytogenetic Analyses. Annals of botany 102: 15-22.
- Masoud S. A., Gill B. S., Johnson L. B., 1991:** C-Banding of Alfalfa Chromosomes: Standard Karyotype and Analysis of a Somaclonal Variant. The Journal of Heredity. 82(4):335-338.
- Mathieu M., 2003 :** Luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. France agricole. Pp 11-16
- Michel V., 2008 :** Les êtres humains – une structure identique pour tous. Masson. Paris. p15
- Piumbini M. R., Silvia G. P., 1998:** Karyotypes and heterochromatin variation (C-bands) in *Melipona* species (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). Genet. Mol. Biol. Vol. 21. N° 1 : 1- 22



- Prolea D., 2002 :** Espèces et utilisations, des ressources en protéines à redécouvrir : les plantes fourragères prairiales – la luzerne. Institut du Végétal et de l'Institut de l'Élevage. GNIS. Paris. Pp 4-7
- Prosperi J. M., Isabelle O., Angevain M., Génier G., Nansat P., 1993 :** Diversité génétique, conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes. INRA. Mauguio. N°4 : 1-5
- Quézel P., Santa S., 1962 :** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques Méridionales. CNRS. Tome 1. Pp 133-137
- Rabhi M., Barhoumi Z., Ksouri R., Abdely C., Gharsalli M., 2007:** Effet de l'interaction salinité-deficience ferrique chez *Medicago ciliaris*. Vol.30. N°11 : 779-788.
- Rosell C. H., Villalobos A., 1992 :** Fondement théoriques et pratiques de la culture des tissus végétaux. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome. Pp 90-91.
- Schouttet F., 2004 :** La luzerne. Fiche technique agro-industrie. Champagen-Ardenne. Pp 1-5
- Schlarbaum S. E., Ernest S., Lowell B. J., 1983:** Karyotypic Evolution, Morphological Variability and Phylogeny in *Medicago* sect. *Intertextae*. *Pl. Syst. Evol.* 145: 203 - 222
- Siljak-Yakovlev S., 1986 :** Etude cytogénétique et palynologique de compositae endémiques ou relique de la flore yougoslave. Thèse de doctorat. Université Paris-Sud. Pp 77-217
- Siziani Y., Abdelguerfi A., 2001 :** Comportement de populations de *Medicago truncatula* Gaertn dans deux zones différentes, relation avec les facteurs du milieu d'origine. Options Méditerranéennes. Pp 29-32.
- Small E., Jomphe M., 1989:** A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae). *Canad. J. Bot.* 67: 3260 – 3294.
- Stebbin G. L., 1957:** Chromosomal evolution in higher plant. Univ Press. New York. Columbia. p 643

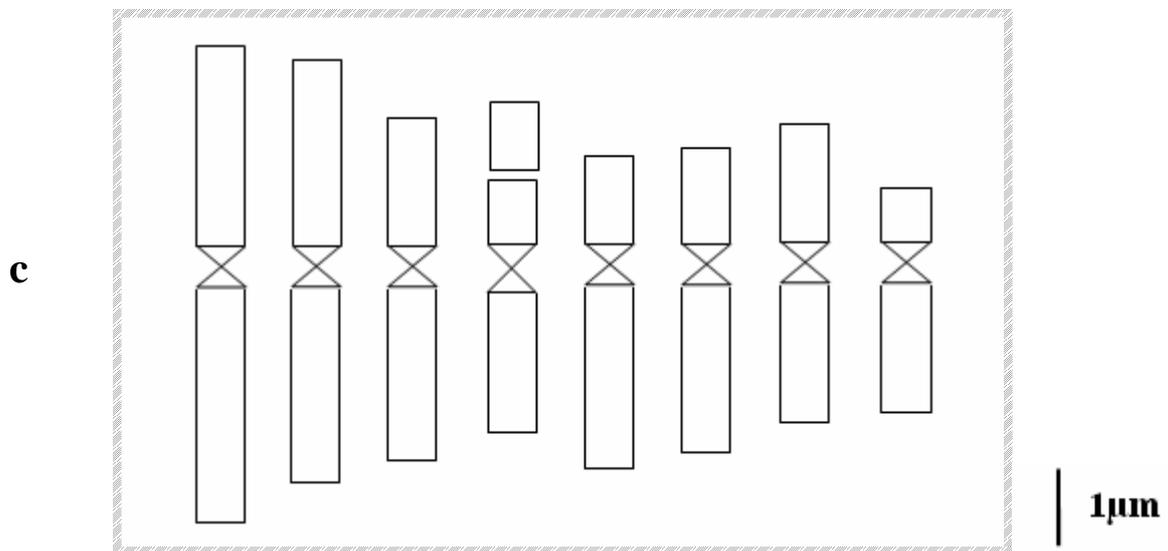
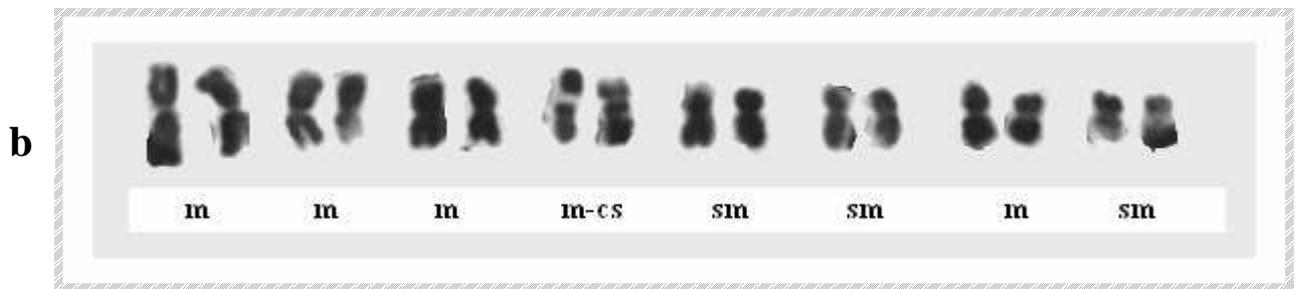
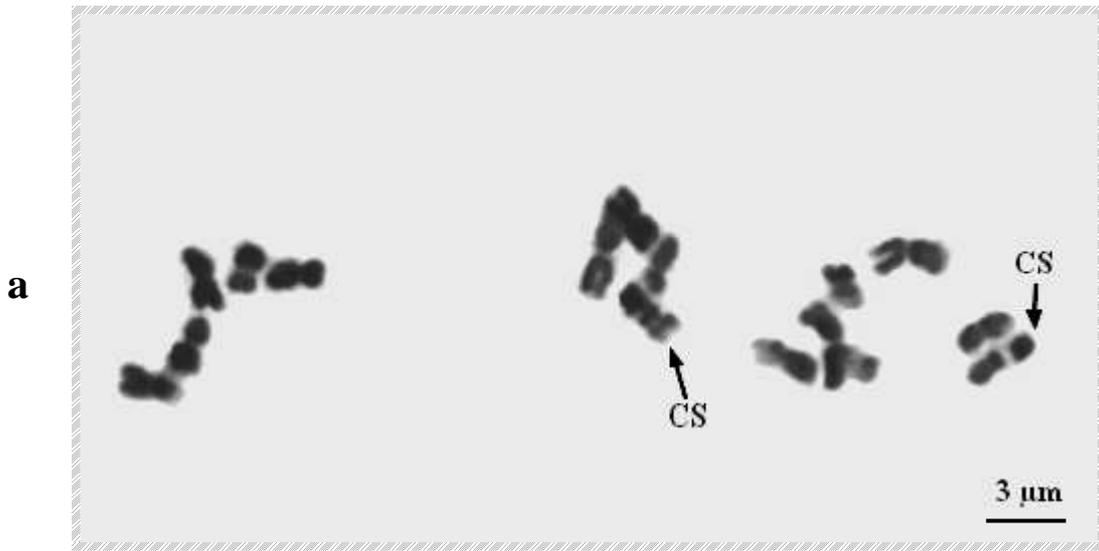


**Van Gansan P., Alexander M., 1997:** Biologie cellulaire. 4eme édition. Masson. p 485.

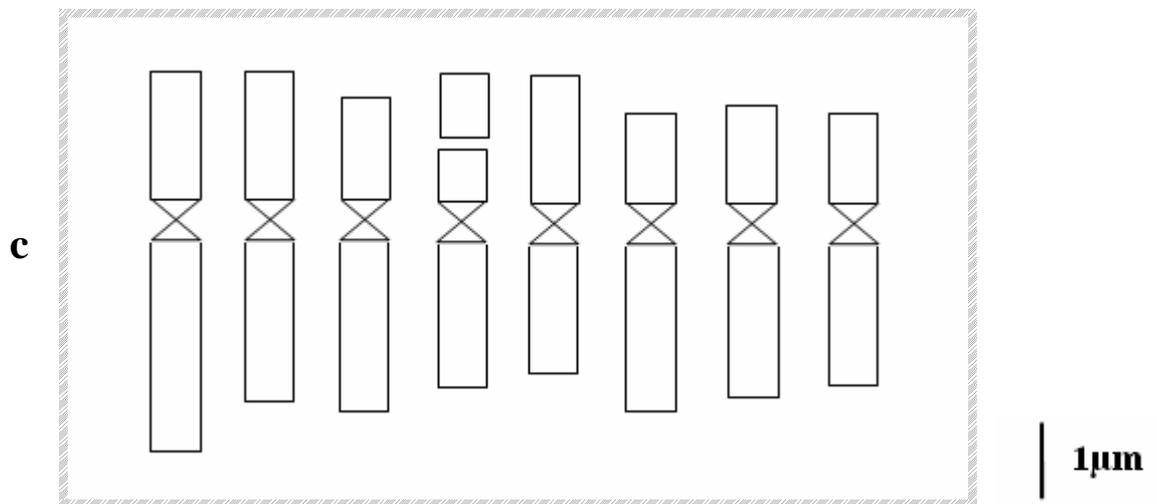
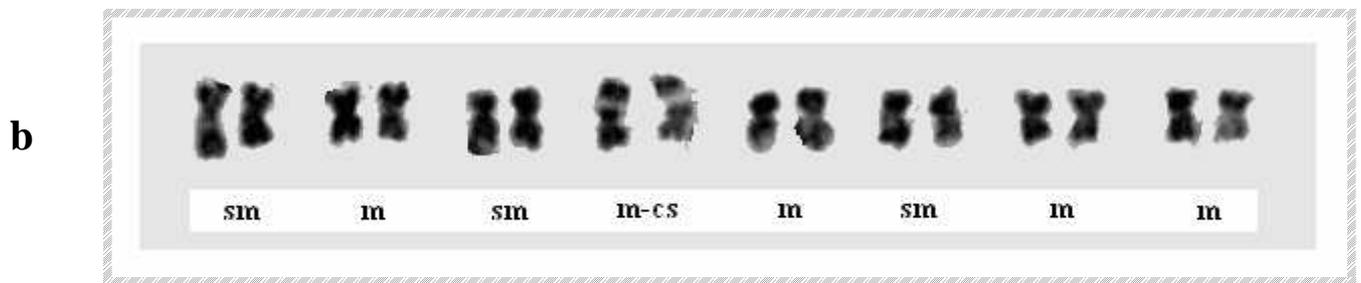
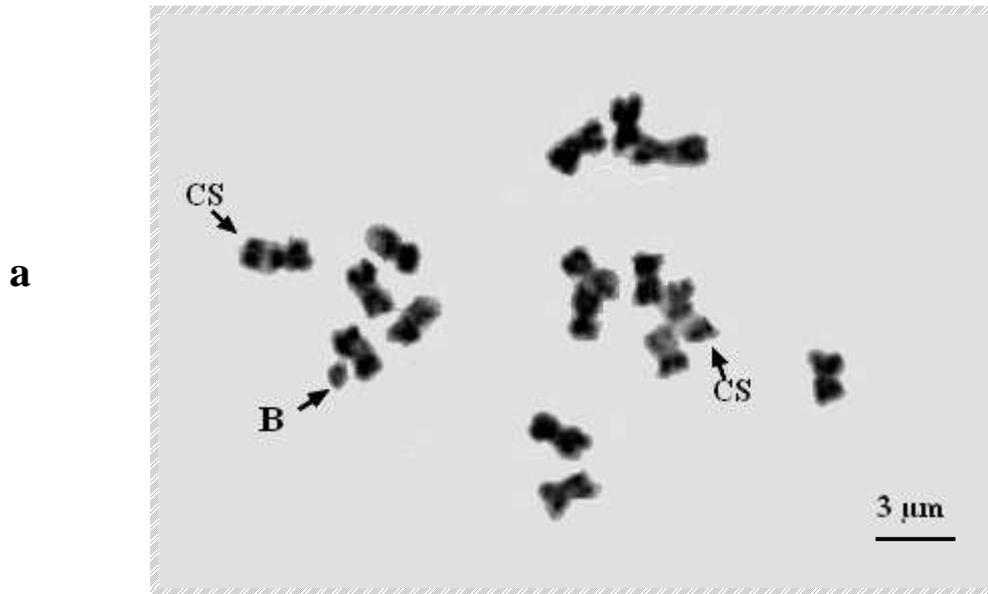
**Yahia N., Fyad-Lameche F. Z., 2003:** Évaluation de la variabilité de jeunes plants de *Medicago* soumis à un régime de basse température. Acta Bot. Gallica. Vol 150. N°1 : 3-17.

# Planches

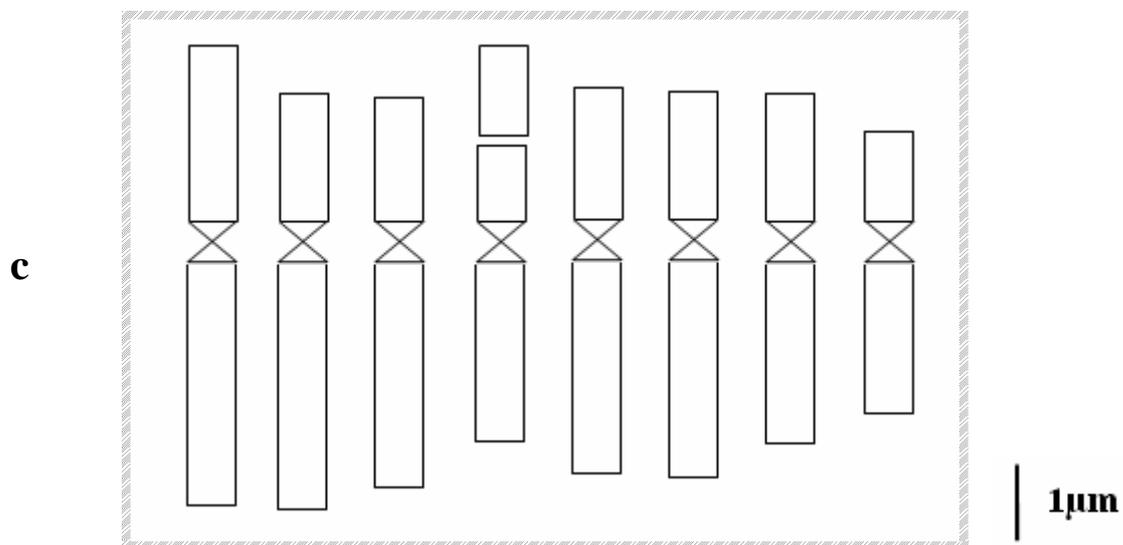
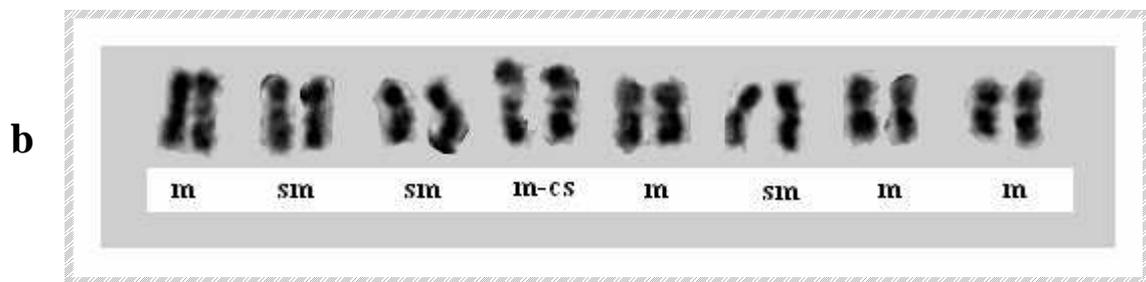
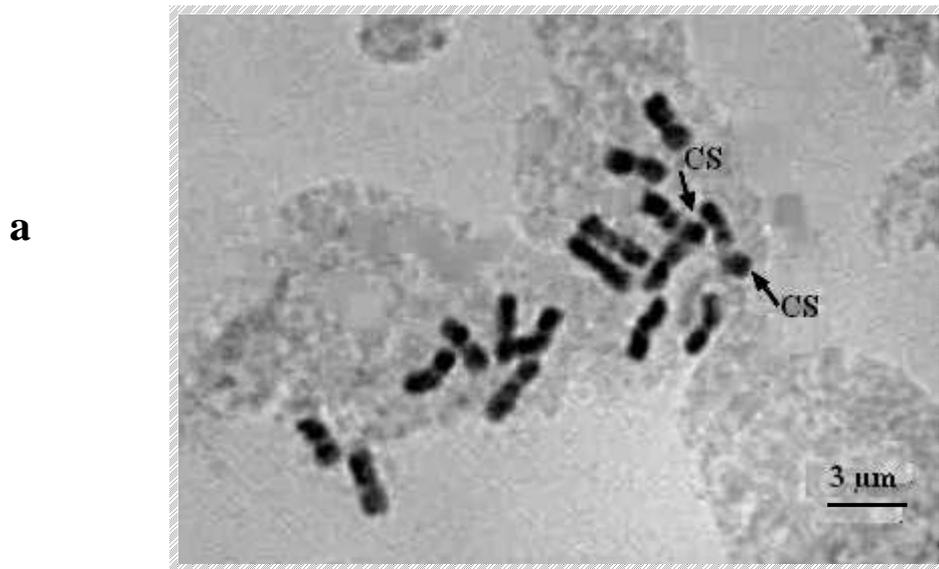
*Medicago intertexta*



**Planche 1 :** Caryotype de la population 1 de *M. intertexta*  
**a :** Plaque métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.



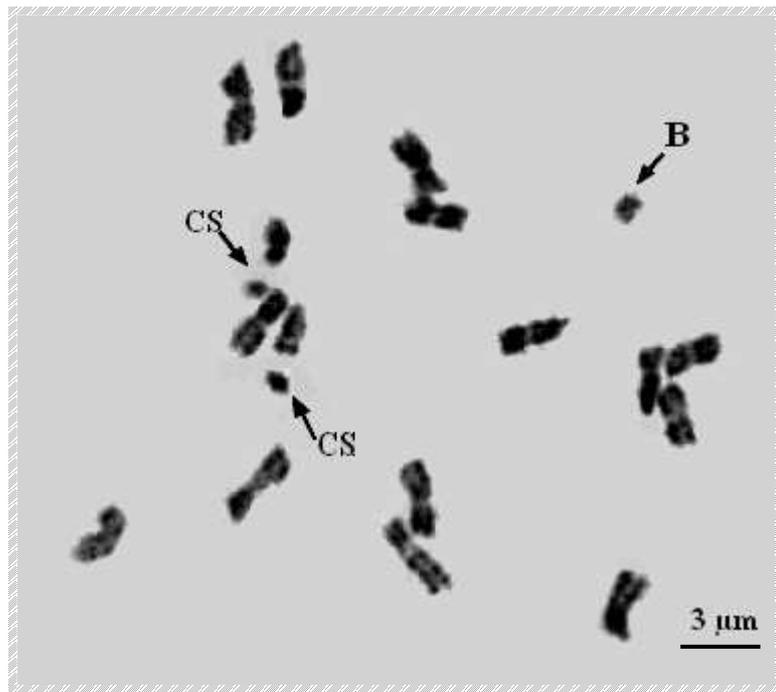
**Planche 2 :** Caryotype de la population 3 de *M. intertexta*.  
**a :** Plaqué métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.



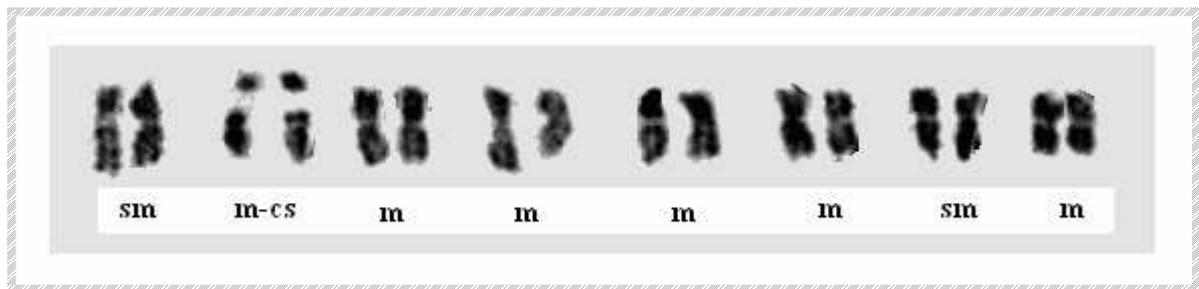
**Planche 3 :** Caryotype de la population 7 de *M. intertexta*.  
**a :** Plaque métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.

*Medicago ciliaris*

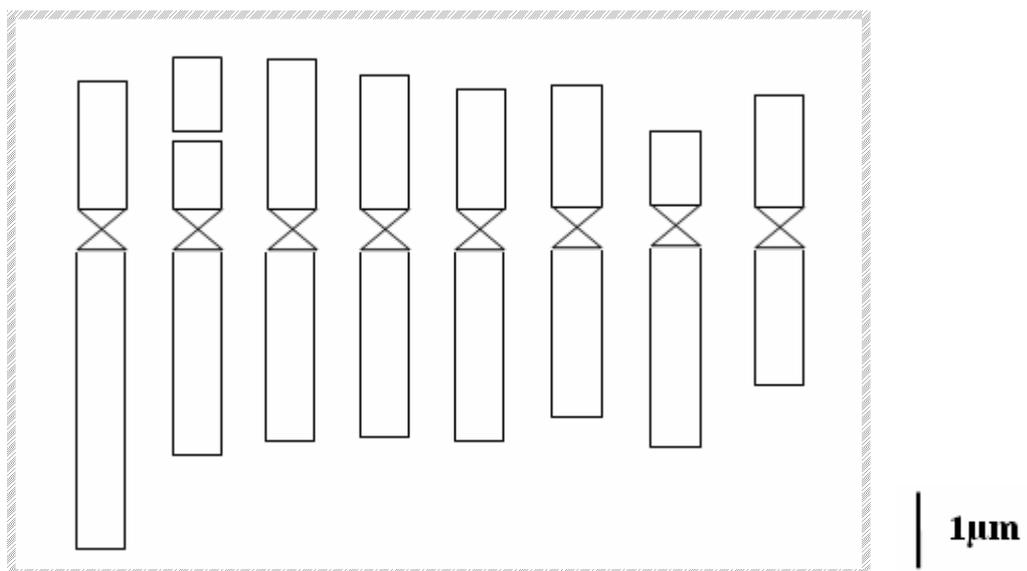
**a**



**b**

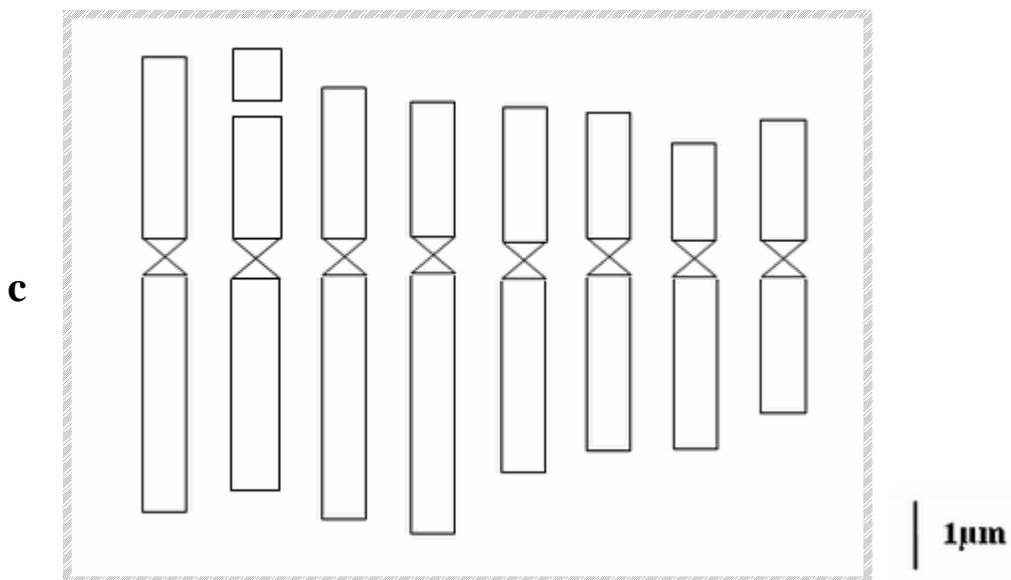
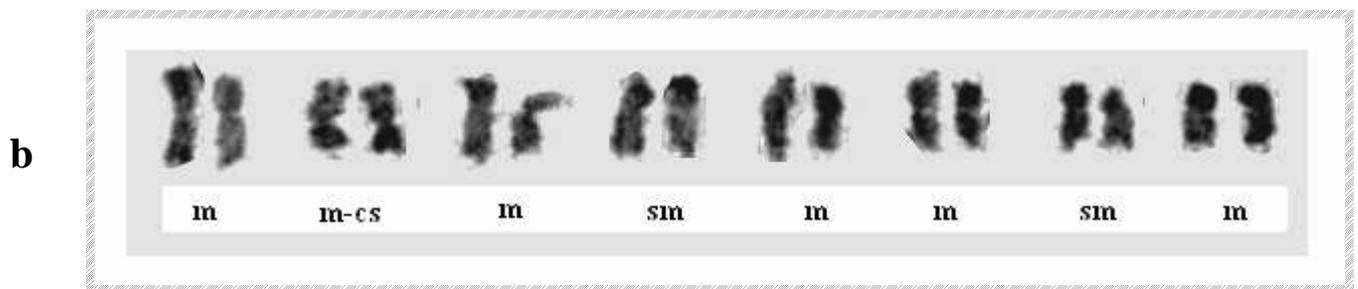
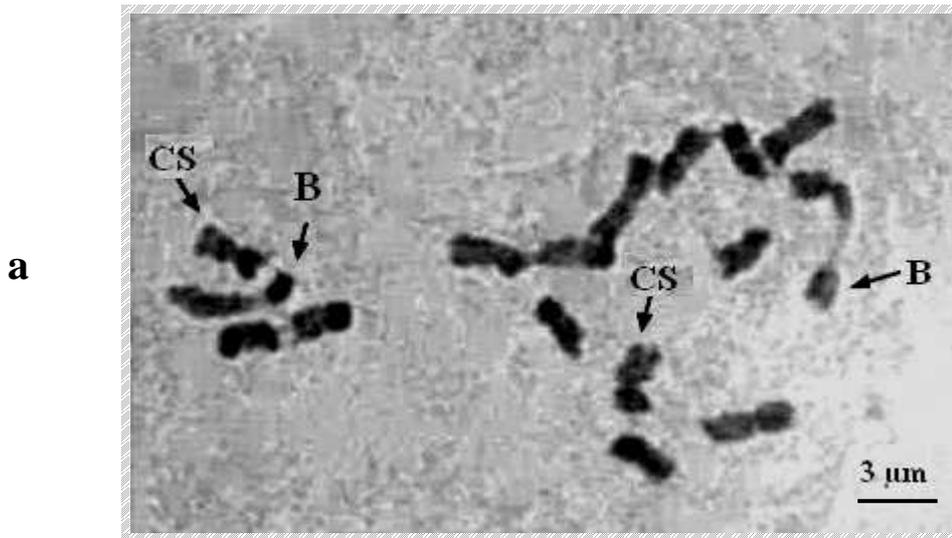


**c**



**Planche 4 :** Caryotype de la population 4 de *M. ciliaris*.

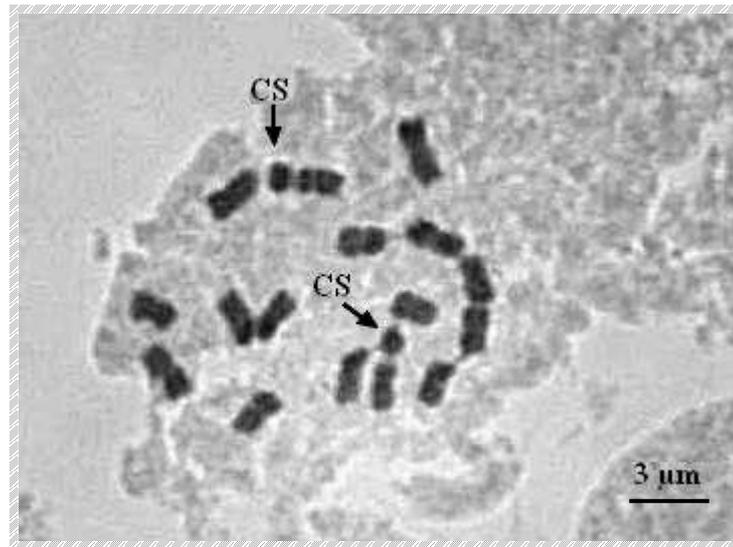
**a :** Plaque métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.



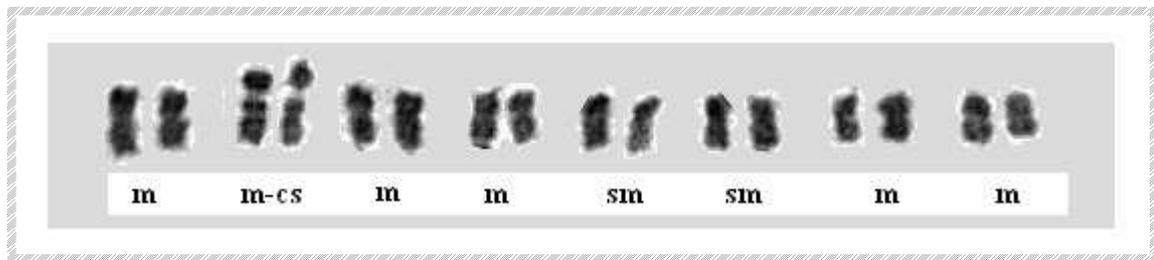
**Planche 5 :** Caryotype de la population 6 de *M. ciliaris*.

**a :** Plaque métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.

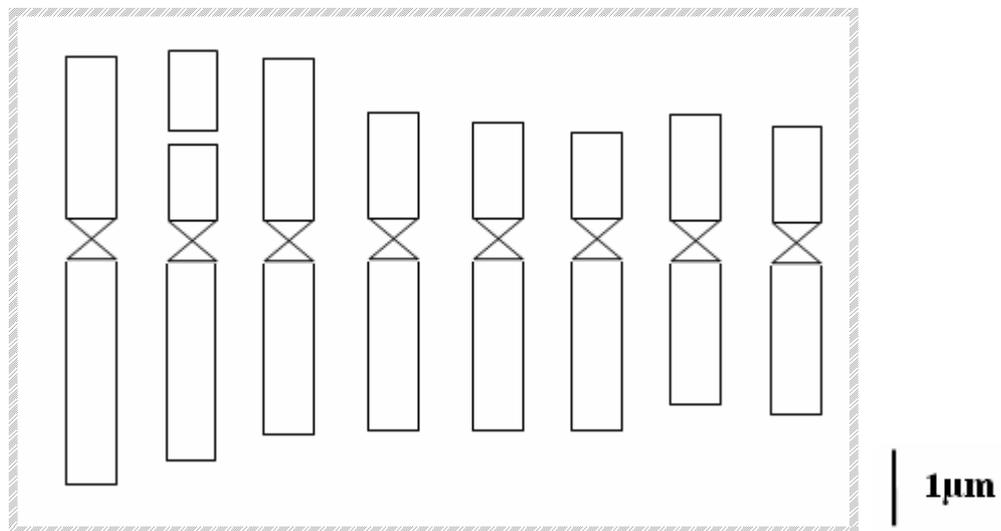
**a**



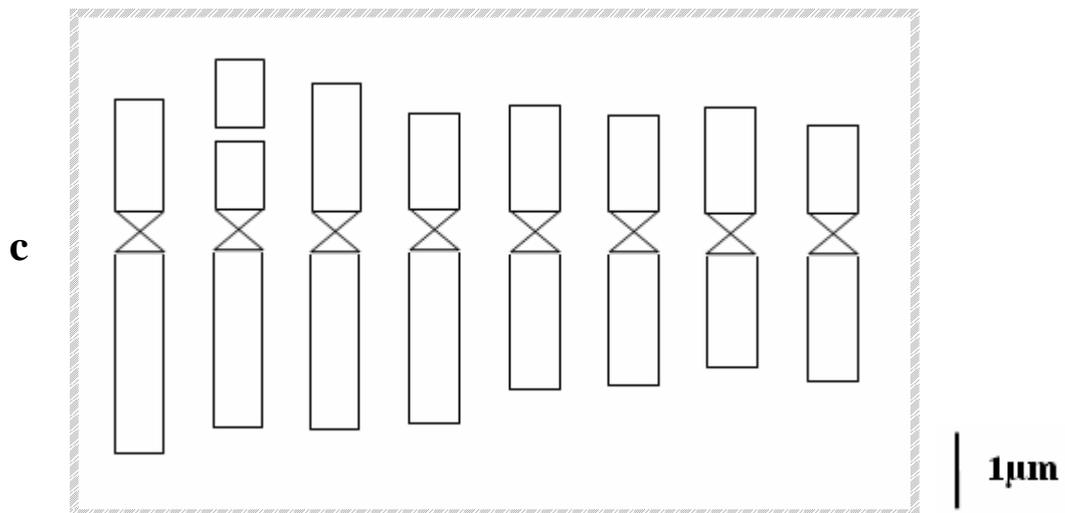
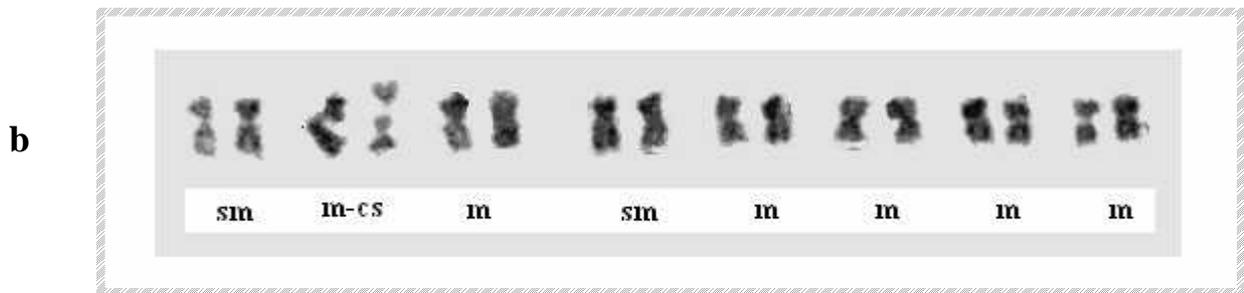
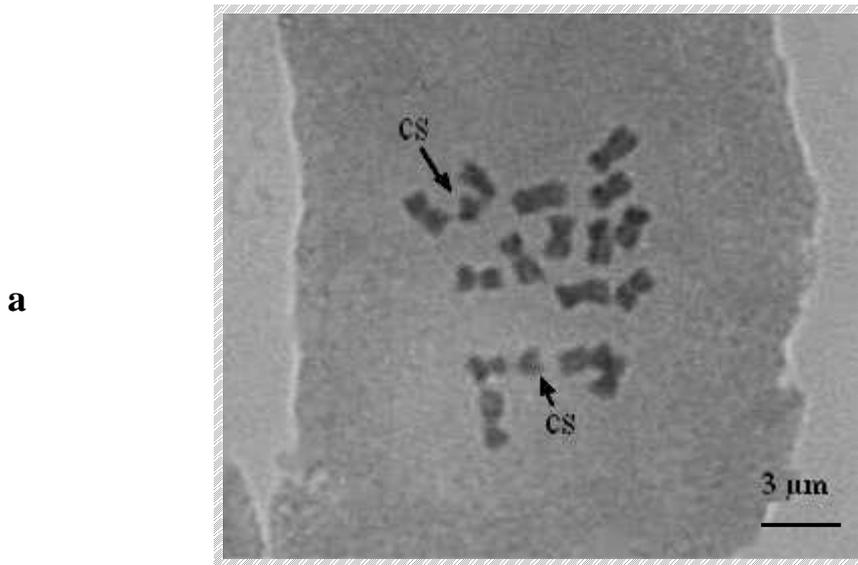
**b**



**c**



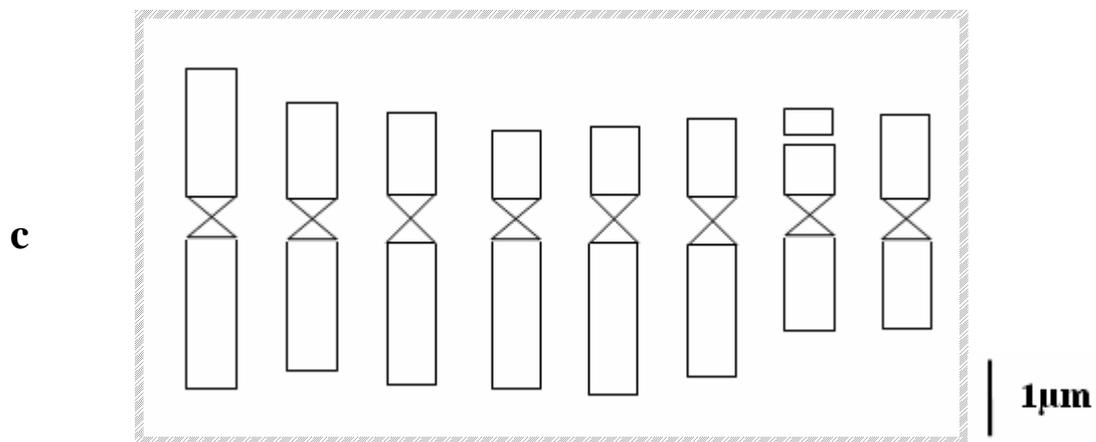
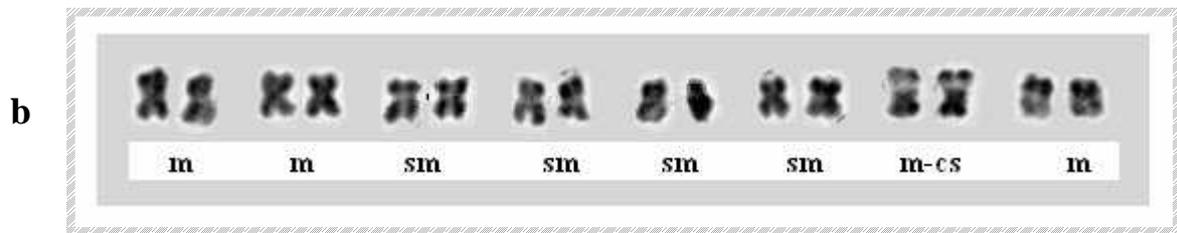
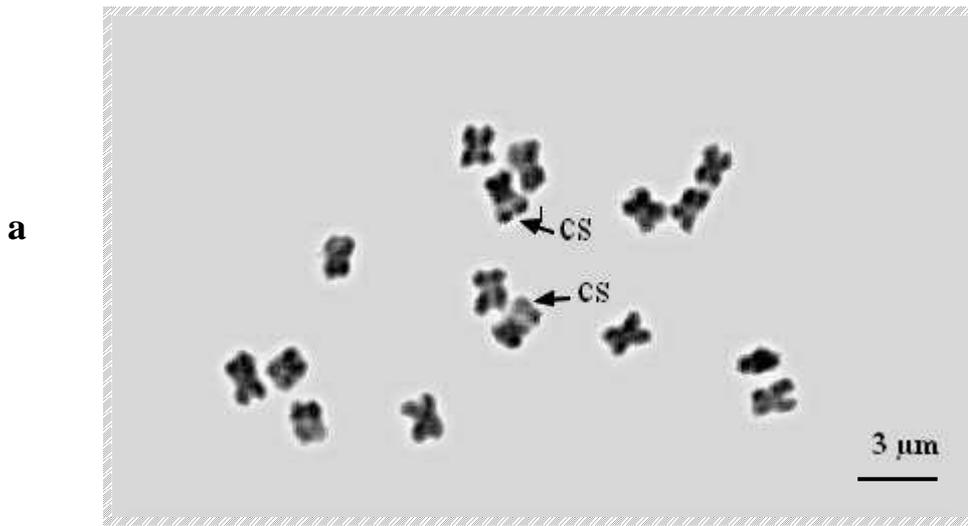
**Planche 6 :** Caryotype de la population 12 de *M. ciliaris*.  
**a :** Plaque métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.



**Planche 7 :** Caryotype de la population 15 de *M. ciliaris*.

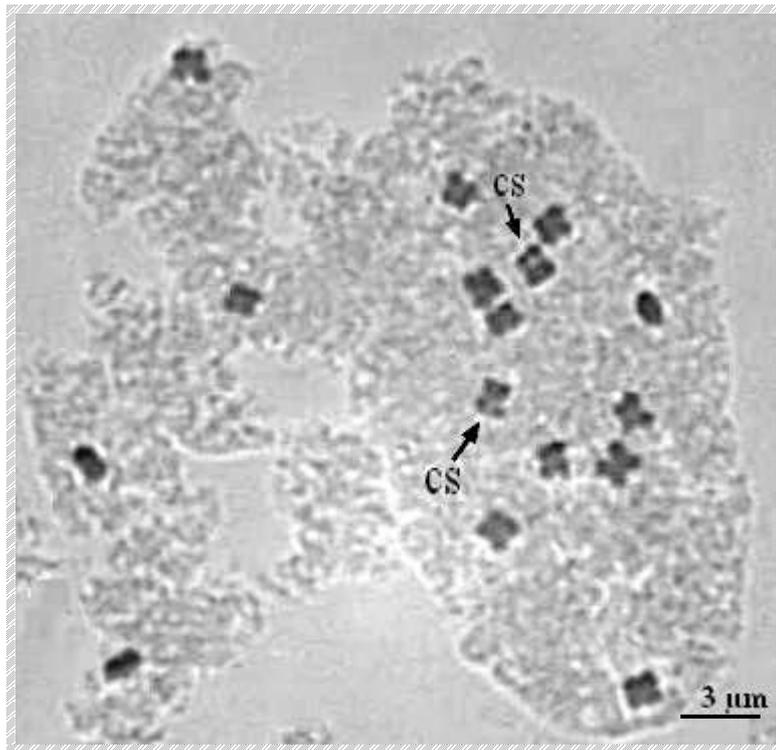
**a :** Plaques métaphasiques ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.

*Medicago granadensis*



**Planche 8 :** Caryotype de la population 2 de *M. granadensis*.  
**a :** Plaqué métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.

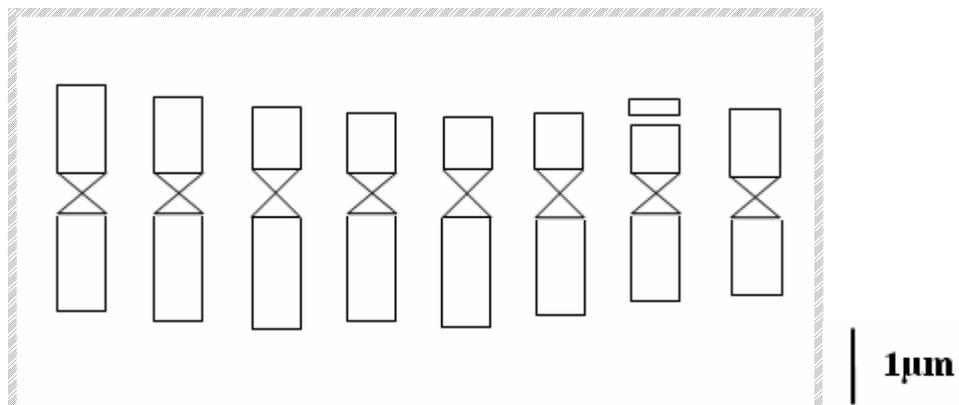
**a**



**b**

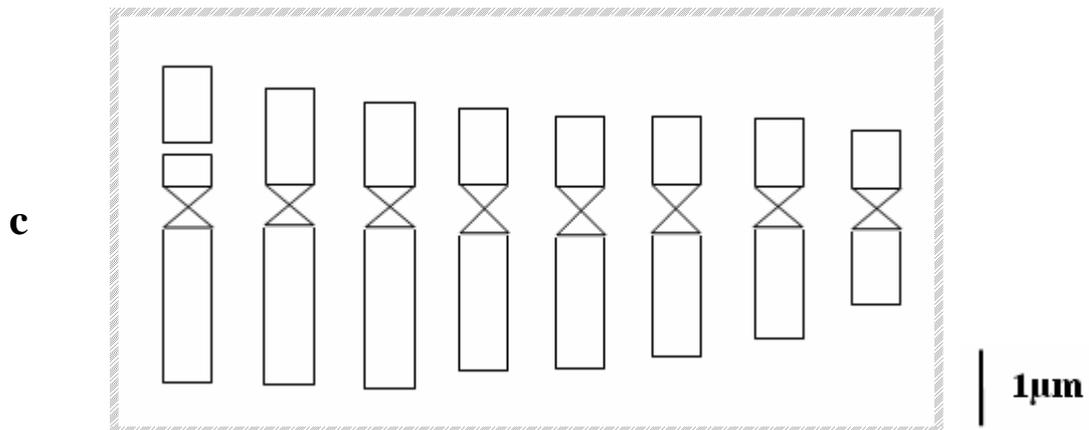
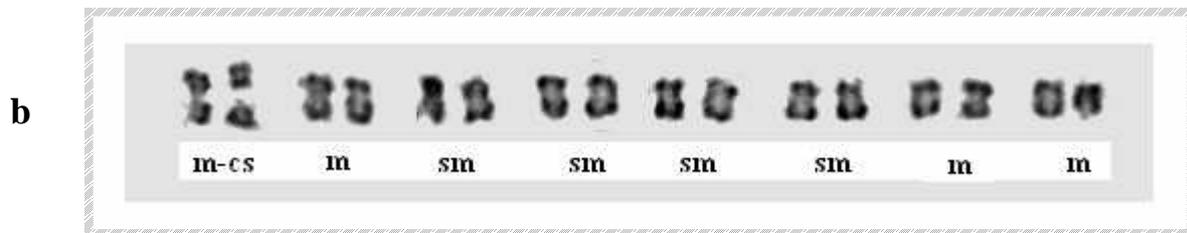


**c**



**Planche 9 :** Caryotype de la population 8 de *M. granadensis*.

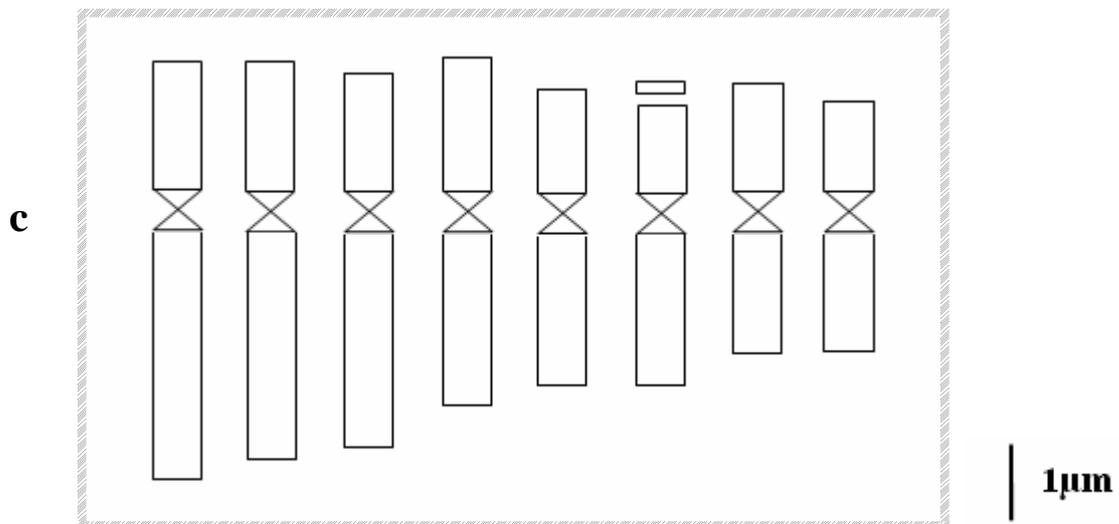
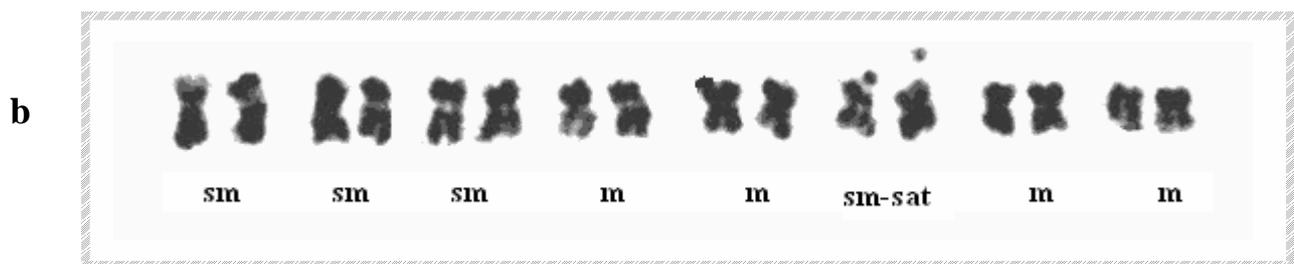
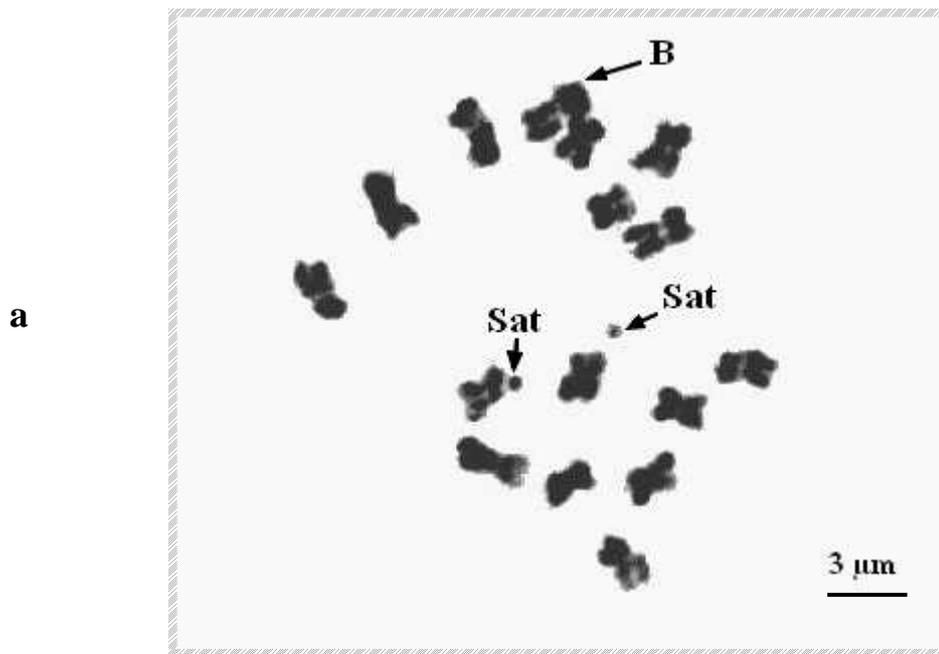
**a :** Plaque métaphasique ; **b :** Caryogramme ; **c :** Idiogramme.



**Planche 10** : Caryotype de la population 11 de *M. granadensis*.

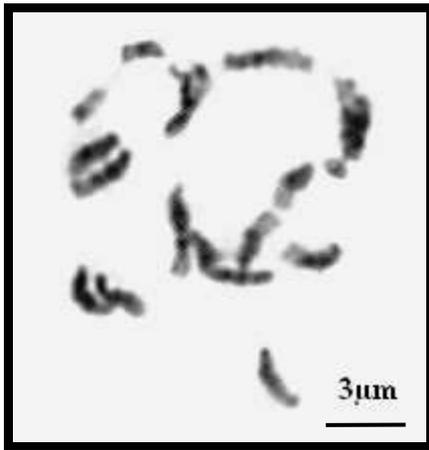
**a** : Plaque métaphasique ; **b** : Caryogramme ; **c** : Idiogramme.

*Medicago muricoleptis*

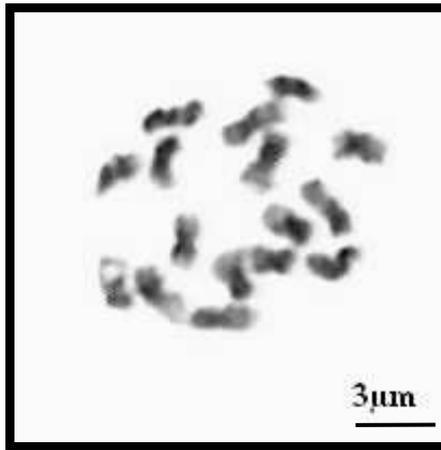


**Planche 11** : Caryotype de la population 10 de *M. muricoleptis*.

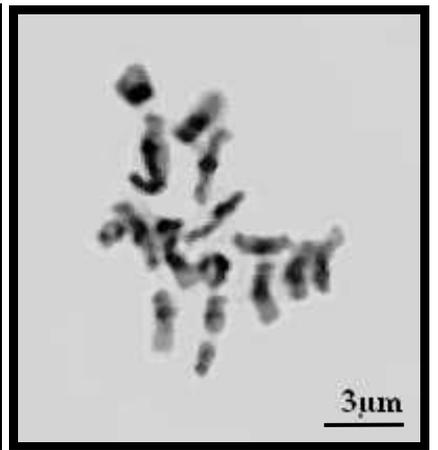
**a** : Plaques métaphasiques ; **b** : Caryogramme ; **c** : Idiogramme.



a



b



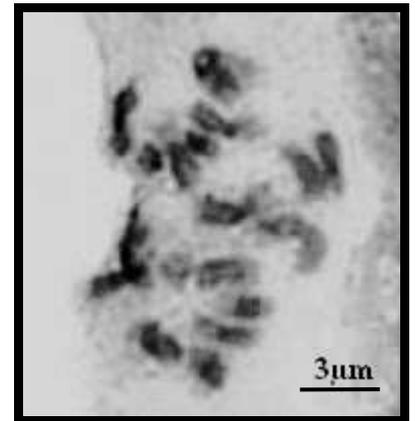
c



d



e

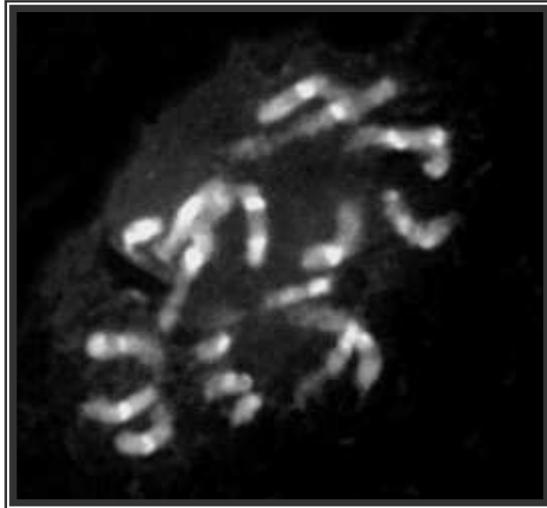


f

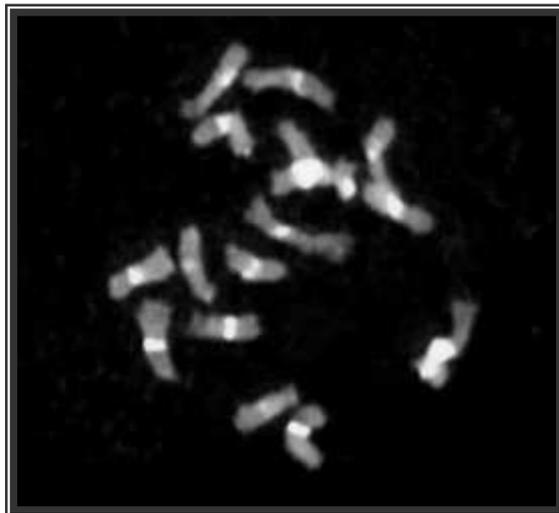
**Planche 12** : Coloration au Giemsa « C-banding ».

a, b, c : *M. granadensis*; d : *M. ciliaris*; e : *M. muricoleptis*; f : *M. intertexta*

**a**

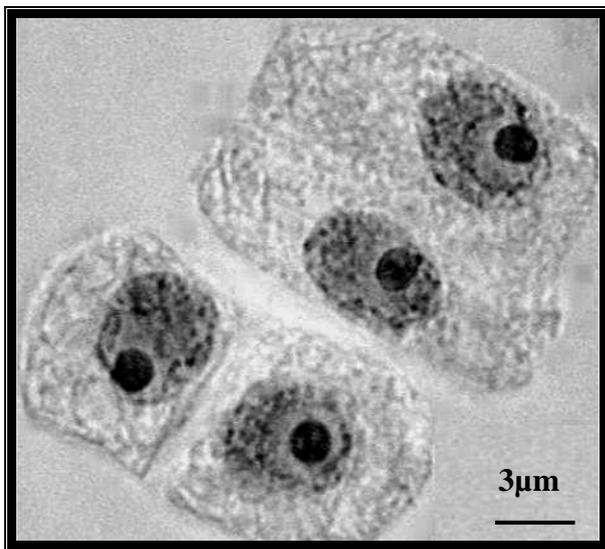


**b**

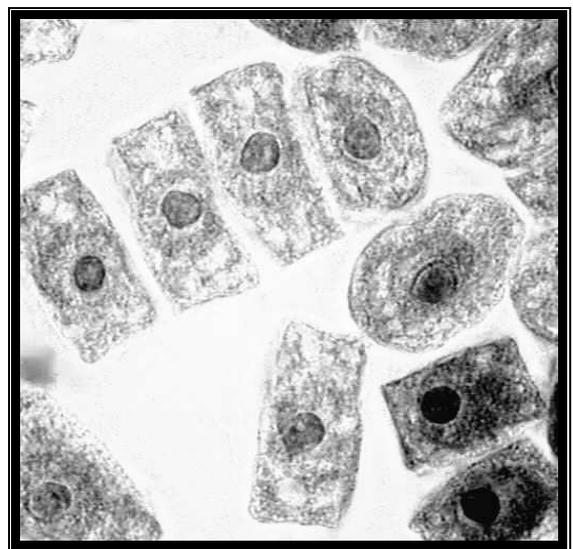


**Planche 13:** Chromomycine banding.

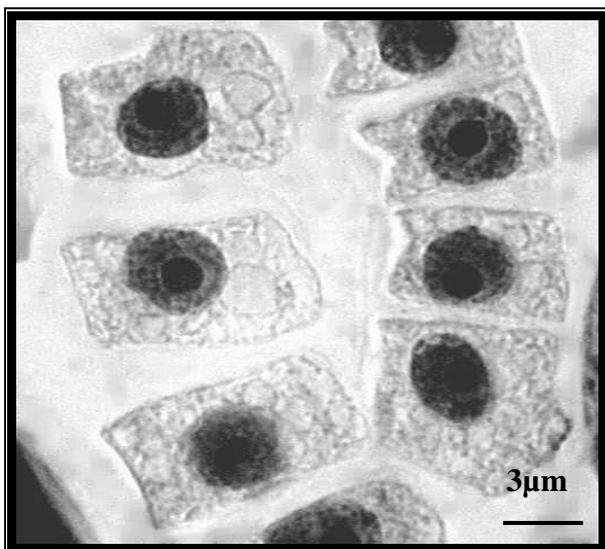
a : *M. intertexta*; b : *M. muricoleptis*



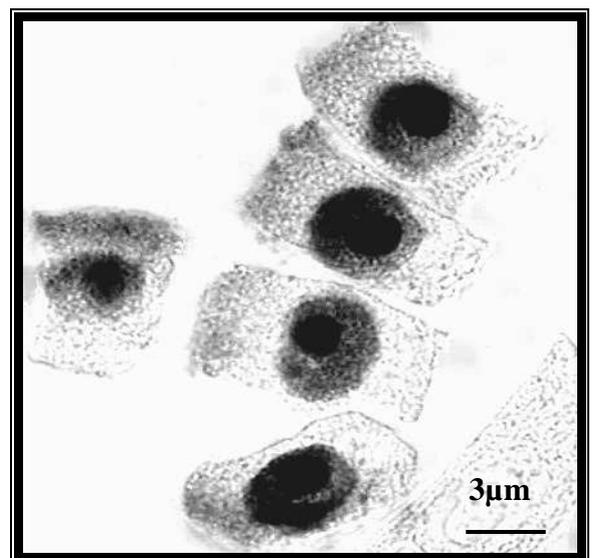
a



b



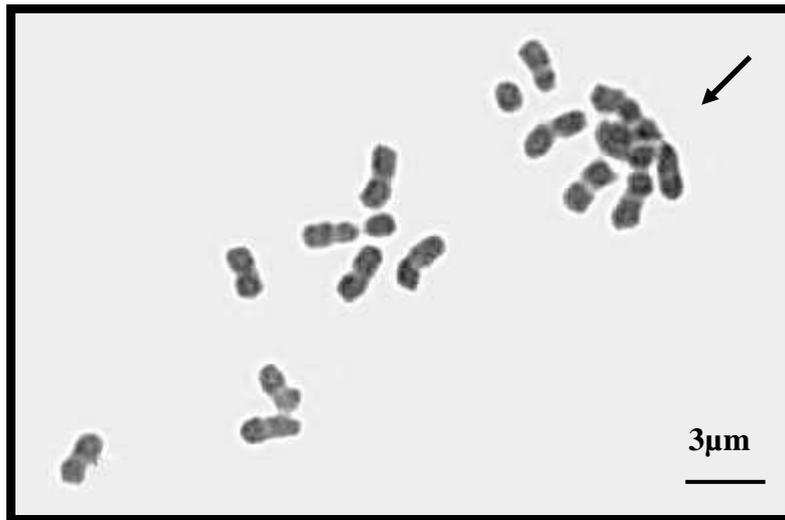
c



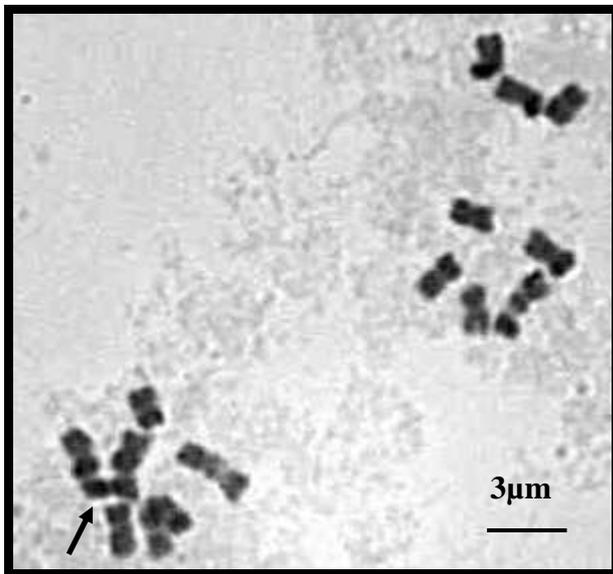
d

**Planche 14** : Nucléoles colorés aux nitrates d'argent.

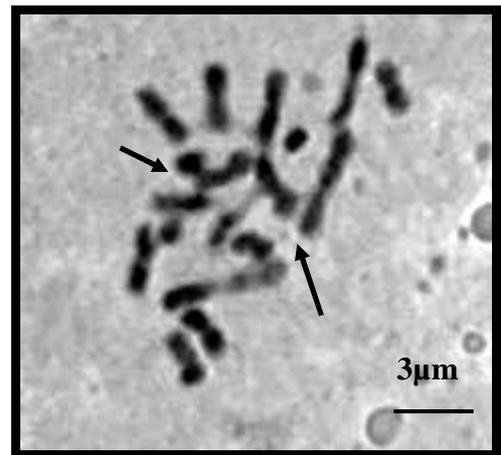
a : *M. intertexta*; b : *M. ciliaris*; c : *M. granadensis*; d : *M. muricoleptis*



a



b



c



d

**Planche 15** : Liaisons interchromosomiques.

a, b : *M. ciliaris*; c : *M. intertexta*; d : *M. muricoleptis*

# **Annexe**



# *Préparation des solutions utilisés*

## **Préparation du tampon Mc ILvain**

Solution mère : 0.21g acide acétique dans 10ml H<sub>2</sub>O ..... (A)

1.78g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O ..... (B)

Pour une solution McILvain pH 7 : (43.6ml de B + 6.5ml de A) + H<sub>2</sub>O distillé = 100ml au total.

## **Préparation de la chromomycine A3**

- La chromomycine est une poudre jaune très toxique à préparer 1 jour à l'avance dans du tampon Mc Ilvain PH7 + 10ml MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O

- On prépare 2 mg de CMA<sub>3</sub> pour 10ml de solution

## **Préparation de l'enzyme R**

Tampon citrate 0.05 M                      10ml      pH = 4.5

Pectolyase y.23                              0.1g      50 ml

Hemicellulase (sigma)                      0.4g

Cellulase                                        2g

## **Préparation de l'acéto-orcéine**

- Solution mère d'orcéine (solution de conservation) dissoudre par ébullition ménagée 2.2 g d'orcéine dans 100 ml d'acide acétique glacial, laisser refroidir, agiter et filtrer.

- Solution standard à 1 %

La dilution se fait au moment de l'emploi : 4.5 ml de solution mère, 5.5 ml d'eau distillé.

**Préparation de 8 hydroxy-quinoléine 0.002mol / litre**

- 0.03 g de la 8 hydroxy-quinoléine dans 100ml d'eau distillée.

**Préparation de l'éthanol acétique**

- On prend 3 volumes d'éthanol pour un volume d'acide acétique

**Préparation de HCl 1 N :**

- Prendre HCl fumant, PM = 36.46 g/l, d = 1.18, HCl : 37%

$$P / v = d \quad \longrightarrow \quad v = p / d = 36.46 / 1.18 = 30.63\text{ml/l}$$

Soit :  $30.36 \times 100 / 37 = 82.78$  ml dans 1litre



## **Résumé**

Une étude caryologique détaillée de quatre espèces diploïdes de la section *Intertextae* du genre *Medicago* est réalisée à l'aide des techniques de cytogénétiques classiques (coloration à l'acéto-orceine, la coloration différentielle au Giemsa et la coloration aux nitrates d'argent AgNO<sub>3</sub>) et du fluochrome banding. Les résultats obtenus confirment le niveau de ploïdies de cette section qui est  $2n = 2x = 16$  avec un nombre de base  $x = 8$ . L'établissement du caryotype chez les quatre taxons diploïdes a mis en évidence la présence de deux types chromosomiques submétacentriques et métacentriques. Nous avons également observé la présence de chromosomes B et des liaisons interchromosomiques. La coloration différentielle au Giemsa a démontré l'existence d'hétérochromatine constitutive localisée dans les régions centromérique, intercalaire et télomérique. La coloration à la chromomycine A3 chez *M. intertexta* et *M. muricoleptis* révèle des bandes riches en GC localisées principalement dans les centromères et les télomères, les régions des organisateurs nucléolaires montrent des signaux CMA+. La coloration aux nitrates d'argent a permis de détecter un nombre de nucléoles variant de 1 à 2 avec une majorité de 1 nucléole par cellule ce qui indique qu'il y a un site actif.

### **Mots clés:**

*Medicago intertexta*, *Medicago ciliaris*, *Medicago granadensis*, *Medicago muricoleptis*, Hétérochromatine, Caryotype, Acéto-orceine, C-banding, chromomycine A3, Organisateurs nucléolaires (NORs)



## **Summary**

The karyological study of four diploids species witch comprises the *Intertextae* section of the genus *Medicago* has been carried on the basis of classical cytogenetic (method of orcein, C-banding, AgNO<sub>3</sub> nucleolus staining ) and fluochrom banding (chromomycin A3 witch map repeated sequences GC). Coloration with orcein revealed that all species were found to have  $2n = 2x = 16$  chromosomes. This karyotyps are composed of metacentrics pairs and submetacentrics pairs. We also observed the presence of B chromosomes and connections interchromosomes. Coloration with Geimsa (c-banding) has revealed the existence of constitutive heterochromatin localized in regions centromeric, telomeres and intercalated. The coloration with the chromomycin A3 at *M. intertexta* and *M. muricoleptis* has revealed bands rich in GC, localised essentially in the centromères and at the telomeres. Regions of the NORs shows signals CMA +. The nitrates coloration allowed to detect a number of nucleolus vary from 1 to 2 with a majority of 1 nucleolus by cell what indicates that there is an active site

## **Key words:**

*Medicago intertexta*, *Medicago ciliaris*, *Medicago granadensis*, *Medicago muricoleptis*, Heterochromatin, Orcein staining, C-banding, ChromomycinA3, The nucleus organizing regions (NORs).



## ملخص

أنجزت الدراسة الكاربيولوجية التفصيلية لأربعة أصناف من نوع *Medicago* :

*Medicago intertexta*, *Medicago ciliaris*, *Medicago granadensis*, *Medicago muricoleptis*

استعملت من اجل ذلك طرق التلوين الكلاسيكية: Acéto-orceine , C-banding الذي يلون الأشرطة الغنية بالقواعد GC ,

نترات الفضة و طرق البيولوجيا الجزيئية : (CromomycineA3) fluochrom banding

اظهر التلوين باستعمال Acéto-orceine أن النمط الصبغي للأربعة الأصناف المدروسة انه يتكون من نوعين من أزواج

الكروموزومات: métacentriques و submetacentriques. كما لاحظنا أيضا وجود كروموزومات إضافية من نوع B

و روابط بين هاته الكروموزومات.

إن استعمال طريقة التلوين بـ « C-banding » Geimsa أظهرت وجود أشرطة أل hétérochromatine : متوضعة أساسا

في وسط الصبغي في المناطق النهائية و هناك من نجده بينهما.

التلوين بواسطة chromomycineA3 اثبت وجود أشرطة غنية بالقواعد المتكررة GC المتوضعة أساسا في المناطق المتوسطة و

النهائية للصبغيات

التلوين بنترات الفضة اظهر عدد النويات الذي يتراوح بين واحد و اثنان مع أغلبية وجود نوية واحدة في كل خلية, وان مواقع

NORs نشطة بالنسبة لأربعة الأصناف

## الكلمات المفتاحية:

*Medicago intertexta*, *Medicago ciliaris*, *Medicago granadensis*, *Medicago muricoleptis*, الكروماتين،

نمط صبغي، التلوين بـ Aceto-orceine ، التلوين بـ chromomycineA3، التلوين بنترات الفضة.