

ABRÉVIATIONS

ABA: Abscisic acid
APX: Ascorbate peroxydase
ARNm (ou mRNA) : Acide ribonucléique messenger
ASC : Ascorbate
BET : Bromure d'éthidium BSA : Sérum albumine bovine.
Cm: Centimètre
CTAB: Cetyl Trimethylammonium Bromide
CTE = Chaîne de Transport d'Electrons
DREB : Dehydration responsive element binding protein
DTT: Dithiotreitol
DHA : Dehydroascorbate
DW : Poids sec
dNTP : Mélange équimolaire de désoxyribonucléotides triphosphate
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
EST-SSR: Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat
Fd : ferredoxine
Fd ox : Ferrédoxine oxydée
Fd red : Ferrédoxine réduite
FeSOD : SOD à fer
FGP : Pourcentage final de germination
FW : Matière fraîche
GSH: Glutathion réduit
GSSG: Glutathion oxydé
GPX : Guaiacol peroxydase
Hi: Genetic diversity at each locus.
HSPs : heat shock proteins
I.T: Indice de tolérance
LEAs : Late embryogenesis abundant proteins
LG: Linkage Group
nm : Nanomètre
NAD (P) = Nicotinamide Adenine Dinucléotide phosphate
NADH (P) = Nicotinamide Adenine Dinucléotide réduite phosphate
pb : paire de bases
PCR : Polymerase chain reaction (ou réaction de polymérisation en chaîne)
PM : Poids moléculaire
PL : RL: Ratio (tige / racine)
PL : Longueur de la tige
PIC: Polymorphism information content
RL : Longueur de la racine
ROS: Espèce réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
rpm : Tours / minute
RubisCO : Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase
SDS-PAGE: Electrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en milieu SDS
SDS : Dodécyl sulfate de sodium
SL : Longueur de la plantule
SV: Vigueur des grains
SPC: Contenu en protéines de réserves des graines
SDW: Poids des graines sèches.
UPGMA: (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means)
WC : Contenu en eau
 Ψ_w : Potentiel hydrique des racines

LISTES DES TABLEAUX

- Tab 1 : ANOVA à un facteur de l'effet du stress salin sur les différents paramètres de développement des jeunes plants chez les génotypes de *M. truncatula*
- Tab 2 : ANOVA à deux facteurs de l'effet du stress salin sur les différents paramètres de développement des jeunes plants chez les génotypes de *M. truncatula*
- Tab 3 : Classification des moyennes des différents niveaux des stress salin sur les différents paramètres de développement chez *M. Truncatula*.
- Tab 4 : Matrice des distances entre les génotypes de *M. truncatula* sous différents niveaux de stress salin pour le ratio (Tige /Racine).
- Tab 5 : Matrice des distances entre les génotypes de *M. truncatula* pour la teneur en protéines de réserves.
- Tab 6 : Coefficients de corrélation (r) entre différents paramètres de développement des jeunes plants sous différentes concentrations des salinité, poids des graines sèches et la teneur en protéines de réserves chez *M.truncatula*.
- Tab 7 : Nombre et le type de bandes de la diversité génétique chez les quatre génotypes de *Medicago truncatula*
- Tab 8 : Matrice de similarité basée sur le coefficient de Jaccard pour les protéines de réserves des graines chez les génotypes de *M. Truncatula* .
- Tab 9 : Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs de l'effet traitement, génotype et leurs interaction pour les paramètres : taux de germination et indice de tolérance, poids frais et teneur en protéines des jeunes plants.
- Tab 10 : Résultats d'analyse de variance à deux facteurs. 1. Effet traitement (stress salin). 2. Effet génotype. 3. Effet interaction sur les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques au niveau racinaire.
- Tab 11 : Résultats obtenus de l'effet du stress salin sur les paramètres biochimiques (protéines solubles, activité GPX, pools : ASC+DHA et GSH+GSSG) au niveau racinaire.
- Tab 12 : Informations sur les écotypes de *Medicago truncatula* étudiés.
- Tab 13 : Caractéristiques et résultats obtenus sur le polymorphisme des marqueurs microsatellites EST-SSR utilisés pour l'analyse génétique des 11 écotypes de *M. truncatula*.
- Tab 14 : Résultats obtenus sur le polymorphisme des bandes amplifiées pour chaque marqueur EST-SSR utilisés chez les différentes accessions de *M. truncatula*.
- Tab 15 : Corrélation entre les différents paramètres étudiés sur l'ensemble des amorces (loci EST-SSR).
- Tab 16 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (MTIC044) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*.
- Tab 17 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (MTIC 124) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*.
- Tab 18 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (MTIC 077) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*
- Tab 19 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (MTIC 335) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*.
- Tab 20 : Matrice de similarité génétique pour les quatre loci EST-SSR basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*
- Tab 21 : Résumé de résultats de 87 échantillons d'ADN à partir de jeunes plants de *M. truncatula*
- Tab 22 : Concentrations de ASC, DHA, GSH, GSSH, (ASC+DHA) et (GSH+GSSH) Pools, ASC/ASC+DHA et GSH/GSH+GSSH Ratios au niveau racinaire chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula* sous différents traitements de NaCl.

LISTE DES FIGURES

- Fig 1 : Classification des légumineuses de la famille des Papilionoideae (Zhu *et al.* 2005)
- Fig 2 : Fleurs, feuilles, gousses et grains chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula Gaertn.*
- Fig 3 : Structure de la graine chez *Medicago truncatula*
- Fig 4 : Représentation schématique des réponses moléculaires à la sécheresse dans une cellule végétale (Yamaguchi-Shinozaki, 2002).
- Fig 5 : Gènes induits par le stress hydrique et leur fonction possible dans la réponse à la tolérance au stress osmotique (Yamaguchi-Shinozaki, 2002).
- Fig 6 : Représentation schématique des principales voies de signalisation majeures et principaux produits de transcription chez les plantes en réponse au stress osmotique (Diop, 2002).
- Fig 7 : Formes redox de l'ascorbate (Potters *et al.*, 2002).
- Fig 8 : Oxydation de deux molécules de GSH conduisant à l'établissement d'un pont disulfure et la formation de GSSG.
- Fig 9 : Cycle Asada-Halliwell-Foyer (Potters *et al.* 2002).
- Fig 10 : Vigueur des grains des différents génotypes de *M. truncatula* sous différentes condition de stress salin.
- Fig 11 : Valeurs moyennes du ratio (Tige / racine) chez les différents génotypes de *M. truncatula* sous différentes concentrations de stress salin
- Fig 12 : Analyse des groupes des génotypes de *M. Truncatula* sous différentes concentrations de salinité pour le paramètre ratio (Tige /Racine).
- Fig 13 : Poids des graines sèches des différents génotypes de *M. truncatula*.
- Fig 14 : Teneur en protéines de réserves chez les différents génotypes de *M. truncatula*
- Fig 15 : Analyse des groupes des génotypes de *M. Truncatula* pour la teneur en protéines de réserves.
- Fig 16 : Relation entre la longueur de la Racine (RL) et le poids des graines sèches (SDW) sous différentes concentration en stress salin chez les génotypes de *M.truncatula*.
- Fig 17 : Relation entre la teneur en protéines de réserves (SPC) et le poids des graines sèches (SDW) chez les génotypes de *M.truncatula*.
- Fig 18 : Relation entre la teneur en protéines de réserves (SPC) et la longueur de la racine (RL) chez les génotypes de *M.truncatula* .
- Fig 19 : Profiles des protéines de réserves chez les quatre génotypes de *M. truncatula*.
- Fig 20 : Dendrogramme (UPGMA) basé sur les profiles protéiques des protéines de réserves chez *M. Truncatula*.
- Fig 21 : Résultats du taux de germination des deux génotypes de *M. truncatula* (Tru 131, tolérant et *Jemalong*, moins tolérant) sous l'effet NaCl
- Fig 22 : Indice de tolérance des deux génotypes de *M. truncatula* (Tru 131, tolérant et *Jemalong*, moins tolérant) sous l'effet NaCl.
- Fig 23 : Poids frais des jeunes plants des deux génotypes de *M. truncatula* (Tru 131, tolérant et *Jemalong*, moins tolérant) sous l'effet NaCl.
- Fig 24 : Teneur en protéines solubles des jeunes plants chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula* (Tru 131, tolérant et *Jemalong*, moins tolérant) sous différentes concentration NaCl
- Fig 25 : Croissance des plantules de deux génotypes contrastés de *M. truncatula* (Tru 131 et *Jemalong*) sous différentes concentration NaCl.
- Fig 26 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* en condition témoin
- Fig 27 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* à une concentration de NaCl faible (68mM)
- Fig 28 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* à une concentration de NaCl modérée (102mM)

- Fig 29 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* à une concentration de NaCl maximale (137 mM)
- Fig 30 : Longueur racinaire (RL) chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula*, Tru 131 et *Jemalong*, exposés au stress salin
- Fig 31 : Poids frais individuel racinaire (RW) chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula*, Tru 131 et *Jemalong*, exposés au stress salin.
- Fig 32 : Potentiel hydrique des racines des deux génotypes contrastés de *M. truncatula*, T 131 et *Jemalong*, exposés au stress salin.
- Fig 33 : Activité de l'enzyme Guaiacol peroxydase exprimée en (nmols/mg prot/min) dans les racines des deux génotypes contrastés de *M. truncatula* T131 et *Jemalong* exposés aux différents traitements par NaCl.
- Fig 34 : Contenu en protéines solubles exprimés en mg /g poids sec racinaire des deux génotypes de *M. truncatula* exposés au stress salin.
- Fig 35 : Contenu racinaire en pools d'Ascorbate ASC+DHA chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula* T131(T) et *Jemalong* (S) exposés aux différents traitements par NaCl.
- Fig 36 : Contenu racinaire en pool de Gluthatione GSH+GSSG chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula* T131(T) et *Jemalong* (S) exposés aux différents traitements par NaCl.
- Fig 37 : Développement des plantules des deux génotypes contrastés de *M. truncatula* T131(T) et *Jemalong* (S) traités aux différentes concentration de NaCl.
- Fig 38 : Représentation générale des paramètres étudiés pour chaque amorce (primer) / locus EST-SSR.
- Fig 39 : Profils des marqueurs EST-SSR des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l'amorce MTIC 044.
- Fig 40 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 044)
- Fig 41 : Profils des marqueurs EST-SSR des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l'amorce MTIC 124.
- Fig 42 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 124)
- Fig 43 : Profils des marqueurs EST-SSR des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l'amorce MTIC 077.
- Fig 44 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 077)
- Fig 45 : Profils des marqueurs EST-SSR des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l'amorce MTIC 335.
- Fig 46 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 335)
- Fig 47 : Dendrogramme UPGMA chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur les quatre marqueurs EST-SSR.
- Fig 48 : Courbe d'étalon utilisée lors du dosage des protéines solubles
- Fig 49 : Spectrophotomètre à UV visibles utilisé pour le dosage des protéines.
- Fig 50 : Principales étapes de l'électrophorèse SDS-PAGE
- Fig 51 : Test de qualité d'ADN à partir de jeunes plants des différentes accessions de *Medicago truncatula*.
- Fig 52 : Potentiel hydrique (Ψ_w) des différentes solutions d'NaCl employé pour imposer le stress hydrique sur les jeunes plants de *M. truncatula*
- Fig 53 : Poids sec (matière sèche) des jeunes plants des deux génotypes de *M. truncatula* sous différents traitements de NaCl.
- Fig 54 : Matériel végétal et germination des différentes graines de *M. truncatula*
- Fig 55 : Semis des différentes graines d'accessions de *Medicago truncatula*
- Fig 56 : Différences Agro-morphologiques entre T131 and *Jemalong*
- Fig 57 : Principe de l'électrophorèse capillaire

LISTE DES SCHEMAS

- Schéma 1 : Protocole expérimentale pour les analyses biométriques et biochimiques de 4 géotypes de *M. truncatula* à différentes concentrations de NaCl.
- Schéma 2 : Etapes de germination des graines sur le dessus de papiers absorbants dans des boîtes de Petri.
- Schéma 3 : Protocole d'extraction et analyse des protéines de réserves par électrophorèse SDS PAGE
- Schéma 4. Protocole expérimentale pour les analyses biométriques et biochimiques des géotypes : Tru 131, tolérant et Jemalong, moins tolérant, sous différentes concentrations de NaCl.
- Schéma 5 : Protocole expérimentale pour les analyses biométrique, physiologique et biochimique au niveau racinaire, de 2 géotypes Tru 131 et Jemalong, sous différentes concentrations de NaCl.
- Schéma 6 : Etapes de mesure du potentiel hydrique (Ψ_w) racinaire des 2 géotypes de *M. truncatula* à différentes concentrations de NaCl
- Schéma 7 : Mesure de l'activité GPX au niveau des racines des 2 géotypes de *M. truncatula* aux différents traitements par NaCl.
- Schéma 8 : Extraction et dosage des protéines solubles racinaires de 2 géotypes de *M. truncatula* (Tru 131 et Jemalong) à différentes concentrations de NaCl
- Schéma 9 : Extraction et analyse des antioxydants de 2 géotypes de *M. truncatula* à différentes concentrations de NaCl.
- Schéma 10 : Protocole expérimentale pour l'analyse moléculaire de la diversité génétique de 11 écotypes de *M. truncatula* utilisant les marqueurs EST-SSR
- Schéma 11 : Extraction et Amplification d'ADN par PCR à partir de jeunes plants des différentes accessions de *M. truncatula*

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1. BIOLOGIE DE L'ADAPTATION A LA SALINITE DE <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> Gaertner : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	4
Les légumineuses, Le Modèle <i>Medicago truncatula</i> Gaertner, Adaptation des Légumineuses au Stress Hydrique et salin, Variabilité Génétique des Plantes, Aspect Génomique de <i>Medicago truncatula</i>	
CHAPITRE 2. ANALYSE DE LA TOLERANCE AU STRESS SALIN DE <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> Gaertn. EN RELATION AVEC LE POIDS ET LA TENEUR EN PROTEINES DE RESERVES DES GRAINES	51
Matériel et méthodes : Traitement par NaCl, Calcul du poids et dosage des protéines de réserves de graines, Analyse statistique Résultats et interprétation : Comparaison entre les différents paramètres étudiés Discussion Conclusion	
CHAPITRE 3. ANALYSE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DES PROTEINES DE RESERVES PAR ELECTROPHORESE	67
Matériel et méthodes : Extraction des protéines solubles et SDS-PAGE) Résultats et interprétation : Analyse du polymorphisme génétique Discussion Conclusion.	
CHAPITRE 4. ÉTUDE DU COMPORTEMENT DE DEUX GENOTYPES CONTRASTES DE <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> Gaertn. VIS-A-VIS DU STRESS SALIN	76
Matériel et méthodes : Cinétique de germination, Dosage des protéines solubles, Analyse statistique Résultats et interprétation : Variabilité phénotypique et biochimique de la tolérance au stress salin Discussion Conclusion	
CHAPITRE 5. CARACTERISATION PHYSIOLOGIQUE ET BIOCHIMIQUE DE LA RACINE DE DEUX GENOTYPES CONTRASTES DE <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> Gaertn. SOUS STRESS SALIN...	86
Matériel et méthodes : Calcul de paramètres physiologiques, Activité enzymatique, Extraction et analyse des antioxydants, Dosage des protéines solubles Résultats et interprétation : Effet du stress salin sur la synthèse des protéines, Enzymes et antioxydants racinaires Discussion Conclusion	
CHAPITRE 6. ANALYSE DE LA DIVERSITE GENETIQUE DE DIFFERENTS ECOTYPES DE <i>MEDICAGO TRUNCATULA</i> Gaertn. PAR LES MARQUEURS MOLECULAIRES	104
Matériel et méthodes : Extraction d'ADN, Amplification par PCR et Analyse par des marqueurs EST-SSR Résultats et interprétation : Analyse phylogénétique et Recherches de similarités. Discussion Conclusion	
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136
ANNEXE 1 : Protocole de manipulation, mesures de paramètres physiologiques	162
ANNEXE 2 : Travaux personnels	175

Résumé

La salinité des sols est l'un des facteurs limitant la production végétale. L'introduction et l'amélioration des légumineuses comme le genre *Medicago*, s'avère très important dans l'amélioration de la productivité pour la fertilisation naturelle des sols.

Avant d'entamer la partie expérimentale de la thèse, nous avons effectué une recherche bibliographique qui décrit l'approche biologique de l'adaptation à la salinité de *Medicago truncatula* Gaertn., du point de vue génétique et physiologique.

Dans cette étude, nous avons évalué la variabilité de quatre génotypes appartenant à la plante modèle *M. truncatula* sous quatre concentrations de stress salin (0 , 68 , 102 et 137 mM) de NaCl. Afin d'évaluer le degré de sensibilité de la racine, on a mesuré la longueur de la racine par rapport à longueur de la tige. Les résultats ont montré que les génotypes Tru 131 et Tru 673, sont plus tolérants au stress salin que les génotypes jugés sensibles Tru 26 et Jemalong qui ont un ratio élevé et avec une faible teneur en protéines de réserves. Nous avons conclu que le génotype tolérant Tru 131 au stress salin, riche en protéines et avec un poids élevé de graines peut être cultivé dans les zones salines et semi-arides en Algérie et la Méditerranée afin d'améliorer la productivité de ces légumineuses. Bien que le génotype Tru 673 avait une vigueur très faible des graines, il semble tolérant (un ratio faible) alors qu'il provient de «graines âgées ». Ces données supplémentaires ont montré l'influence de la qualité des graines sur la vigueur des semences et la croissance des racines car les graines contiennent toutes les ressources génétiques de la plante.

Les protéines de réserves de ces quatre génotypes ont été séparées par électrophorèse en SDS-PAGE afin d'identifier les bandes protéiques comme marqueurs de tolérance au stress salin. Au total, 20 bandes protéiques de poids moléculaire allant de 10 à >80 kD ont été enregistré. Parmi ces génotypes, le génotype tolérant Tru 131 représente un maximum de bandes protéiques. Le regroupement (clustering) par UPGMA a révélé une variabilité entre les génotypes étudiés et sont assemblés en trois groupes. La variabilité des profils protéiques suggèrent que les génotypes sélectionnés peuvent être une source d'amélioration des cultures au travers des programmes d'hybridation.

L'analyse de l'aptitude germinatif durant la croissance des jeunes plants chez les deux génotypes contrastés appartenant à l'espèce modèle *M. truncatula*, a montré un taux de germination et un indice de tolérance élevé chez Tru 131 par rapport à Jemalong. L'analyse des protéines solubles, a présenté une synthèse élevée en protéines solubles durant l'application du stress salin chez le génotype tolérant Tru 131 par rapport à Jemalong.

L'étude et l'analyse de la partie racinaire a été étudiée chez ces deux génotypes. Elle a montré que le génotype tolérant T131 exprime une meilleure croissance racinaire par rapport à celui de Jemalong et une activité gylcol peroxydase élevée, cet enzyme a un rôle protecteur contre les molécules (ROS) accumulées lors d'un stress oxydatif. Enfin, l'analyse des antioxydants dans le cas d'une salinité élevée montre une augmentation des quantités d'Ascorbate (ASC-DHA) et de Glutathion (GSH-GSSH) chez le génotype tolérant T131.

Au niveau moléculaire et afin de positionner 9 nouvelles accessions appartenant à l'espèce modèle *Medicago truncatula* par rapport aux deux génotypes contrastés au stress salin (Tru 131 et Jemalong), une analyse moléculaire en utilisant quatre marqueurs EST-SSR a été effectuée. Les résultats ont montré une diversité génétique modérée chez les différentes accessions de *Medicago truncatula*, étudiées. Ce travail nécessite une caractérisation agronomique vis-à-vis du stress salin afin de trouver des relations entre les marqueurs EST-SSR et le phénotype pour la tolérance au stress salin.

Mots clés :

Medicago truncatula Gaertn. - Stress salin - Germination - Antioxydants (ASC,GSH) - Marqueurs Moléculaires EST-SSR

Summary

Soil salinity is an important abiotic stress which significantly affects seedling growth and seed quality. Legumes are very important plants both ecologically and agriculturally because they are able to interact symbiotically with rhizobia for biological nitrogen fixation.

Before beginning the experimental part of the thesis, we conducted a bibliographic search that describes the biological approach to adaptation to salinity of *Medicago truncatula* Gaertn., Genetic and physiological standpoint.

In order to have more information on early seedling development under salinity stress, it will be interesting to examine radicle growth in comparison to plumule elongation under different salinity stress conditions. In this study, we assessed the variability of four genotypes of the plant model *Medicago truncatula* under four levels of salt stress (distilled water as control 0, 68, 102 and 137 mM) of sodium chloride (NaCl) solution. In order to evaluate the degree of radicle sensitivity, we measured the plumule length to radicle length ratio. Also, we investigated the relationship between storage protein content, seed weight and salinity tolerance degree. The results show that Tru 131 and Tru 673 genotypes, with a low ratio and high storage protein content, are more tolerant to salinity stress than the sensitive genotypes Tru 26 and Jemalong. We concluded that the most tolerant genotype Tru 131 with rich protein and high seed weight can be cultivated in saline and semi-arid areas in Algeria and Mediterranean regions to improve the legumes productivity. Although, the genotype Tru 673 that had a low seed vigour, appear tolerant (low ratio) despite coming from 'aged seeds'. This additional data shows the influence of 'aged seeds' on seed vigour and root growth because seeds contain all of the genetic resources of the plant.

Seed storage proteins from four genotypes of the plant model *Medicago truncatula* were electrophoretically separated by SDS-PAGE in order to find protein bands as markers for genotypes characterization in relation to salt stress. A total of 20 protein bands with molecular weight ranging from 10 to > 80 kD were recorded. Among the genotypes, the tolerant genotype (Tru 131) represented maximum number of protein bands. The clustering by UPGMA showed variability between the genotypes studied and are assembled into three groups. The variability of protein profiles suggested that these selected genotypes can be a good source for crop improvement through hybridization programs.

The data analysis of germination aptitude showed that the Tru 131 genotype had the best germinatif ability, compared to (Jemalong). The soluble protein analysis, showed a high protein synthesis during salt stress application in the tolerant genotype compared to the sensitive one (Jemalong).

The results showed also that the tolerant genotype T131 expresses a better root growth compared to Jemalong with a high guaiacol peroxidase activity, which has a protective role against the molecules (ROS) accumulated during oxidative stress. The analysis of antioxidants in the case of high salinity shows increasing quantity of ascorbate (ASC-DHA) and Glutathione (GSH-GSSG) in the tolerant genotype T131.

At the molecular level and in order to position 9 new accessions of the model species *Medicago truncatula* compared to the two contrasting genotypes to salt stress (Tru 131 and Jemalong), molecular analysis using four EST-SSR markers was performed. The results showed a moderate genetic diversity among different accessions of *Medicago truncatula* studied. This work requires an agronomic characterization with salt stress in order to find relationship between the EST-SSR markers and phenotype for salt stress tolerance

Keys words :

Medicago truncatula Gaertn.- Salt Stress - Germination - Antioxydants (ASC,GSH) - Molecular Markers (EST-SSR)

INTRODUCTION GENERALE

La luzerne est une plante herbacée de la famille des Fabacées (Papilionacées). Elle est cultivée essentiellement pour la production de fourrage, en culture pure ou en mélange, le plus souvent avec des graminées (dactyle, féruque ou brome).

Medicago truncatula Gaertn est une légumineuse modèle annuelle originaire du pourtour méditerranéen (Prosperi *et al.* 1993). Cette espèce est l'une des plantes fourragères les plus répandues dans le monde avec 33 millions d'hectares en culture pure. Sa culture présente un intérêt agronomique important qui repose sur un bon rapport production / valeur nutritive du fourrage.

La capacité à pouvoir fixer l'azote atmosphérique *via* la mise en place d'une symbiose avec *Rhizobium meliloti* au niveau racinaire fait que cette culture ne nécessite pas d'engrais azoté (Spaink, 2000 ; Perret *et al.* 2000). Sa composition en acides aminés est en outre bien équilibrée. Les acides aminés essentiels pour l'alimentation animale sont tous présents dans la matière azotée de cette plante. Enfin, et de manière plus récente, elle est utilisée pour la production de molécules d'intérêt pharmacologique lui conférant un attrait industriel non négligeable.

La salinité des sols est l'un des facteurs limitant la production végétale. L'introduction et l'amélioration de ces légumineuses, s'avère très important pour la fertilisation naturelle des sols.

En particulier, le rendement de cette légumineuse présente différents degrés de sensibilité au stress salin. Bien que les effets des stress dépendent du stade de développement de la plante, des techniques culturales et des conditions climatiques et édaphiques, plusieurs critères physiologiques, biochimiques et moléculaire ont été proposés pour un tri à grande échelle avant les essais de mise en culture en champ. Ceci, correspond à des tests qui reposent sur certains traits précis biochimique, physiologique et moléculaire qui sont directement corrélés à la tolérance aux stress abiotiques.

Medicago truncatula est largement utilisé comme une plante légumineuse modèle pour comprendre la tolérance aux stress abiotiques (Young et Udvardi, 2009). Ainsi, la longueur de la racine et de la tige fournissent des indications importantes de la réponse de la plante au stress salin (Jamil et Rha, 2004). La compréhension de la relation entre le développement des jeunes plants, les conditions environnementales et la qualité des graines au niveau physiologique et agronomique sont des objectifs fondamentaux de la science des semences (Bláha et Pazderů, 2013).

Les protéines qui s'accumulent dans les plantes dans des conditions salines peuvent fournir une forme de stockage de l'azote qui est réutilisée plus tard (Singh *et al.*, 1987 ; Pareek *et al.* 1997), et jouent un rôle dans l'ajustement osmotique. Il est intéressant de rechercher une relation entre la teneur en protéines de réserves et la tolérance au stress salin.

Les graines de *Medicago truncatula* accumulent une large quantité de protéines à la maturité jusqu'à 32 - 42 % du poids sec (Djemel *et al.* 2005). Ce genre de protéines sont considérés comme des facteurs influençant sur la diversité génétique (Rodrigues-Quijano *et al.* 2001). Ils sont polymorphes et extrêmement stables (Valero *et al.* 2009). La méthode SDS-PAGE est une technique adéquate pour différencier les variétés et sont utilisés avec succès dans l'évaluation de la diversité génétique (Sharma and Maloo, 2009).

La salinité élevée affecte les plantes causant un stress hyper-osmotique et un déséquilibre ionique, générant des effets secondaires comme l'accumulation des éléments (ROS : reactive oxygen species) très toxique pour la plante (Hasegawa *et al.* 2000, Zhu 2001). Les enzymes antioxydants jouent un rôle crucial dans la protection des tissus des plantes sous condition de stress abiotiques (Fotopoulos *et al.* 2010). L'étude au niveau racinaire de ces enzymes antioxydants est importante dans la compréhension de la tolérance à la salinité chez *Medicago truncatula*.

Au niveau moléculaire, des méthodes fondées sur l'amplification enzymatique in vitro de fragments d'ADN spécifiques par la technique PCR, ont été appliquées chez les « Medics » pour l'analyse du polymorphisme sur l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines. Les microsatellites (SSR) sont les plus utilisés en génétique. Récemment, on utilise les étiquettes de séquences exprimées de microsatellites appelés EST-SSRs. Ce sont des ressources importantes pour l'investigation de la diversité génétique et le développement moléculaire. Ce sont des marqueurs utiles pour des applications divers en génétique et amélioration des plantes car ces marqueurs montrent une variation dans la partie exprimée dans le génome. Les amorces EST-SSR sont connues d'être moins polymorphes comparés avec les SSRs génomiques dans le domaine végétale à cause de la grande conservation des séquences d'ADN dans les régions transcrites (Scott *et al.* 2000).

Notre travail a pour objectif de sélectionner le génotype le plus tolérant au sel parmi différents génotypes de l'espèce *Medicago truncatula* Gaertn. L'étude a pour but également de rechercher un éventuel marqueur physiologique, biochimique (Analyse des antioxydants) et moléculaire (EST-SSR).

Notre thèse s'organise en six chapitres :

Le premier chapitre est une synthèse bibliographique relative à la biologie de l'adaptation à la salinité de *Medicago truncatula* Gaertn. qui comprend cinq facettes : Les légumineuses, le modèle *Medicago truncatula* Gaertn., l'adaptation des légumineuses au stress hydrique et salin, variabilité génétique des plantes, aspect génomique de *Medicago truncatula* Gaertn.

Dans le deuxième chapitre, nous abordons l'effet du stress salin sur le développement des jeunes plants des différents génotypes de *Medicago truncatula*, et rechercher une relation entre le poids et la teneur en protéines de réserves des graines de départ et la tolérance au stress.

Le troisième chapitre a pour objet l'analyse de la diversité génétique des protéines de réserves par électrophorèse.

Le quatrième chapitre, est consacré à l'analyse du comportement de deux génotypes contrastés de *Medicago truncatula* vis-à-vis du stress salin

Dans le cinquième chapitre, nous tontons la caractérisation physiologique et biochimique de la racine chez les deux génotypes contrastés de *Medicago truncatula* sous stress salin.

Enfin, le sixième chapitre, fait l'objet d'une analyse de la diversité génétique de différents écotypes de *Medicago truncatula* par des marqueurs moléculaires de type EST-SSR.

Chapitre 1

Biologie de l'Adaptation à la Salinité de *Medicago truncatula* Gaertner : Revue bibliographique

Biologie de l'Adaptation à la salinité de *Medicago truncatula* Gaertner

Afin de contribuer efficacement à la lutte contre les changements climatiques, la culture des légumineuses s'avère une bonne alternative pour contrer les aléas de l'environnement tels que les stress biotiques et abiotiques. Comme reine des fourragères, la luzerne annuelle (*Medicago truncatula* Gaertner) est l'une des plantes modèles les plus répandues dans le monde. Nous allons aborder dans ce chapitre, les caractéristiques biologiques de ce genre de légumineuse et leurs intérêt agronomique, ainsi que les mécanismes d'adaptation à la salinité des sols qui touche beaucoup notre pays et le aussi le pourtour méditerranéen.

1. Les légumineuses

Les légumineuses (Fabacées) sont une grande famille très diversifiée qui comprend des plantes herbacées annuelles jusqu'à des arbres pérennes (Fig 1). Ces plantes sont des composantes essentielles dans les écosystèmes terrestres dû à leur capacité à fixer l'azote atmosphérique dans les nodules symbiotiques, et elles sont donc d'excellents colonisateurs des environnements pauvres en azote.

Le partenaire bactérien de cette symbiose, appartenant à la famille des Rhizobiacées réduit l'azote à l'intérieur des nodules grâce à la nitrogénase. L'activité de cette enzyme est inhibée par l'oxygène d'où la présence dans les nodules fonctionnels de la leghémoglobine régulant les taux d'oxygène libre. L'intérêt agronomique des légumineuses a son origine dans cette fixation symbiotique de l'azote qui leur permet de produire en abondance des protéines en l'absence de fertilisation azotée.

Les légumineuses avec plus de 18,000 espèces sont la troisième plus grande famille de plantes supérieures et la deuxième plus importante pour les pâturages d'intérêt agricoles, après les poacées (graminées) qui incluent la canne à sucre et les céréales tels maïs, riz, blé, orge, avoine, seigle et millet (Young *et al.* 2003 ; de Faria *et al.* 1989). La capacité de différencier des nodules sur leurs racines hébergeant des bactéries symbiotiques capables de fixer l'azote a été démontrée pour 88% des espèces examinées jusqu'à ce jour (de Faria *et al.* 1989).

Depuis le début de la civilisation, les graines et gousses (fruits spécifiques des légumineuses) ont joué un rôle très important dans l'alimentation humaine, car elles constituent une source de protéines (légumineuses protéagineuses : le pois, la féverole, le haricot, le pois chiche, les lentilles) et de lipides (légumineuses oléo-protéagineuses : le soja et l'arachide). Les légumineuses sont aussi une source importante de fourrage pour les animaux (luzerne, trèfle).

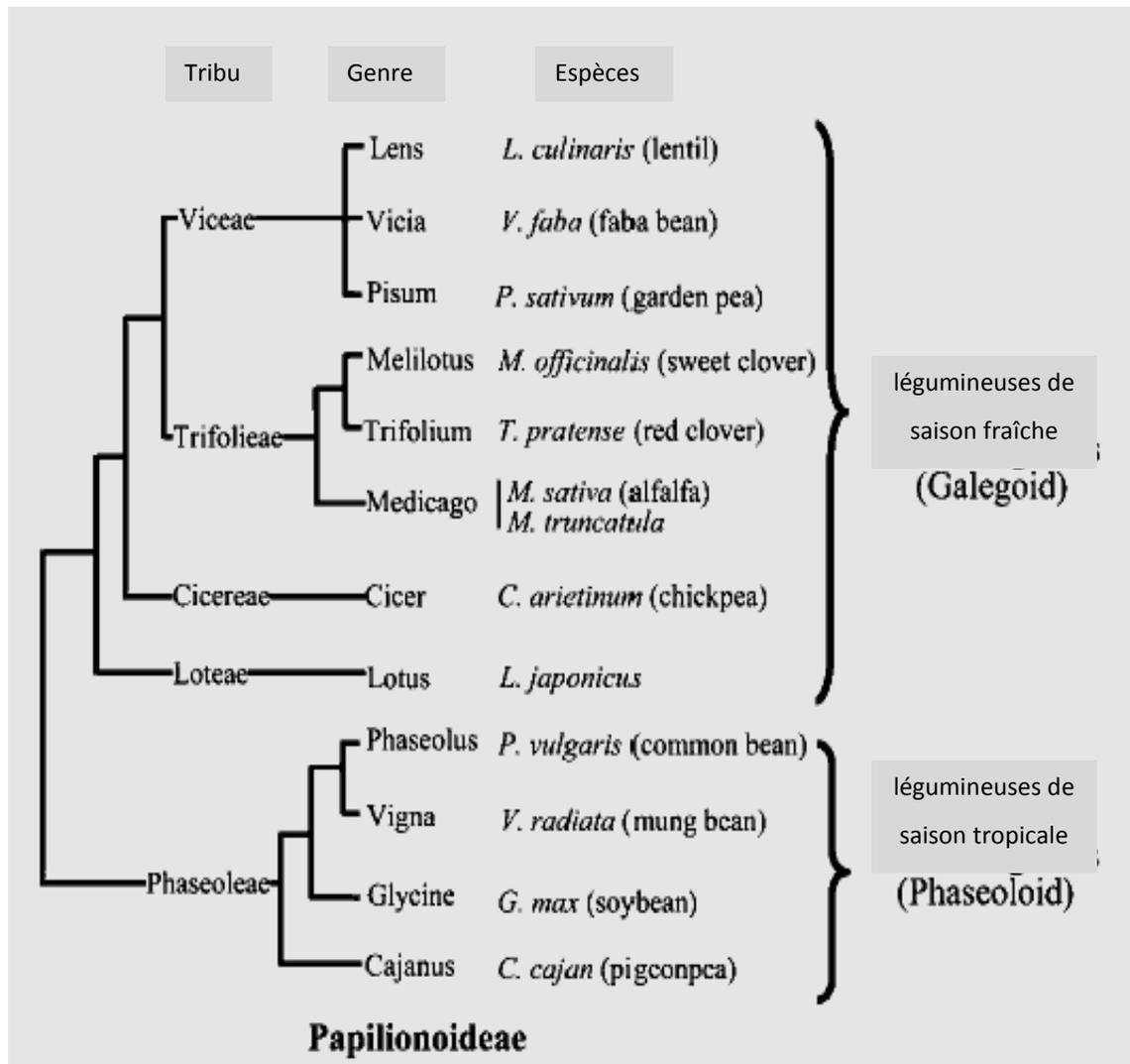


Fig 1: Classification de la famille des Papilionoideae (Zhu *et al.* 2005)

1.1. L'azote dans la nutrition des plantes

L'azote est l'un des éléments majeurs de la vie. C'est le quatrième constituant des plantes qui est utilisé dans l'élaboration de molécules importantes comme les protéines, les acides nucléiques et la chlorophylle. C'est le constituant principal de l'atmosphère terrestre sous forme d'azote gazeux (N₂) mais les plantes n'ont pas la capacité de l'assimiler directement. Les plantes absorbent l'azote dans le sol sous forme de nitrates (NO₃⁻) et d'ammonium (NH₄⁺). L'importance relative de chacune de ces formes dépend de l'espèce végétale et des conditions du milieu. Mais les légumineuses peuvent aussi acquérir l'azote grâce à leur aptitude à établir une symbiose avec des bactéries du sol collectivement appelées *Rhizobium*. Dans ce cas, elles ne nécessitent pas l'apport d'engrais azotés, à la différence des céréales ou des oléo-protéagineux comme le colza et le tournesol. La fertilisation azotée des plantes joue donc un rôle important dans l'accroissement de l'effet de serre. Cela est ruineux économiquement tout en créant une pollution importante car souvent les nitrates sont lessivés lors des pluies et atteignent la nappe phréatique (Link *et al.* 2006). La culture des Légumineuses représente donc le meilleur moyen de produire des protéines tout en respectant l'environnement: c'est un bel exemple de culture dans le cadre d'une agriculture durable. Chez les espèces fourragères, et plus particulièrement chez la luzerne, les acides aminés sont considérés comme étant le pool d'azote le plus rapidement mobilisable, tandis que les protéines solubles forment le pool d'azote quantitativement le plus important (Ourry *et al.* 1994).

1.3. Teneur en protéines

Dans l'alimentation humaine, les légumineuses et les céréales constituent deux sources de protéines complémentaires. En effet les protéines provenant des céréales sont déficientes en Lysine, et les légumineuses à graines sont déficientes en acides aminés sulfurés et en tryptophane (Wang *et al.* 2003). C'est pour cette raison que dans la majorité des centres de domestication, les légumineuses et les céréales ont été associées (Gepts, 2004). Graham et Vance (2003) estiment que les légumineuses fournissent pour l'Homme environ le 1/3 des protéines alimentaires. Pour le cheptel, les légumineuses fourragères représentent une source d'alimentation riche en protéines, fibres et énergie. Elles sont à la base de la production de lait et de viande (Russelle, 2001). La luzerne (*Medicago sativa* L) représente le fourrage le plus répandu dans les zones à climat tempéré (Russelle, 2001). Cette plante apporte de nombreux éléments à la ration donnée aux animaux. Elle leur fournit d'abord une part importante des protéines nécessaires à leur croissance, de la Bétacarotène et des fibres indispensables à la digestion chez le ruminant. D'autres espèces sont aussi importantes pour le pâturage dans les zones tempérées comme les trèfles (*Trifolium* spp.), le lotier (*Lotus corniculatus* L), le melilot (*Melilotus* spp.) et la vesce (*Vicia* spp.).

Ces espèces sont largement représentées autour du Bassin Méditerranéen. Certaines d'entre eux peuvent jouer un rôle important dans l'amélioration de la production pastorale et/ou fourragère. *Lotus creticus* présente une bonne résistance au sel et peut supporter les eaux saumâtres (Foury, 1954).

1.4. Les légumineuses dans les systèmes de culture

Utilisées en rotation ou en association dans les systèmes de culture, les légumineuses apportent une certaine contribution en azote en fixant et en intégrant une partie de l'azote atmosphérique. Les résidus des légumineuses sont plus riches en azote et contribuent à enrichir le sol en cet élément. Les cultures succédant aux légumineuses peuvent aussi bénéficier indirectement de l'azote fixé par l'entremise des résidus laissés par la légumineuse (Chalck, 1998). Il est maintenant bien établi que les précédentes légumineuses augmentent généralement les rendements des cultures non fixatrices d'azote mais cet apport d'azote atmosphérique n'explique pas toujours les rendements souvent très élevés des cultures succédant aux légumineuses. D'autres effets bénéfiques des légumineuses semblent intervenir dans l'accroissement des rendements et certains auteurs comme Chalck (1998) préfèrent le terme 'effet rotation' pour désigner cet effet positif des légumineuse sur la culture suivante. Certains auteurs attribuent l'effet bénéfique des rotations à l'amélioration des propriétés physiques et biologiques des sols et à la capacité de quelques légumineuses à solubiliser des phosphates de calcium et le phosphore par leurs exsudats racinaires.

2. Le modèle *Medicago truncatula* Gaertn.

La plus vieille référence connue de culture de la luzerne cultivée (*Medicago sativa* L) date de 1300 ans avant J.C en Turquie. Mais son extension en Europe n'a débuté réellement qu'avec l'empire romain (Génier *et al.* 1992), même si les phéniciens l'ont introduite dans le bassin méditerranéen occidental. A la fin du XVIII^e siècle, sa zone de culture est mondiale (Michaud *et al.* 1988). Le genre *Medicago* fait partie de la famille des Papilionacées. Il existe plus spécialement sur l'ensemble du pourtour méditerranéen vingt autres espèces de luzernes pérennes à allogamie non stricte, diploïdes ou tétraploïdes, et trente quatre espèces annuelles ou « *Medics* » toutes autogames, et diploïdes à l'exception de deux d'entre-elles (Lesins et Lesins. 1979). Jusqu'aux années 1990s, il n'existait que deux plantes modèles. La première plante modèle *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ; de la famille des crucifères, a permis des progrès considérables dans la connaissance des bases moléculaires de la biologie des plantes. Le séquençage de son génome (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000), a permis d'avoir des outils de génétique et de génomique disponibles pour accélérer la recherche. *Arabidopsis thaliana* au fait de sa petite taille, son petit génome nucléaire, son cycle phénologique et sa très grande production de graines. La deuxième plante modèle fut le riz pour les monocotylédones (céréales) qui sont le groupe de plantes cultivées le plus largement. Cependant, ces deux espèces ne sont pas suffisantes pour représenter toute la diversité biologique du monde végétal (Adam, 2000). Il fallait surtout trouver une plante représentative d'un des taxons végétaux les plus importantes : les légumineuses. Ni *Arabidopsis* ni le riz ne font des symbioses fixant l'azote atmosphérique.

De plus, contrairement à la majorité des espèces végétales, *Arabidopsis* est incapable d'établir une symbiose mycorhizienne. Dans l'objectif d'avoir un système génétique simple pour les légumineuses, *Medicago truncatula* a été choisie comme espèce modèle par de nombreux laboratoires. Au contraire de la majorité des légumineuses, *M. truncatula* est bien accessible aux outils moléculaires et aux analyses génétiques. Elle est donc adaptée à l'étude des mécanismes biologiques des grandes fonctions spécifiques aux légumineuses.

La luzerne tronquée (*Medicago truncatula* Gaertn. = *Medica. Tribuloides* Dsr.) est une espèce végétale herbacée des régions méditerranéennes. Elle appartient à la famille botanique des Fabacées, plus couramment nommées Légumineuses ou Papilionacées. Cette famille rassemble environ 650 genres et 20.000 espèces (Doyle et Luckow, 2003). Ces plantes peuvent être des arbres (*ex* : *Cytise*), des arbustes (*Genêt*), des lianes (*Glycine*) ou des plantes herbacées (*Trèfle*). Le regroupement en famille est établi par phylogénie moléculaire basée sur la variabilité de marqueurs chloroplastiques. La proximité génétique induit une morphologie commune.

Elle a d'ailleurs été le premier critère de classification des espèces végétales, établi par Linné au XVIII^e siècle.

C'est une plante annuelle herbacée, ramifiée au port souvent rampant de 15 à 80 cm de long. Elle porte des feuilles trifoliolées. Ses petites fleurs jaunes de 5 à 8 mm donnent après autofécondation des gousses cylindriques très dures, renfermant 4 à 6 graines. Les spires jointives de la gousse portent des épines recourbées perpendiculaires au plan des spires. Les graines de cette plante ont une durée de vie importante supérieure à 40 ans, et une dormance qui peut être levée facilement (Lesins et Lesins, 1979). Selon ces mêmes auteurs, *M truncatula* a un cycle de vie court qui varie de 2 à 3 mois. C'est une espèce prolifique puisque chaque plante produit 500 à 1000 graines. Elle peut être également multipliée aisément par bouturage. Cette espèce possède un habitat variable. Elle prédomine au niveau des stations sèches, des sols lourds, marneux ou argileux.

Chez les Légumineuses, l'organe reproducteur est commun à toutes les espèces : la fleur présente une corolle papilionacée et évolue en fruit de type gousse. Une particularité importante des Légumineuses est leur relation vis-à-vis de l'azote. De manière générale, les plantes utilisent l'azote minéral puisé dans le sol, essentiellement sous forme nitrique (NO₃). En plus de cette source, les légumineuses fixent l'azote gazeux atmosphérique (N₂). Plus exactement, ce sont les bactéries telluriques du genre *Rhizobium*, vivant en symbiose avec la plante qui sont capables de cette fixation. La plante crée un micro-habitat favorable au développement bactérien. Les bactéries sont abritées dans les tissus racinaires, le tout formant des nodosités. Communiquant directement avec les vaisseaux conducteurs, les bactéries reçoivent les éléments carbonés issus de la photosynthèse.

Elles fournissent à la plante l'azote réduit sous forme ammoniacale (NH₄), issu de l'activité de l'enzyme nitrogénase. Le fonctionnement de cet enzyme est favorisé par la réduction de la teneur en dioxygène au niveau des nodosités, grâce à la présence de la leghemoglobine (LegHb), hémoprotéine typique proche de l'hémoglobine, qui fixe le dioxygène. La partie protéique de la LegHb est synthétisée par la plante et l'hème par la bactérie.

D'un point de vue économique, les Légumineuses occupent une place importante. Les pois, les haricots et les lentilles, par exemple, sont consommés pour leur intérêt nutritionnel, qui consiste notamment en apport protéique. Les oléoprotéagineux tels que l'arachide et le soja sont une source d'huile et de tourteau protéique pour l'industrie agroalimentaire. La luzerne et le trèfle sont utilisés dans l'alimentation animale comme fourrage. En agriculture, dans un système de rotation de culture, les Légumineuses permettent de fertiliser les sols en azote, limitant les apports d'engrais industriels / artificiels / polluant la nappe phréatique.



Fig 2 : Fleurs, feuilles, gousses et graines chez la légumineuse modèle *Medicago truncatula* Gaertn.
(<http://www.tela-botanica.org/>)

2.1. Intérêt Biologique

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

2.2. Intérêt Agronomique

Les espèces annuelles du genre *Medicago* présentent un intérêt économique très important. Ces plantes fourragères sont souvent utilisées dans les systèmes de rotation. L'Algérie se trouve parmi les pays qui présentent un besoin réel en fourrage. Le remplacement de la jachère par une culture fourragère sans doute assurera une meilleure intégration de l'élevage à l'agriculture. Hormis le rôle de fixation d'azote atmosphérique, ces espèces possèdent un système racinaire très puissant qui permet l'utilisation des éléments fertilisants sur une profondeur rarement atteinte par d'autres cultures. La luzerne est considérée comme une culture améliorante de la structure et de la texture du sol. La plupart des espèces annuelles de *Medicago* sont originaires du bassin méditerranéen (Prosperi *et al.* 1993). Elles possèdent un intérêt agronomique majeur pour la production fourragère en zone sèche et pour la suppression ou la diminution de l'épandage d'engrais azotés. Leur intérêt est étroitement lié à leur capacité à se ressemer naturellement d'une année à une autre. Cette propriété peut aboutir à une installation pérenne adaptée aux aléas climatiques des zones méditerranéennes diminuant ainsi le phénomène d'érosion des sols. Par ailleurs, de nombreuses espèces et sous-espèces de *Medicago* présentent aussi des caractères d'intérêt agronomique, qu'il serait souhaitable d'introduire dans la luzerne cultivée, tels que la tolérance au pâturage (capacité d'enracinement et de repousse), la résistance à la sécheresse, à la salinité et aux maladies.

2.3. Intérêt pour la Recherche en Génétique Fondamentale

De nombreuses recherches focalisées sur la plante modèle *Arabidopsis thaliana* ont permis des progrès considérables dans la connaissances des bases moléculaires de la biologie des plantes ; avec l'achèvement du séquençage du génome d'*Arabidopsis*, la palette complète des outils de génétique et de génomique maintenant disponibles devrait encore accélérer le rythme des découvertes. De son côté, le riz fait l'objet de rapides développements génomiques en tant que modèle pour les monocotylédones.

Cependant, il est clair que ces deux espèces ne suffisent pas pour représenter le monde végétal dans toute sa diversité biologique ; Ce fait est particulièrement bien illustré par le cas des légumineuses (Fabacées) qui représente l'un des taxons les plus importants, tant du point de vue de la biologie et de l'écologie fondamentales que du point de vue agronomique et environnemental.

C'est pourquoi *Medicago truncatula* est actuellement une plante modèle pour la génétique moléculaire des symbioses avec les microorganismes du sol comme les bactéries *Rhizobium* pour la symbiose fixatrice d'azote (Journet *et al.* 2001). Historiquement, le choix de *Medicago truncatula* résulte d'un programme INRA (1985-1986) dont l'objectif était de définir une espèce modèle à l'intérieur du genre *Medicago*, afin de l'associer à *Shinorhizobium meliloti*, le microsymbiote bien étudié de la luzerne et constituer un système symbiotique modèle plante-bactérie.

M. truncatula est une légumineuse annuelle originaire du pourtour méditerranéen et proche de la luzerne cultivée *M. sativa*. Elle est diploïde ($2n=16$) et autogame, produit des graines en abondance avec un temps de génération de 10 à 12 semaines (de graine à graine). La taille de son génome est d'environ 500 méga-bases/ une cellule, c'est-à-dire trois à quatre fois supérieure à celle d'*Arabidopsis thaliana* et équivalente à celle du riz. La biodiversité de l'espèce *M. truncatula* est caractérisée par une forte variabilité morphologique et génétique intra et inter populations et par une importante homozygotie au niveau individuel.

Le partenaire bactérien de cette plante modèle est le plus étudié parmi les bactéries rhizobiales et le séquençage du génome de la souche de référence de *S. meliloti* 1021 a été achevé (Capela *et al.* 2001). *M. truncatula* a permis d'identifier un grand nombre de gènes reliés à la symbiose dont certains ont déjà été isolés, séquencés et leur expression étudiée (Gamas *et al.* 1996; Ane *et al.* 2002 ; Amor *et al.* 2003 ; Lévy *et al.* 2004).

2.4. Corrélation entre la diversité moléculaire et phénotypique

La question de base est: la variation moléculaire est-elle corrélée avec la variation génétique quantitative observée dans les populations biologiques ? Les EST-SSRs sont associés avec différents locus qui codent pour des éléments fonctionnels de protéines et servent comme éléments de transcription (Kashi *et al.* 1997). Ils présentent un haut niveau de mutations spontanées du nombre de répétitions, ce qui peut causer une variation quantitative dans la fonction des protéines et l'activité des gènes. La valorisation des ressources génétiques passe par une accumulation de données préalables sur les bases génétiques de caractères agronomiques ciblés. Ainsi, plusieurs techniques de phénotypage rapide (ex chez *Arabidopsis*) sont développées pour étudier un grand nombre de génotypes avec des moyens réduits (Loudet *et al.* 2007).

Il est établi que *Medicago truncatula* peut être utilisée pour des approches multidisciplinaires reliant des domaines très divers. A long terme, un impact des recherches intégrant les informations génétiques et fonctionnelles est attendu pour étendre les connaissances appliquées à la recherche agronomique des légumineuses économiquement importantes.

Ces connaissances permettront une meilleure caractérisation et identification des gènes et caractères impliqués dans des résistances aux maladies et liés à une amélioration de la productivité des cultures sous différentes contraintes environnementales.

2. 5 . Biologie de la graine chez *Medicago truncatula*

La graine est un des facteurs de dissémination des espèces végétales. Elle est issue de reproduction sexuée allogame (fécondation croisée entre deux individus) ou autogame (autofécondation). L'individu formé est donc différent de la plante mère. Chez beaucoup d'espèces, la reproduction végétative complète voire supplante la reproduction sexuée. Elle se fait alors à partir de tiges spécialisées (stolons de fraisier, rhizomes de bégonia, tubercules de pomme de terre), ou bien de bulbilles, qui se développent sur les côtés des bulbes (ail, oignon, tulipe...), ou enfin à partir de racines drageonnantes, racine horizontales sur lesquelles se développent des tiges dressées (framboisier, prunellier). En revanche, pour de nombreuses espèces annuelles, la graine est l'unique vecteur de propagation. C'est le cas notamment pour les plantes cultivées que sont le blé, le maïs, le soja... etc. La graine est constituée de plusieurs types de tissus d'origines différentes : l'embryon, l'albumen et les téguments (Fig 3). L'embryon et l'albumen sont issus de la fécondation. L'embryon, qui représente l'élément principal de la graine, est totalement recouvert de l'albumen. Ce dernier constitue, chez les céréales, la zone de stockage des réserves nécessaires au développement de la plantule avant l'acquisition de l'autotrophie. C'est le cas également pour certaines espèces dicotylédones (graines albuminées, ex : ricin) mais pour les autres, ce sont les cotylédons de l'embryon qui assument ce rôle (graines exalbuminées).

A la périphérie de la graine, on retrouve les téguments, enveloppes protectrices plus ou moins résistantes. Elles sont d'origine maternelle et dérivent des tissus de l'ovaire (Fig 3).

La nature des réserves énergétiques varie selon les espèces. Elles peuvent être glucidiques du type amidon, chez le riz par exemple, lipidiques (colza, tournesol...), protéiques (luzerne), oléo-protéiques (arachide) ou gluco-protéiques (pois). L'intérêt nutritionnel ou industriel des plantes cultivées pour leurs graines réside dans leur capacité à produire des substances de réserve. Beaucoup de travaux de recherche ont pour objectif l'amélioration de la qualité et de la quantité de ces réserves. La graine est alors considérée comme un produit final et non comme une *semence*, point de départ crucial dans le développement d'une nouvelle plante.

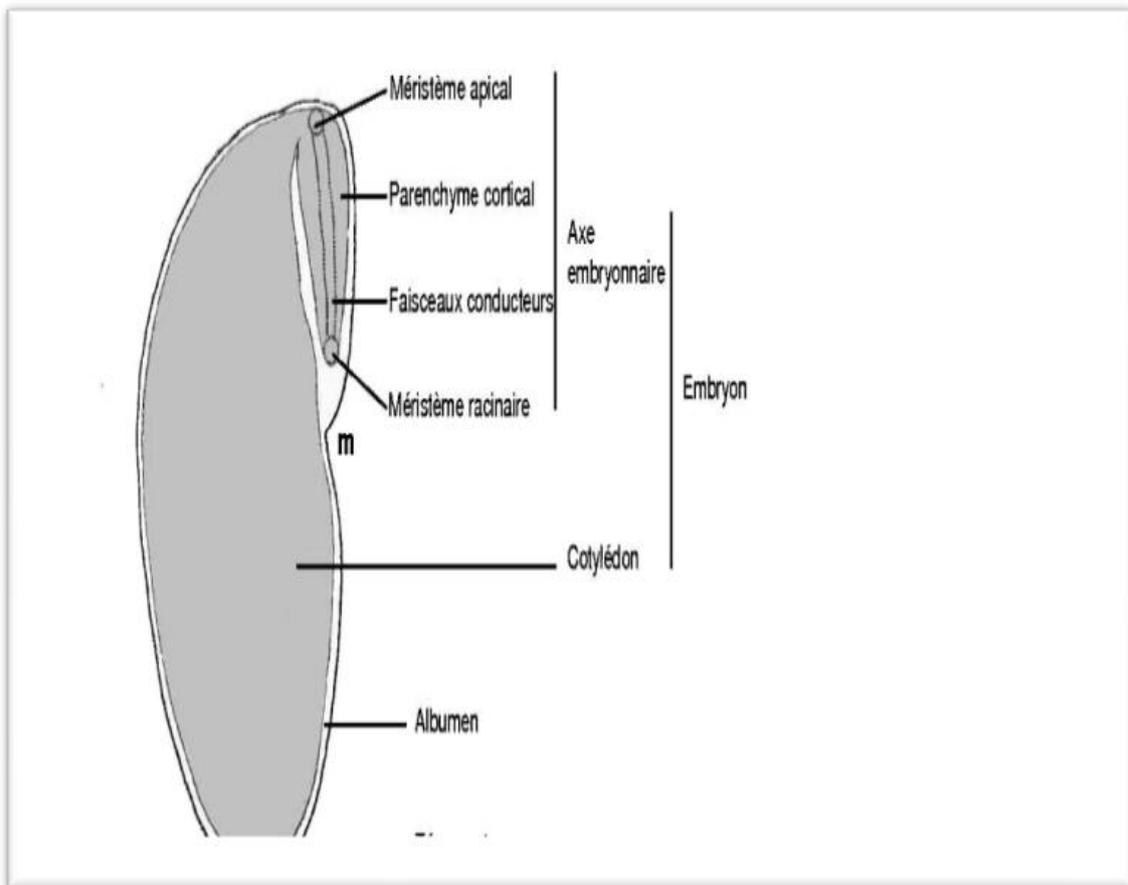


Fig 3 : Structure de la graine de *Medicago truncatula*.

2.5.1. Phase de maturation de la graine

Après l'étape de l'embryogénèse survient l'étape de maturation de la graine qui correspond à des processus de préparation à la quiescence et à la germination. La maturation débute vers 12 jours après la pollinisation chez *Medicago*. Elle se caractérise par une croissance exercée par extension cellulaire et non plus par prolifération. Les graines verdissent, témoignant de l'accumulation de chlorophylle, les cotylédons subissent une endopolyploïdisation, les substances de réserves sont synthétisées et stockées dans les tissus. La maturation correspond également à l'acquisition du pouvoir germinatif et de la mise en place de la tolérance à la dessiccation. Ces événements ont lieu respectivement vers 14 JAP et 16-20 JAP chez *Medicago* (Boudet *et al.* 2006). Les principales protéines de réserve chez les Légumineuses sont la légumine (11S) et la viciline (7S). Elles sont codées par une famille multi-génique qui comprend au moins quarante membres chez le pois (Casey *et al.*, 1986). Elles sont accumulées dans des corps protéiques qui intègrent les vacuoles de stockage protéiques (PSV) originaires du Golgi principalement dans les cotylédons mais aussi dans l'axe embryonnaire chez le maïs, le soja, le pois et le coton (Alekseeva et Kobarskaya, 1979 ; Tsai, 1979 ; Alekseeva *et al.* 1989 ; Vigil and Fang, 1995).

L'accumulation de ces protéines est régulée dans l'espace mais aussi dans le temps. Chez *Medicago truncatula*, les transcrits de la viciline apparaissent avant ceux de la légumine A (Abirached-Darmency *et al.* 2005). L'accumulation d'ARNm est visible dès 12 jours après pollinisation (JAP). A 16 JAP, l'expression des gènes est forte et se répartit de manière hétérogène dans les cotylédons, les cellules adaxiales montrant une plus forte accumulation.

Il existe en effet un gradient de différenciation dans les tissus embryonnaires : les cellules cotylédonaires adaxiales, en comparaison avec les cellules abaxiales, sont les premières à ralentir leur prolifération et à entrer en différenciation. L'accumulation des protéines dans les graines dépend de l'azote disponible. La glutamine et / ou l'asparagine circulant dans le phloème sont métabolisées dans les téguments de la graine (Lanfermeijer *et al.* 1990 ; Rochat et Boutin, 1991) et les acides aminés distribués principalement sous forme glutamine, thréonine et alanine (Lanfermeijer *et al.* 1990). Toutes les graines n'ont pas une capacité identique de tolérer la dessiccation. Les graines peuvent perdre jusqu'à 90 % de leur contenu en eau avant d'atteindre le stade de dormance (absence d'activité du métabolisme). Cet état leur permet de survivre à des conditions extrêmes (ex : hiver) et de favoriser la dispersion de l'espèce. Cependant, cette tolérance est perdue dès que la germination se met en place.

Des graines de nombreuses espèces ont fait l'objet d'études approfondies, telles que *Arabidopsis thaliana* (Parcy *et al.* 1994), le coton (*Gossypium hirsutum* ; Baker *et al.* 1988), l'orge (*Hordeum vulgare* ; Espelund *et al.* 1995), le maïs (*Zea mays* ; Pagès *et al.* 1993), le ricin (*Ricinus communis* ; Han et Kermodé, 1996) et le riz (*Oryza sativa* ; Mundi et Chua, 1988). Un des problèmes majeurs de ce type de système est d'arriver à dissocier les gènes impliqués dans la tolérance de ceux impliqués dans le développement.

Des mécanismes de protection sont mis en place dans les tissus des graines au cours de la maturation afin de protéger les structures cellulaires des dommages causés par le retrait de l'eau. Il y a une accumulation de sucres, des composés amphiphiles et de protéines spécifiques : Heat Shock Protein (HSP) et Late Embryogenesis Protein (LEA). Le métabolisme cellulaire est également ajusté pour éviter l'accumulation de composés réactifs de l'oxygène (ou ROS : Reactive Oxygen Species) et d'acétaldéhyde. Une des découvertes majeures liées à l'utilisation de ce type de système sont les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant). Les protéines LEA sont, comme leur nom l'indique, accumulées au cours des phases tardives de la maturation des semences (Dure *et al.* 1981; Galau *et al.* 1986). Les ARNm de ces protéines apparaissent dès le début de la déshydratation des graines et sont accumulés jusqu'à leur maturation, pour devenir au final la population de messagers la plus abondante dans les tissus déshydratés.

La quantité de ces ARNm diminue quelques heures après la réhydratation de l'embryon (Han et Kermodé, 1996). Elles le sont aussi en réponse à divers stress abiotique et à l'ABA (Kermodé, 1990 ; Skriver et Mundy, 1990 ; Ramanjulu et Bartels, 2002) et chez l'organisme anhydrobiote *Craterostigma plantagineum* (Bartels *et al.* 1990; Piatkowski *et al.* 1990). Les protéines HSP ont été identifiées chez les graines soumises à un stress thermique (Abernethy *et al.* 1989). Elles sont accumulées à la fin de la maturation comme les protéines LEA.

2.5.2. Phase de germination de la graine

Après la phase de quiescence, voire de dormance, et lorsque les conditions de l'environnement sont favorables, le développement de l'embryon reprend. L'axe embryonnaire s'allonge alors dans les deux sens. L'hypocotyle, qui présente un gravitropisme négatif, amène le méristème apical et les cotylédons hors de terre. Les cotylédons fournissent les réserves énergétiques qui sont alors mobilisées pour la croissance. Ils verdissent, signifiant l'acquisition de l'activité photosynthétique avant la mise en place des premières feuilles à partir du méristème apical. La racine, elle, possède un gravitropisme positif et permet au méristème racinaire de s'enfoncer pour développer des racines. Elle est la première à se développer au cours de la germination chez *Medicago truncatula*.

Entre le stade de graine sèche quiescente et le développement de la plantule existe une phase transitoire qui se termine lorsque la racicule perce les téguments.

A ce moment, la graine est considérée comme germée. La germination est donc définie comme la phase transitoire entre le stade graine sèche et l'apparition de la racicule (Bewley et Black, 1994). Elle débute avec l'imbibition des tissus. Il est possible de suivre cette phase par mesure de la prise d'eau des graines. On distingue alors trois étapes caractéristiques. La première correspond à une imbibition rapide au cours de laquelle les tissus se réhydratent rapidement. Cette étape est marquée par une forte reprise de l'activité métabolique.

Les structures et les enzymes nécessaires à cette reprise d'activité sont supposé avoir résisté à la déshydratation et être présentes dans les graines sèches (Bewley, 1997).

La deuxième étape se caractérise par un ralentissement de la prise d'eau et de l'activité respiratoire. C'est à ce stade que se préparent les événements métaboliques associés à l'allongement de la racicule. L'émergence de la racicule clôt cette deuxième étape et coïncide avec la perte de la tolérance à la dessiccation.

La troisième et dernière phase correspond à l'allongement de la racicule, une nouvelle absorption d'eau et une intensification de l'activité respiratoire due à la biogénèse de mitochondries. Cette dernière phase, dite de croissance, amorce la mobilisation des réserves et le développement de la plantule ; elle n'est pas considérée comme faisant partie de la germination au sens strict. La germination est soumise aux conditions de l'environnement. La présence d'eau est nécessaire pour l'hydratation des tissus et pour la croissance des organes. Néanmoins, si l'eau vient à manquer après l'imbibition, la graine est capable de subir un nouveau processus de déshydratation et d'attendre un prochain afflux d'eau. La capacité germinative reste identique, et lorsque les conditions redeviennent favorables, la croissance est plus rapide et, au sein d'un lot de graines, la germination est plus homogène. Ce phénomène est exploité en agronomie (« amorçage » ou priming) mais présente l'inconvénient d'une diminution de la longévité, surtout si les graines ont été séchées rapidement (Soeda *et al.* 2005).

En revanche, dès que la racicule a percé les téguments, un retour en arrière est impossible et une restriction d'eau conduit à la mort de la plantule (perte de la tolérance à la dessiccation). La teneur en oxygène est également importante pour la reprise de l'activité métabolique. Même si l'embryon s'est développé dans une atmosphère appauvrie en oxygène, à ce stade, la croissance n'est plus possible dans des conditions hypoxiques. Le riz représente cependant une exception. Cette espèce germe sous l'eau en développant un coléoptile qui émerge à la surface et permet l'apport d'oxygène, les processus fermentaires étant prolongés jusqu'alors (Magneschi et Perata, 2009). La cinétique de germination est régulée par la température, l'optimum variant d'une espèce à l'autre selon le milieu auquel elle est adaptée. Pour *Medicago truncatula*, cet optimum se situe à 21°C environ.

La germination est également influencée par l'éclairement. Selon les espèces, cette influence est le plus souvent positive.

La lumière est perçue par la graine au niveau des phytochromes qui sont impliqués dans la modulation des hormones endogènes GA et ABA (Seo *et al.* 2009). Chez *Medicago*, la condition optimale est l'obscurité et la lumière diminue la vitesse de germination.

2. 6. Mobilisation des réserves chez les plantes

A la germination des graines, qui requiert une activité enzymatique très importante pour la mobilisation des réserves et le développement de l'embryon, on assiste à une reprise des synthèses d'enzymes et parallèlement à une synthèse de gibbérellines. Dès la fin de la phase d'imbibition, les réserves de l'albumen ou des cotylédons sont mobilisées. Les enzymes nécessaires à cette mobilisation sont alors synthétisées en abondance. L'exemple type est celui de la libération des sucres à partir de l'amidon de l'albumen des céréales sous l'action des gibbérellines, la production d'amylase est fortement stimulée (Heller *et al.* 1993).

Au cours de la germination des graines (oléagineuses, amylicées et protéagineuses), il y a mobilisation des réserves par différentes hydrolases, lipases et / ou protéases dans une chronologie qui reste à déterminer. Selon les espèces, ces réserves peuvent être majoritairement de nature glucidique, lipidique et/ ou protéiques. Chez les oléagineuses les travaux ont surtout concernés les lipases dégradant les lipides de réserves, enzymes qui ne s'expriment pas ou peu durant les premiers 24 heures d'imbibition et devenant actives de façon intense durant la période de germination *sensu stricto* (Khemiri. H *et al.* 2004). Turk *et al.* (2002), ont montré l'intérêt de l'analyse protéomique des graines d'*Arabidopsis thaliana* pour la compréhension du processus de germination.

L'étude de la cinétique de germination a montré que l'embryon stocke des protéines et des ARN messagers, l'expression des protéines a été étudiée et différentes protéines sont définies : des protéines de niveau constant, des protéines dont le niveau s'accroît ou diminue lors de la germination et celles dont le niveau varie lors de la protrusion de la radicule. De manière générale, après un jour de germination, les protéines du cytosquelette augmentent ; par la suite, les niveaux enzymatiques s'accroissent, les protéines impliquées sont en majorité des enzymes du métabolisme, de même, il est observé une augmentation des protéines du stress.

3. Adaptation des légumineuses au stress hydrique et salin

Le climat méditerranéen est caractérisé par des périodes de sécheresse erratiques imprévisibles, ce qui limite considérablement les productions végétales (Adda *et al.* 2005).

Dans cette section, il sera fait une revue des caractères utilisables pour améliorer l'efficacité de la sélection pour l'adaptation à la sécheresse suivant deux approches. La première approche correspond au cadre d'étude décrit par Kramer (1980), Levitt, (Levitt, 1980), puis Turner (1986, 2000) sous l'appellation de *Drought Resistance Framework*. Elle identifie classiquement trois grands types de mécanismes : l'esquive (*drought escape*), l'évitement (*avoidance* ou *dehydration postponement*) et la tolérance (*dehydration tolerance*). Chacun des grands mécanismes décrits dans cette classification est sous la dépendance d'un certain nombre de caractères plus ou moins complexes et plus ou moins faciles à identifier. L'intérêt pour la sélection variétale d'une recherche cognitive sur les réponses des plantes au niveau des organes, des cellules et des molécules est incontestable (Baker, 1989). Cependant l'amélioration individuelle des caractères associés à l'adaptation ne conduit pas toujours à des rendements augmentés en conditions de déficit hydrique (Turner *et al.* 2001 ; Ludlow et Muchow, 1990). La sélection, pour être efficace, doit s'opérer en priorité sur les caractères dont la «valeur» (pour l'élaboration du rendement) est forte relativement à d'autres caractères de résistance (Bluma, 1996).

C'est la base de la deuxième approche appelée *Yield Component Framework*. L'indice de récolte et les caractères affectant l'efficacité l'utilisation de l'eau par la plante (Passioura, 1977 ; Fisher, 1981) ont été identifiés comme les facteurs principaux d'un modèle d'élaboration du rendement en condition de déficit hydrique. Le *Yield Component Framework* décompose le rendement en composantes physiologiques théoriquement indépendantes, chacune intégrant des processus complexes.

3.1. Mécanismes de résistance et critères de sélection

Ces mécanismes décrits dans le *Drought Resistance Framework* sont les mêmes pour toutes les espèces végétales. Cependant, la variabilité génétique qu'ils présentent est dépendante de l'espèce. Or, la question de la variabilité génétique est centrale pour un programme de sélection intraspécifique. Certains caractères comme le développement racinaire et la régulation stomatique ont une valeur adaptative universelle, d'autres comme l'accumulation d'ABA ou de proline (Madhusudhan *et al.* 2002) paraissent présenter moins d'intérêt, d'autres encore comme l'ajustement osmotique semblent varier beaucoup moins chez les légumineuses que chez les céréales (Subbarao *et al.* 1995).

Les principaux caractères impliqués dans les trois grands mécanismes principaux de l'adaptation à la sécheresse, leur efficacité pour améliorer le rendement et leur facilité d'utilisation pour la sélection des légumineuses. Les principales observations expérimentales ayant conduit à cette synthèse font l'objet des paragraphes qui suivent :

3.1.1. L'esquive

L'esquive permet à la plante de réduire ou d'annuler les effets de la contrainte hydrique par une bonne adéquation de son cycle de culture à la longueur de la saison des pluies. La variabilité génétique pour la longueur de cycle est généralement importante dans les plantes et plus particulièrement chez les espèces à floraison indéterminée comme l'arachide. Le rendement de nombreuses variétés a été amélioré grâce au raccourcissement des longueurs de cycle (précocité) et ceci chez pratiquement toutes les espèces cultivées annuelles (Turner, 2001), sur les légumineuses (Subbarao *et al.* 1995), comme sur les céréales (Fukai et Cooper, 1995). Ce mécanisme est particulièrement efficace dans les environnements avec déficits hydriques fréquents en fin de cycle, schéma habituel dans les pays sahéliens.

3.1.2. L'évitement

Trois grands types de réponses permettent à la plante d'éviter ou, plus exactement, de retarder la déshydratation de ses tissus (Turner *et al.* 2001). Ce mécanisme est appelé « évitement », en anglais *avoidance* ou parfois *dehydration post-ponement*. Le premier groupe de caractères est lié à l'efficacité de l'extraction de l'eau du sol par les racines. L'aptitude des racines à exploiter les réserves en eau du sol sous stress est une réponse particulièrement efficace pour l'élaboration de la production de graines (Passioura 1977). Le deuxième type de réponse est constitué par la régulation de l'ouverture fermeture des stomates, il conditionne les échanges entre CO₂ et H₂O et par conséquent la croissance et la productivité des cultures (Ludlow et Muchow, 1990 ; Turner, 1977). Le troisième correspond à l'ajustement osmotique que les plantes réalisent en réponse au déficit hydrique (Turner, 1986). Lorsque le potentiel hydrique foliaire décroît, le potentiel de turgescence et la conductance stomatique sont maintenus grâce à une accumulation intracellulaire de solutés permis par ce mécanisme. La pertinence des caractères correspondant à ces réponses pour la sélection sera discutée pour chacune des trois formes d'évitement définies :

3.1.2.1. La capacité d'extraction de l'eau par le système racinaire

Un système racinaire capable d'extraire l'eau du sol est un trait essentiel pour la résistance à la sécheresse. Cette caractéristique revêt une importance particulière sur les cultures qui subissent régulièrement des déficits hydriques de fin de cycle (Khalifaoui, 1990 ; Subbarao *et al.* 1995).

Son impact sur le rendement est particulièrement élevé car elle intervient directement dans l'efficacité de l'utilisation de l'eau en conditions de stress, un des trois termes de l'équation de Passioura (1977). Cependant, deux types de raisons limitent beaucoup l'utilisation des critères racinaires par les sélectionneurs : L'impraticabilité du criblage au champ pour cette caractéristique sur une grande échelle et la difficulté de corrélérer des observations au champ à celles qui sont faites en pots.

L'absence d'une compréhension précise du rôle exact des racines en conditions de ressources hydriques limitées (Passioura, 1994) est un autre facteur limitant à la mise en place d'un système de criblage économe et efficace.

3.1. 2. 2. La régulation stomatique

Située à l'interface entre l'intérieur (plus ou moins turgescence) et l'extérieur (plus ou moins sec) des tissus foliaires, les stomates jouent un rôle fondamental dans la régulation des pertes en eau de l'appareil foliaire. La régulation de l'ouverture-fermeture des stomates dépend du potentiel hydrique foliaire et de l'humidité de l'air au champ (Turner, 1977). Une faible conductance conduit à une fermeture des stomates rapide en conditions de déficit hydrique. Les génotypes à faible conductance sont plus sensibles au déficit de vapeur et à la baisse du potentiel hydrique foliaire que les génotypes à forte conductance. Une faible conductance est généralement proposée comme un trait favorable à l'adaptation à la sécheresse. Cependant la fermeture stomatique réduit l'assimilation du CO₂ et conduit inévitablement à une réduction de l'activité photosynthétique.

En conséquence, l'intérêt d'une réponse stomatique plus ou moins rapide au déficit hydrique résulte d'un compromis entre la réduction de l'assimilation du CO₂ et la nécessité d'éviter la déshydratation (Ludlow et Muchow, 1990). Des différences intervariétales existent chez les légumineuses. La mesure de la conductance stomatique et de la transpiration par porométrie exige une homogénéité parfaite des conditions environnementales incompatible avec les mesures sur un grand nombre de génotypes au champ. L'évaluation des réponses des stomates par porométrie n'est donc généralement pas retenue par les sélectionneurs pour le criblage de génotypes (Clavel *et al.* 2004).

3.1. 2. 3. L'ajustement osmotique

Ce mécanisme permet de maintenir la conductance stomatique et la photosynthèse à des potentiels hydriques bas, il intervient aussi en retardant la sénescence foliaire et en améliorant l'extraction de l'eau par les racines (Turner et Jones, 1980). Le niveau d'ajustement osmotique réalisé par les légumineuses est modeste comparé à celui des céréales (Subbarao *et al.* 1995). La variabilité génétique présente a été utilisée pour sélectionner des lignées de blé et de sorgho (Morgan, 1986).

3. 2. La notion de tolérance au stress hydrique et stabilité des membranes cellulaires

En réaction à une limitation hydrique, la plante limite l'extension de son feuillage, accroît la profondeur de son enracinement. Une fermeture plus ou moins précoce des stomates s'opère afin de réduire les pertes en eau de la plante par transpiration. Cette régulation stomatique conditionne le statut hydrique des feuilles qui restent turgescentes si les stomates se ferment très vite.

Le mécanisme de tolérance des membranes cellulaires s'exprime lorsque ces dispositifs périphériques de protection des cellules ne sont plus efficaces. Le caractère de tolérance *sensu stricto* le plus connu est la résistance membranaire ou résistance protoplasmique. Elle est le plus souvent mesurée par la méthode des efflux d'électrolytes après choc osmotique au polyéthylèneglycol (Blum, 1981).

La tolérance membranaire s'exprime à un niveau particulièrement important chez les plantes dites de résurrection qui peuvent reconstituer leurs membranes après des périodes de plusieurs semaines de déshydratation (Gaff, 1980). Chez les céréales, l'existence d'une relation entre dégâts membranaires et tolérance à la sécheresse semble dépendre des génotypes utilisés. Elle a été observée sur les réponses de croissance et la productivité au champ de variétés de blé dur (Bajji *et al.* 2002). L'hypothèse que les plantes résistantes à la sécheresse au niveau cellulaire sont souvent capables de garder leurs stomates ouverts et ont donc un fort potentiel d'assimilation du CO₂ lors de sévères déficits hydriques a été émise lors d'une étude portant sur *Phaseolus vulgaris* (Costa França *et al.* 2000). Au niveau moléculaire, un ralentissement du métabolisme protéique et une augmentation du catabolisme des protéines cellulaires en réponse à la contrainte hydrique ont été observés (Vasquez-Tello *et al.* 1990) sur *Vigna unguiculata*. Sur arachide, une relation entre le niveau de tolérance membranaire de différents cultivars et le niveau d'acyl-lipide des membranes a été mise en évidence (Lauriano *et al.* 2000).

Certaines enzymes hydrolytiques impliquées dans la réponse des plantes à la sécheresse ont été précisées. Il s'agit d'acylhydrolases (Sahsah *et al.* 1998 ; Matos *et al.* 2001), d'une ascorbate peroxydase (Ferrari-Iliou, 2001) d'endoprotéases (Cruz *et al.* 2001) et de phospholipases (El Maarouf *et al.* 1999). Roy-Macauley (1992) a montré qu'il existe une relation entre le déficit hydrique, le degré de sensibilité de la plante et les activités endoprotéolytiques chez les cultivars de *V. unguiculata* testés. La plante s'autodétruit de façon plus ou moins régulée *via* diverses hydrolases pour mieux survivre au stress. Cette hypothèse est renforcée par de récents résultats sur la tolérance au stress de l'appareil photosynthétique obtenus grâce à l'utilisation de la fluorimétrie.

3. 3. Les mécanismes moléculaires de la réponse à la contrainte hydrique

Ces dernières années, un nombre important de gènes a été décrit comme répondant à la sécheresse au niveau transcriptionnel (Bray, 1997 ; Yamaguchi-Shinozaki *et al.* 2002). Les produits de ces gènes interviennent non seulement dans la tolérance au stress mais aussi dans la régulation de l'expression des gènes et dans la transduction des signaux de la réponse au stress (Fig 4). Ces produits de gènes induits par la sécheresse, ou, plus généralement, par le stress osmotique (stress hydrique, salin et du au froid) peuvent être classés en deux groupes : les protéines fonctionnelles et les protéines de régulation (fig 5).

La première étape de l'activation de ces gènes correspond à la perception du signal émis lors de la déshydratation, elle est suivie par une cascade de messagers secondaires qui modifient la concentration du Ca_2^+ intracellulaire (Fig 6). Différents récepteurs ou senseurs non spécifiques répondent à différentes contraintes abiotiques. Ils induisent tous une augmentation du Ca_2^+ dans le cytoplasme, la production d'antioxydants (Knight, 2000) et une série de phosphorylations qui activent des protéines impliquées dans la protection cellulaire ou leurs facteurs de transcription.

Par exemple, les voies d'activation des gènes codant pour des protéines de type LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) ont été trouvées sur certaines plantes très résistantes en réponse au stress hydrique (Ingram et Bartels, 1996, Thomashow, 1999). L'activation des LEA pourrait représenter les voies de réparation des dommages. La contrainte osmotique induit en particulier des changements dans la composition en phospholipides précurseurs de la production de messagers secondaires via les phospholipases (Fig 6). La phospholipase D (PLD) par exemple est activée par la sécheresse (El Maarouf *et al.* 1999). Elle est impliquée dans une cascade de signaux conduisant à la fermeture des stomates (Jacob *et al.* 1999). L'existence de cette très grande variété de gènes induits par le stress osmotique suggère des réponses complexes au niveau de la plante (Yamaguchi-Shinozaki *et al.* 2002).

3. 3. 1. Activation transcriptionnelle des gènes

De la même manière que les fonctions des gènes impliqués dans la réponse au stress sont très variées, l'activation de ces gènes est sous la dépendance de nombreux facteurs. L'acide abscissique (ABA) est produit sous l'influence du stress hydrique et son implication dans la modulation de la teneur en ARNm correspondant à nombreux gènes a été démontrée (Bray, 1997). Les voies d'activation des gènes induits par la contrainte osmotique sont soit dépendantes soit indépendantes de l'ABA (Shinozaki et Yanaguchi-Shizonaki, 2000). Les gènes induits par l'ABA sont souvent des protéines de type LEA ou déhydrine mais peuvent être aussi des gènes impliqués dans la synthèse des osmolytes, la perméabilité membranaire, le catabolisme ou la réparation cellulaire (Fig 6). L'expression de tous les gènes de type LEA est régulée de façon transcriptionnelle et sous le contrôle de l'ABA (Wang *et al.* 2003).

L'induction des gènes non gouvernés par l'ABA est modulée par des facteurs de transcription dont les séquences, les plus connues sont de type DRE (*Dehydration Responsive Element*). Ces séquences ont été caractérisées et sont activées par le stress osmotique (Lux *et al.* 1998). La surexpression des gènes codant pour des protéines de régulation de type DRE augmente la tolérance des plantes transgéniques correspondantes au froid, au sel et au déficit hydrique (Thomashow, 1999). La régulation de ces gènes par certaines enzymes fortement impliquées dans le « turn over » des protéines comme la cystéine protéinase est donc importante pour la tolérance aux contraintes. Cependant, l'utilisation de ces gènes pour la transformation doit être considérée avec prudence car de nombreux métabolites sont produits par la plante en conditions de stress et des modifications sont possibles au niveau post-transcriptionnel et de la traduction (Wang *et al.* 2003).

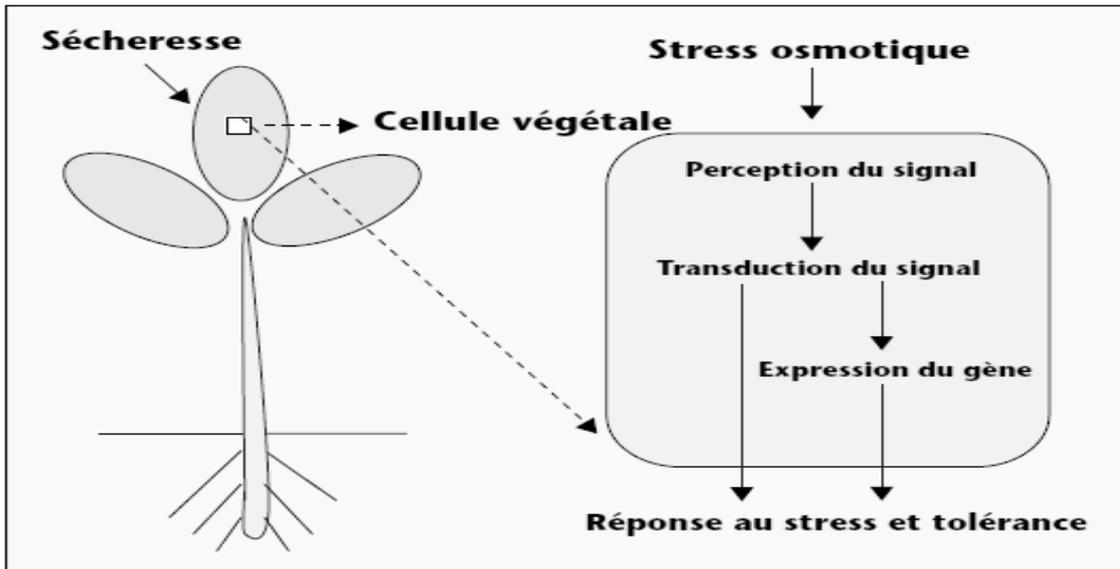


Fig 4 : Représentation schématique des réponses moléculaires à la sécheresse dans une cellule végétale (Yamaguchi-Shinozaki, 2002).

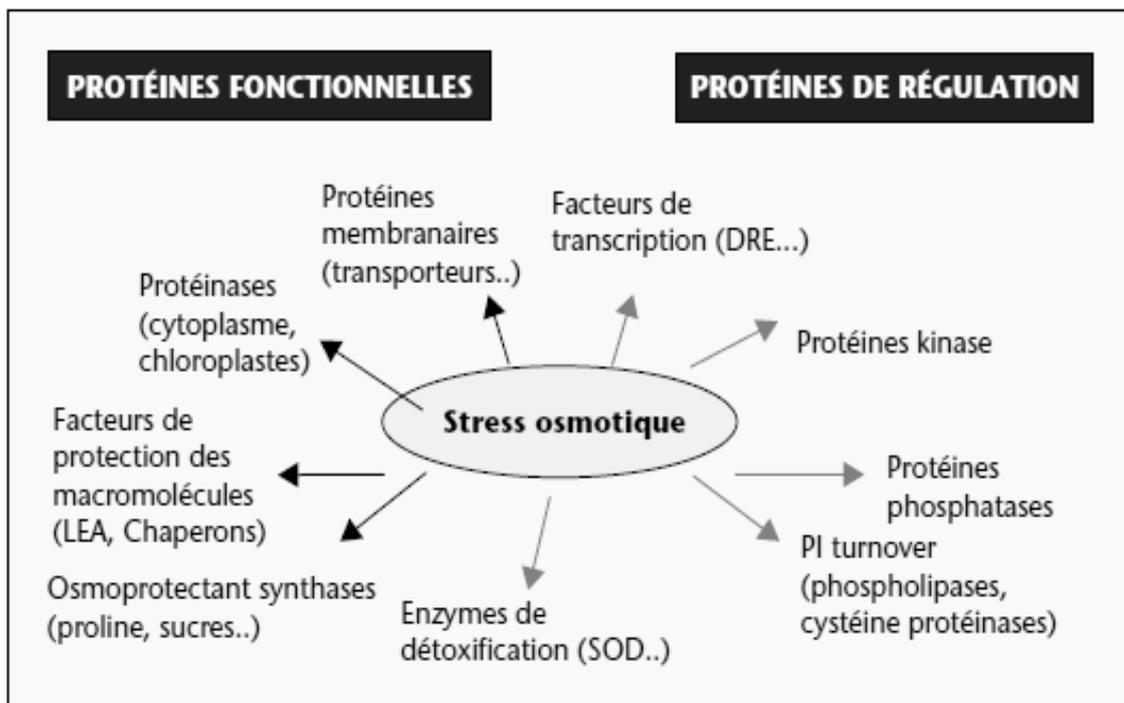


Fig 5 : Gènes induits par le stress hydrique et leur fonction possible dans la réponse à la tolérance au stress osmotique (Yamaguchi-Shinozaki, 2002).

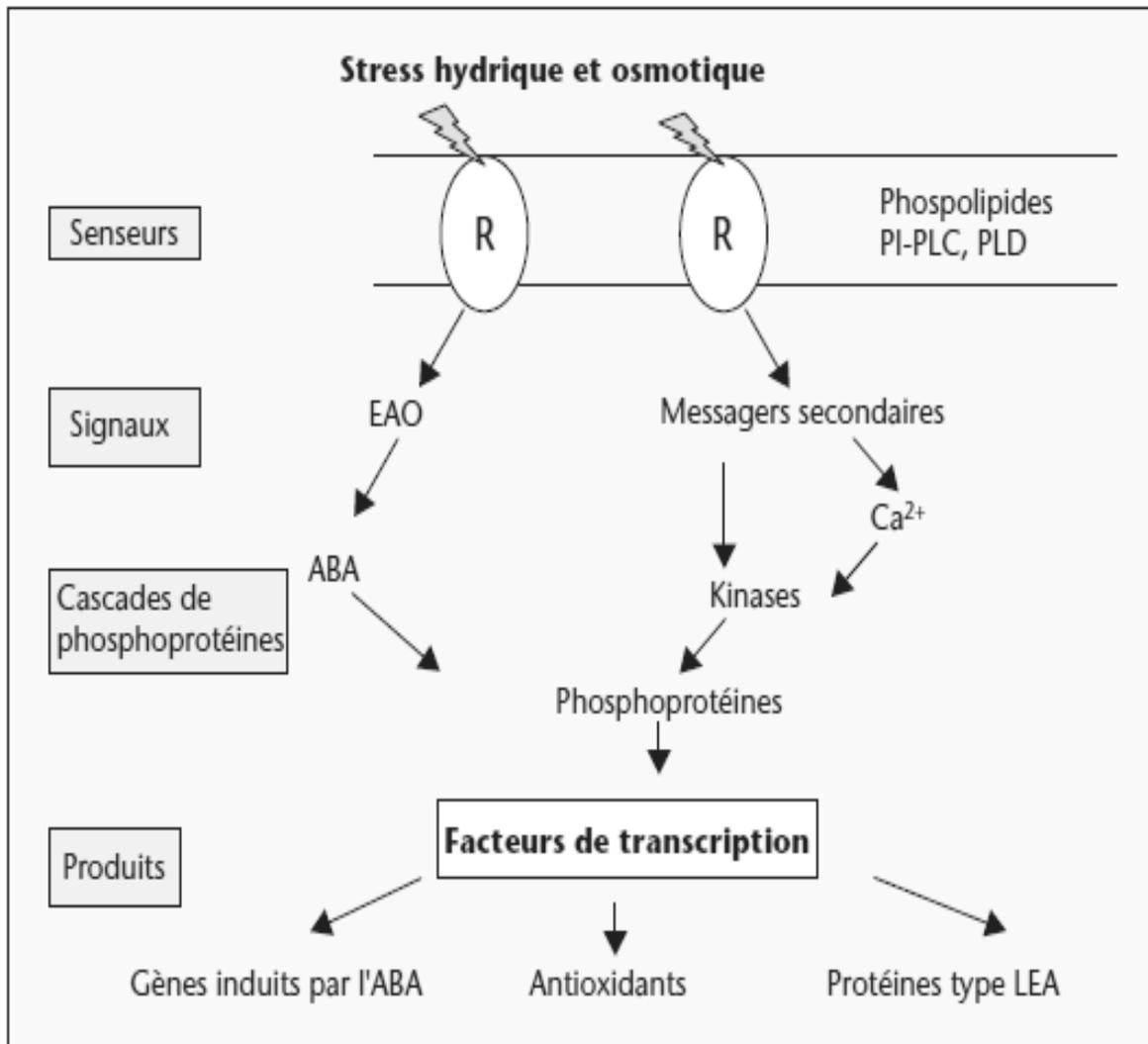


Fig 6 : Représentation schématique des principales voies de signalisation majeures et principaux produits de transcription chez les plantes en réponse au stress osmotique. R : récepteurs, EAO : espèces activées de l'oxygène, PI-PLC : phospholipase C, PLD : phospholipase D, ABA : acide abscissique, LEA : « Late Embryogenesis Abundant », (Diop, 2002).

Au cours de leur existence la plupart des plantes sont soumises à des diminutions de leur contenu relatif en eau et sont capables de produire des structures hautement résistantes à la dessiccation tels que les graines, le pollen ou les spores. Au niveau physiologique, un déficit hydrique peut se produire lors d'une sécheresse, d'un froid ou en présence de milieux salins. La plupart des dommages au niveau intra-cellulaire, ainsi que les mécanismes liés à la résistance à ce type de stress, sont encore peu connus. De nombreuses données moléculaires, permettent cependant d'élucider les principaux mécanismes cellulaires mis en place par la plante lors d'un stress hydrique. On peut résumer les processus qui surviennent lors d'un stress hydrique selon trois grandes étapes :

- Une décroissance accompagné au niveau cellulaire d'une diminution du nombre de polysomes, d'un ajustement osmotique, d'une modification de l'extensibilité des parois et d'une altération du métabolisme du carbone et de l'azote.

- Une diminution de la photosynthèse, reliée à une augmentation du taux d'ABA et aux dommages dans les thylakoïdes. En parallèle, la transpiration diminue (fermeture des stomates) en même temps que les solutés compatibles s'accumulent.

- Enfin, une activation des mécanismes liés à la tolérance tels que l'accumulation de dehydrines, de *lea*, de disaccharides ou d'enzyme impliquée dans la détoxification s'opère. La régulation de la réponse au stress ainsi que sa perception restent encore plus obscures. Là encore, des signaux de transduction impliquant l'ABA, des facteurs de transcription et certains éléments des promoteurs commencent à être caractérisés. La tolérance à un déficit d'alimentation en eau a été largement étudiée chez les plantes selon trois stratégies basées sur l'étude de systèmes tolérants de type « graines » ou « plantes reviviscentes », de mutants provenant de plantes modèles (*Arabidopsis*), et de l'effet du stress sur des plantes de grandes cultures.

Les systèmes tolérants correspondent à certaines catégories de graines (Leprince *et al.* 1993), mais aussi à des plantes telles que *Craterostigma plantagineum* ou *Mesembryanthemum crystallinum* (Cushman *et al.* 1989). Une analyse moléculaire détaillée de ce type de système peut permettre de révéler des gènes particuliers pouvant contenir l'information nécessaire à une résistance accrue face à la dessiccation. Dans un premier temps, nous verrons comment les graines passent par un étape de déshydratation poussée. Dans un second temps, nous aborderons les plantes reviviscentes qui survivent à de longues périodes de sécheresse. Enfin nous aborderons les modèles génétiques, qui reposent sur l'analyse de mutants hypersensibles ou résistants au stress hydrique, ainsi que les modèles qui reposent sur des études en conditions naturelles.

L'expression des gènes en réponse à un déficit hydrique fait intervenir une cascade de transduction du signal extrêmement complexe qui peut être divisée en plusieurs étapes. La perception du stimulus, implique l'amplification et l'intégration du signal qui va réguler l'expression des gènes. Peu de données sont disponibles concernant la perception du signal, bien que la variation de la turgescence ait été proposée comme un signal physique possible. Au niveau moléculaire, Urao *et al.* (1999) ont identifié chez *A. thaliana* une protéine membranaire (AtHK1) qui intervient dans la perception du stress hydrique. Cet osmosenseur est essentiellement présent au niveau des membranes racinaires en condition normale de croissance, et y est fortement accumulé au cours d'un stress hydrique. Il semblerait que cet osmosenseur soit directement relié à une cascade de transduction du signal, faisant intervenir des MAP-kinases. Un modèle de choix pour l'étude de la transduction du signal est la levure (*S. cerevisiae*). En effet cet eucaryote unicellulaire possède les mêmes types de signaux de transduction que ceux présents chez les eucaryotes supérieurs. Maeda *et al.* (1994 et 1995) ont par exemple isolé des osmosenseurs (récepteurs membranaires) qui interviennent dans la régulation de MAP-kinase, enzymes impliquées dans la transduction du signal. Les hormones peuvent elles aussi être impliquées dans la transmission du signal.

L'augmentation du niveau d'ABA endogène est une caractéristique d'un état de stress hydrique chez de nombreuses espèces. De nombreux gènes induits par l'ABA ont été identifiés. Cependant, tous les gènes qui répondent au stress hydrique ne sont pas forcément induits par l'ABA. Il existe donc deux types d'inductions, l'une ABA dépendante et l'autre ABA indépendante. Nous abordons dans les paragraphes suivants comment s'opère la régulation de l'expression des gènes au cours du stress hydrique, au niveau de l'ADN génomique, des promoteurs, des molécules impliquées dans la signalisation du stress, et des modifications post-transcriptionnelles et post-transcriptionnelles.

3. 3. 2. Régulation au niveau de l'ADN génomique

L'accessibilité de l'ADN génomique joue un rôle très important dans la régulation de la transcription. En effet, l'ADN génomique est une molécule dynamique qui subit des modifications organisationnelles et structurales en réponse aux stimuli. Une des modifications épigénétiques, fait intervenir la méthylation de certaines portions du génome. Il a par exemple été montré une augmentation de 16 % du taux de méthylation de l'ADN génomique sur des cultures cellulaires de pomme de terre soumises à un stress salin (Sabbah *et al.* 1995).

L'implication de ces modifications dans l'expression des gènes au cours d'un stress hydrique a par exemple été mise en évidence pour le gène codant pour la grande sous-unité de la rubisco (ou ribulose-1,5-diphosphate carboxylase / oxygénase), dans des feuilles de colza. Minati et Johnson-Flanagan (1998) ont analysé le niveau d'expression de ce gène et celui de la quantité de protéine correspondante dans des feuilles de plants acclimatés à un stress froid, comparé à celles de plants non acclimatés.

Ils ont mis en évidence une diminution de la quantité de protéine présente dans les feuilles matures de plants acclimatés. Cependant, l'accumulation de la protéine reste plus forte que celle du transcrit. Une analyse des profils de restriction de la grande sous-unité de la rubisco, au niveau de l'ADN génomique, a permis de mettre en évidence des différences de méthylation induites par l'acclimatation au froid qui semblent impliquées dans la variation de l'expression du transcrit. Les histones jouent un rôle dans la condensation de l'ADN ainsi que dans la régulation de l'expression des gènes en modulant l'accessibilité de l'ADN (Spencer et Davie, 1999). De nombreuses études ont montré des variations d'expression pour différents types d'histone au cours d'un déficit hydrique et/ou en réponse à l'ABA (Croston *et al.* 1991 ; Wei et O'Connell, 1996 ; Deuleu *et al.* 1999). Bray *et al.* (1999), ont par exemple isolé chez la tomate une histone H1 qui est accumulée au cours d'un stress osmotique (polyéthylène glycol) et qui semble impliquée dans la régulation de la transcription au cours du stress.

3. 3. 3. Etude des Promoteurs de Gènes

Les nombreux changements dans les niveaux des ARNm lors du stress hydrique sont le reflet d'activation ou d'inactivation de la transcription. Comme nous l'avons vu précédemment, l'ABA peut intervenir dans ces changements d'expression. De nombreuses études ont été réalisées afin de définir les éléments en cis et trans qui sont impliqués dans l'activation des gènes par cette hormone. Il existe des séquences régulatrices particulières telles que les séquences ABRE (ABA Responsive Element, Marcotte *et al.* 1989) qui interviennent dans la régulation de l'expression de certains gènes. Lors d'un stress hydrique, la production d'ABA stimule l'expression de facteurs de transcription qui vont se fixer sur ces courtes séquences nucléotidiques (Mundy *et al.* 1990 ; Chaudhary et Crossland, 1996). La transcription des gènes correspondants est alors activée.

Un autre type de séquences régulatrices directement reliées au stress mais indépendantes de l'ABA a également été mis en évidence. Il correspond au motif DRE (Dehydration Responsive Element ; Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki, 1994). Les séquences régulatrices ABRE et DRE peuvent être situées sur le même promoteur et induire de manière différentielle l'expression des gènes, en fonction de l'intensité et de la durée du stress.

Chez *Arabidopsis*, Yamaguchi-Shinozaki et Shinozaki (1994) ont isolé un gène nommé rd 29A qui est induit par la sécheresse, le froid ou un stress salin. Ce gène comporte au niveau de son promoteur un motif DRE qui intervient dans la réponse rapide au stress indépendamment de l'ABA, et un motif ABRE qui intervient dans une réponse plus tardive *via* l'ABA. Enfin, les protéines impliquées dans l'activation des gènes (les facteurs de transcription) présentent elles aussi des variations d'expression en fonction du stress hydrique. Il a par exemple été isolé chez *Arabidopsis* un gène nommé Atmyb2, qui appartient à la famille des MYB, dont l'expression est induite par la sécheresse ou le stress salin (Urao *et al.* 1993).

L'étude de ce facteur de transcription a permis de mettre en évidence que les motifs ABRE ou DRE n'étaient pas les seuls à réguler de manière spécifique l'expression des gènes lors d'un déficit hydrique. *A contrario*, Li et Chen (2001) ont isolé chez le riz une nouvelle classe de facteurs de transcription (*OsZFP1*) dont la quantité du messager diminue au cours du stress hydrique. Cette diminution peut être due à une inhibition de la transcription et/ou à une diminution de la stabilité des messagers. Ce résultat montre que l'adaptation au stress passe aussi par la répression spécifique de gènes, et notamment de certains facteurs de transcription.

3. 4. Tolérance au sel des légumineuses

La tolérance au sel a été beaucoup étudiée chez les halophytes (des végétaux adaptés aux milieux hypersalés ou par extension aux milieux à pression osmotique importante), pour comprendre les mécanismes développés pour leur adaptation (Munns 2002). Cependant les succès notés pour la production de variétés de plantes cultivées tolérantes au sel se sont avérés très limités. Seuls 25 cultivars tolérants à la salinité appartenant à 12 espèces ont été enregistrés (Flowers et Yeo, 1995). On peut citer l'exemple d'un cultivar pour la luzerne (Al-Doss et Smith, 1998) et un pour le Soja (Owen *et al.* 1994). Flowers et Yeo (1995) en ont conclu que la complexité du processus étudié et l'absence d'une urgence environnementale imminente sont les causes du manque d'intérêt accordé à la création de variétés adaptées. Abdelguefi.A (1978), montre que *M.truncatula* est une espèce qui semble préférer les sols assez calcaires mais pauvres en sodium et pourtant, elle tolère les teneurs élevées en sodium (400 ppm).

3.4.1. Problème de la salinité des sols

Plusieurs contraintes environnementales sont limitantes pour la croissance et le développement des légumineuses. La salinité et la sécheresse sont considérés comme deux facteurs majeurs influant l'agriculture dans les zones arides et semi arides. Approximativement 40 % des surfaces sur terre sont caractérisés par la présence d'un problème potentiel de salinité (Zahran, 1997).

Les sols salins sont caractérisés par un niveau toxique des chlorures et sulfates de sodium, la conductivité électrique des solutions de sols saturés en sel est supérieure à 4 dS / m, l'équivalent de 40 mM NaCl (Shirokova *et al.* 2000). En Algérie, 3.2 millions d'hectares de terres agricoles sont menacés par la salinité (Belkhodja et Bidai, 2004)

Les régions du bassin méditerranéen sont fortement touchées par ce fléau. D'un autre part, essayer de lutter contre la sécheresse par l'irrigation, rajoute aux sols une contrainte de salinisation dite secondaire. Dans ce contexte, améliorer la tolérance des plantes à la sécheresse et la salinité constitue une proposition attractive pour les agriculteurs. De nos jours, la pression devient plus forte pour chercher à combattre et trouver une solution à la salinité des sols pour les plantes cultivées. Cette urgence suggère que des méthodes efficaces soient requises pour améliorer la tolérance au sel pour de nombreuses variétés plantes cultivées.

De nombreuses techniques puissantes se sont développées pour altérer des gènes et leur expression dans des plantes. Mais ces techniques n'ont pas été utilisées pour l'amélioration de la tolérance aux stress abiotiques. En effet cette tolérance montre généralement une héritabilité quantitative.

3.4.2. Effet de la salinité sur les plantes

La salinité affecte différents mécanismes physiologiques et la nécessité de survivre dans un environnement salin nécessite de multiples mécanismes d'adaptation pour les plantes (Yeo et Flowers 1986). L'évolution de ces mécanismes adaptatifs implique un ensemble complexe de paramètres parmi lesquels beaucoup ne sont pas encore connus. Cette question est la question de départ que se pose un améliorateur des plantes: Comment déterminer les facteurs limitant ou bien les éléments des mécanismes qui font balancer les plantes vers une résistance ou une tolérance ?

Une approche comparative entre des plantes sensibles et résistantes doit être adoptée pour les détecter. Mais il est important que cette différence de comportements soit reliée à une différence de tolérance et pas à d'autres différences entre plantes comparées. En littérature, des comparaisons entre espèces et au sein de la même espèce ont été faites avec une comparaison physiologique. Par exemple, le cas du maïs (Maiti *et al.* 1996) et le riz (Yeo *et al.* 1990). Cependant, la compréhension des différences de mécanismes physiologiques est loin d'aboutir à une explication génétique, vu que les liens entre les gènes et la physiologie restent inaccessibles chez les plantes. Il est nécessaire donc de découvrir les bases génétiques reliées aux différences phénotypiques liées à la tolérance au sel.

3.4.3. Stratégies d'adaptations au stress salin

Les tolérances au NaCl des plantes varient beaucoup d'une espèce à l'autre, jusqu'à 100 mM de NaCl dans l'eau du sol, les rendements de l'orge, de la canne à sucre et du coton sont peu affectés, mais le *Mais*, les haricots et la luzerne présentent déjà des limitations importantes dans la production de matière sèche. Les plantes halophiles ou halophytes qui fréquentent les sols salés ou « halomorphes », c'est-à-dire chargé de chlorure de sodium et accessoirement d'autres sels, présentent des adaptations morphologiques « xéromorphoses » et des adaptations physiologiques (Laval-Martin et Mazliak., 1995). On peut classer les plantes en quatre catégories :

- Les plantes sensibles, qui commencent à être affectées « baisse de rendement de 20% pour des concentrations de 2 à 3 g / l : qui correspond à 1.5 g / Kg de sol », par exemple : le haricot (glycophyte très étudié), pois, fève, melon, lentille.
- Les plantes assez résistantes qui tolèrent de 3 à 5 g/l, exemple : luzerne âgée, trèfle d'Alexandrie, carotte.
- Les plantes résistantes: qui acceptent jusqu'à 10 g / l, comme la tomate, le maïs, l'avoine, blé, seigle, l'orge.
- Les plantes très résistantes: d'un intérêt spécial pour la culture en sol salé : épinard, betterave, choux, asperge, jusqu'à 18 g / l (Heller, 1993).

Les plantes tolèrent le sel en élevant leur propre pression osmotique interne à l'aide d'osmorégulateurs (Heller, 1993).

L'évitement qui permet le maintien du potentiel hydrique élevé dans la plante peut être obtenu par une réduction de la transpiration par la fermeture des stomates qui limitent l'assimilation du gaz carbonique et la photosynthèse, cette fermeture des stomates est sensible à des messages émis par les racines et transmis aux feuilles via le xylème, messages informant ces dernières de la réduction des disponibilités en eau du sol ; l'acide abscissique apparaît, ainsi comme une composante majeure mais non exclusive de cette signalétique racinaire (Monneveux, 1997).

Singh *et al.* 1985 ont étudié l'expression génique induite par le sel dans des cultures de cellules en suspension et dans des systèmes racinaires intacts, les racines étant les premiers organes, qui sont confrontés aux augmentations de salinité. Il a été observé que des concentrations importantes de plusieurs polypeptides s'accumulent dans des cultures de cellules de tabac soumises à de fortes concentrations de NaCl et de polyéthylène glycol (PEG). Un polypeptide de 26 KDa en particulier est induit à la fois par le NaCl et le PEG. Ce polypeptide a été appelé osmotine, en raison de son apparition dans des conditions de faible potentiel hydrique, ou de chocs osmotiques provoqués par toute une série de facteurs (Singh *et al.* 1987).

3.5. Les mécanismes antioxydants chez les plantes

Les plantes sont constamment soumises à des variations environnementales ou stress abiotique, tels que la sécheresse, le froid, des températures élevées, mais aussi des stress de type biotique. L'ensemble de ces facteurs peut provoquer une forte production des ROS, pour Reactive Oxygen Species (Price *et al.* 1995 ; Noctor et Foyer, 1998 ; Schützendubel et Polle, 2002), parmi lesquelles des radicaux libres comme les radicaux superoxydes ($O_2\cdot^-$), les radicaux hydroxyles ($OH\cdot$), et les radicaux peroxydes ($RO\cdot$), ainsi que des formes non radicales comme hydrogènes de peroxydes (H_2O_2). Ces éléments sont produits pendant la réduction de l'oxygène par les cytochromes de la chaîne respiratoire. Le chloroplaste constitue le compartiment de la photosynthèse associé à une forte énergie de transport d'électrons, et donc une réserve d'oxygène, qui peut être à l'origine de la formation des ROS (Asada, 1999). En cas d'excès, l'augmentation de radicaux libres de l'oxygène dans les cellules provoque des dommages cellulaires irréversibles, tels que la peroxydation des lipides ainsi que la dénaturation oxydative des acides aminés et des bases azotées. Ces ROS à de fortes concentrations peuvent donc être fatals pour les cellules, par l'altération des fonctions et des structures cellulaires. Cependant les plantes ont développé tout un système de défense pour se protéger contre le stress oxydatif. Ainsi, les cellules possèdent des antioxydants et des enzymes antioxydatives pour faire face aux cascades de réactions déclenchées par le stress oxydatif dans les organes cellulaires.

Parmi ces enzymes antioxydatives, les plus importantes et les plus étudiées sont la Superoxyde dismutase (SOD), l'Ascorbate peroxydase (APX), la Catalase (CAT), et la Glutathion peroxydase. Il existe aussi un ensemble de molécules antioxydantes, de faibles masses moléculaires telles que l'ascorbate, le glutathion, les composés phénoliques et les tocophérols.

3.5.1 Les oxydases alternatives (AOX)

La production de ROS, au niveau des thylakoïdes et des mitochondries, peut être réduite par un groupe d'enzymes appelées oxydases alternatives (AOX). Ces enzymes membranaires dérivent le flux d'électrons pour réduire l' O_2 en H_2O par un mécanisme très efficace ne générant pas de ROS (Maxwell *et al.* 1999; Yoshida *et al.* 2006). La présence de ces AOX réduit la production d' O_2 au niveau des CTE en limitant la saturation de ces chaînes, mais aussi en diminuant la teneur en O_2 à proximité de celles-ci.

3.5.2 Les antioxydants

3.5.2.1 Définition

Peut être considérée comme antioxydante une molécule qui, étant présente en une faible concentration par rapport à celle d'un substrat oxydable, retarde ou empêche significativement l'oxydation de ce substrat (Halliwell et Whiteman, 2004).

3.5.2.2. Les principaux systèmes non enzymatiques

3.5.2.2.1. L'ascorbate ou vitamine C

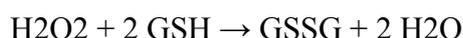
L'acide L ascorbique (ASC) est un des principaux acides faibles de la cellule végétale. Aux pH physiologiques, il se dissocie en anion ascorbate. L'ascorbate est essentiellement utilisé au niveau cellulaire comme un donneur d'électrons. Le premier produit de la réaction d'oxydation de l'ascorbate est le radical monodéhydroascorbate (MDHA ; Fig 7). Du fait de son électron libre très excentré, le MDHA n'est pas très réactif avec les autres molécules biologiques (Navas *et al.* 1994). De plus, étant relativement instable, il se transforme spontanément en ASC et déhydroascorbate (DHA) à une vitesse comprise entre 105 et $2,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ à pH 7 (Heber *et al.* 1996). Le DHA est également une molécule instable et subit rapidement une hydrolyse conduisant à la formation d'acide 2,3-dikétogulonique (DKG ; Deutsch, 1997, 2000).

L'ascorbate est présent dans tous les compartiments cellulaires, ainsi que dans la matrice extracellulaire. Contrairement aux cellules animales, la concentration en ASC est très élevée dans les cellules végétales (plusieurs millimolaires) ce qui en fait un composant incontournable chez les plantes. Il interviendrait notamment dans la régulation du cycle cellulaire et dans l'extension de la paroi (Horemans *et al.* 2000). L'ascorbate est toutefois beaucoup plus connu pour ses propriétés antioxydantes (Navas *et al.* 1994 ; Mehlhorn *et al.* 1996 ; Horemans *et al.* 2000 ; Turcsanyi *et al.* 2000; Potters *et al.* 2002; Pignocchi et Foyer, 2003 ; Chen et Gallie, 2004 ; Foyer et Noctor, 2005 a). En effet, il réagit rapidement avec l'anion superoxyde et l'oxygène singulet, ou encore avec le peroxyde d'hydrogène, mais cette dernière réaction est catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). L'ascorbate est indispensable par sa capacité à réduire d'autres antioxydants oxydés comme la vitamine E ou les caroténoïdes (Asada, 1994).

3.5.2.2.2 Le glutathion

Le glutathion est un thiol très abondant se retrouvant de façon ubiquitaire chez les plantes, les animaux et les végétaux. Le glutathion est presque présent dans tous les compartiments cellulaires, principalement le cytosol et le chloroplaste. Il possède deux formes redox distinctes. La forme réduite (GSH) est un tripeptide (γ -Glu-Cys-Gly), stable, à fort pouvoir réducteur et très soluble dans l'eau. Toutes ces caractéristiques en font un donneur d'électrons adéquat dans les réactions physiologiques. L'oxydation du glutathion entraîne la formation d'un pont disulfure entre les cystéines de deux GSH. Cette forme oxydée du glutathion est appelée GSSG (Fig 8). En conditions non stressantes, les cellules maintiennent un ratio GSH/GSSG très important, supérieur à 100 dans le cytosol et la mitochondrie (May *et al.*, 1998 ; Noctor *et al.* 1998).

La concentration en GSH est très importante dans les cellules végétales, et en particulier dans les chloroplastes où elle peut atteindre 5 mM (Noctor *et al.* 1998). Le glutathion joue de nombreux rôles physiologiques chez les végétaux (May *et al.* 1998 ; Noctor *et al.* 1998). Il représente une forme importante de stockage de sulfure réduit, et participe à l'allocation en sulfure des différents compartiments cellulaires et des différents organes (Herschbach et Rennenberg, 1991 ; Lappartient et Touraine, 1996). C'est également un régulateur de l'expression génique (Wingate *et al.* 1988 ; Baier et Dietz, 1997) et le précurseur des phytochélatines (PC) jouant un rôle prédominant dans la séquestration des métaux chez les végétaux (Grill *et al.* 1989 ; Clemens, 2006 b ; Clemens, 2006 a). Le GSH sert également de substrat pour la glutathion S-transférase (GST) qui catalyse sa conjugaison avec des xénobiotiques, participant ainsi à leur détoxification (Marrs, 1996). Il est impliqué dans la régulation redox du cycle cellulaire (Gyuris *et al.* 1993 ; Noctor *et al.* 1998). Du fait de sa forte concentration dans les tissus végétaux et de son fort pouvoir réducteur, le GSH participe au statut redox cellulaire en jouant le rôle de tampon redox dans les cellules (Noctor *et al.* 1998 ; Foyer et Noctor, 2000 ; Foyer *et al.* 2001; Foyer et Noctor, 2003 ; Foyer et Noctor, 2005 b, a ; Noctor, 2006). La synthèse de GSH est stimulée lors des différentes situations de stress et son accumulation est souvent concomitante avec celle des ROS (May *et al.* 1998 ; Noctor *et al.* 1998 ; Potters *et al.* 2002). Le GSH peut directement réduire l'H₂O₂ mais également d'autres ROS, des hydroperoxydes organiques et des peroxydes lipidiques :



Un autre rôle important du GSH dans la régulation des ROS est son implication dans la régénération de l'ascorbate via le cycle enzymatique dit ascorbate /glutathion.

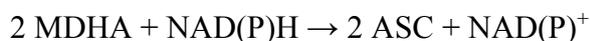
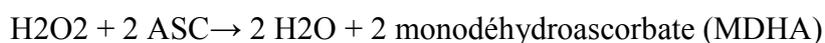
3.5.2.3. Les principales enzymes antioxydantes

En sus des différentes molécules antioxydantes, les cellules végétales possèdent de nombreuses voies de dégradation enzymatique des ROS. Certaines enzymes n'utilisent pas de co-substrat pour réduire les ROS. Au contraire, d'autres utilisent plusieurs co-substrats dont certains antioxydants que nous venons de voir (ASC, GSH).

3.5.2.3.1 Les enzymes du cycle Asada-Halliwell-Foyer

Le cycle Asada-Halliwell-Foyer est un cycle composé de quatre enzymes conduisant, par des réactions d'oxydoréduction successives, à la réduction de l'H₂O₂ par l'ascorbate peroxydase (APX) via l'oxydation d'ascorbate, et la régénération du pool d'ascorbate (Fig 9).

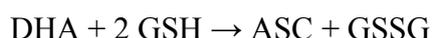
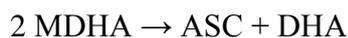
L'APX (EC 1.11.1.11), peroxydase de classe I, est une métallo-enzyme contenant un groupe ferriprotoporphyrine IX. Elle est présente dans tous les compartiments cellulaires, dans le cytosol et dans l'apoplaste, sous forme soluble ou liée aux membranes (Asada, 1999 ; Foyer et Noctor, 2000 ; Mittler, 2002 ; Asada, 2006). L'APX catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en utilisant l'ascorbate comme co-substrat. Le MDHA issu de cette réaction peut ensuite être pris en charge par la monodéhydroascorbate réductase (MDHAR ; EC 1.6.5.4) catalysant sa réduction en ASC en utilisant du NAD(P)H :



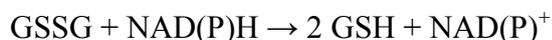
Néanmoins, la situation est un peu plus compliquée, puisque le MDHA est aussi un accepteur d'électrons pouvant être réduit directement par dérivation des électrons de la Chaîne de Transport d'Electrons (CTE) chloroplastique (Miyake et Asada, 1994). Le MDHA rentre en compétition avec le NADP⁺ pour accepter l'électron libéré par la ferrédoxine au niveau du PSI :



Comme nous l'avons vu précédemment, le MDHA est une molécule instable se dismutant en ASC et déhydroascorbate (DHA). La deuxième enzyme intervenant dans la régénération de l'ascorbate, la déhydroascorbate réductase (DHAR ; EC 1.8.5.1), catalyse la réduction du DHA en ASC, via l'oxydation de deux molécules de GSH :



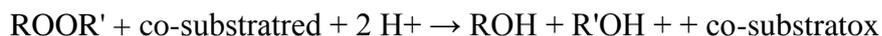
La dernière réaction de ce cycle est la réduction du GSSG par une flavoprotéine, la glutathion réductase (GR ; EC 1.8.1.7), utilisant pour cela du NAD(P)H comme cofacteur :



L'ensemble des enzymes de ce cycle se retrouvent sous forme soluble dans le stroma du chloroplaste, dans les mitochondries ou dans le cytosol (Low et Merida, 1996 ; Bartosz, 1997 ; Sies, 1997 ; Wojtaszek, 1997; Inze et Montagu, 2001 ; Arora *et al.* 2002; Langebartels *et al.* 2002). Ces différentes enzymes, à l'exception d'une MDHAR liée à la membrane plasmique, semblent absentes de l'apoplaste, zone où, pourtant, la quantité d'ROS produite est importante (Horemans *et al.* 2000 ; Potters *et al.* 2002 ; Pignocchi et Foyer, 2003). A notre connaissance, une seule étude effectuée sur des feuilles de pruniers infectés par un virus, fait état de la présence d'APX dans l'apoplaste (Diaz-Vivancos *et al.* 2006).

3.5.2.3.2. Les peroxydases (POX)

Les POX (EC 1.11.1.x) sont une large famille multigénique d'enzymes hémiques catalysant la réduction d'un substrat oxydé en utilisant de nombreux co-substrats comme donneurs d'électrons. Pour la majorité de ces enzymes, le substrat optimal est le peroxyde d'hydrogène, mais elles peuvent facilement réduire des hydroperoxydes organiques ou des peroxydes lipidiques :



Dans certaines conditions, une partie des POX (classe I et III) peut avoir une activité similaire à la catalase (catalase-like), c'est-à-dire qu'elles possèdent la capacité de réduire l'H₂O₂ en absence de co-substrat (Mika *et al.* 2004).

Au niveau cellulaire, la répartition des POX est très nette. Les POX de classe III se trouvent dans l'apoplaste sous forme soluble ou liées aux parois et membranes. Les POX de classe I, dont l'APX est la représentante majoritaire, sont présentes uniquement à l'intérieur des cellules.

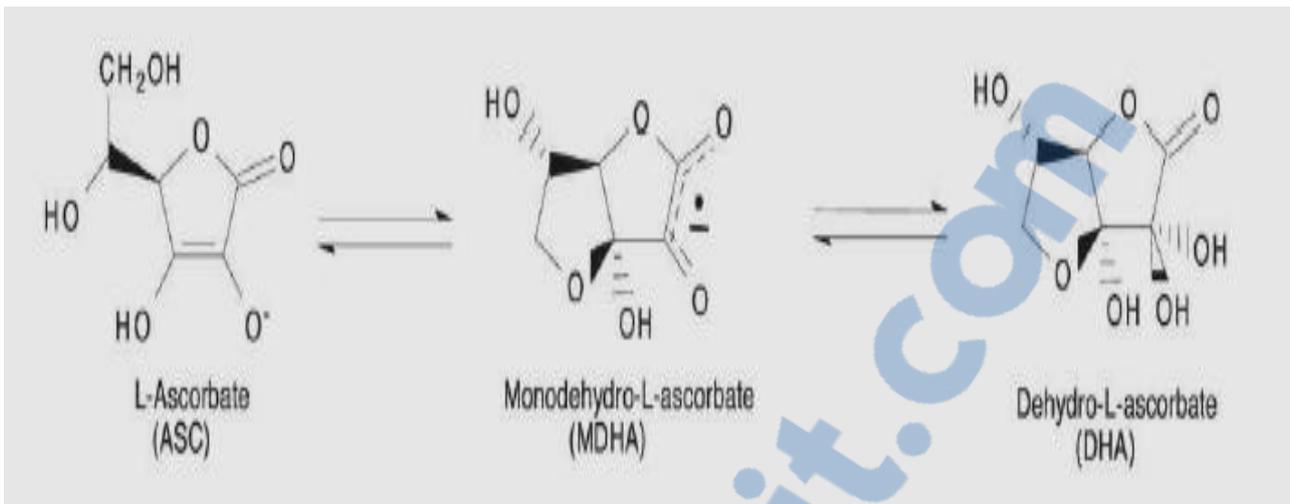


Fig 7 : Formes redox de l'ascorbate (Potters *et al.* 2002).

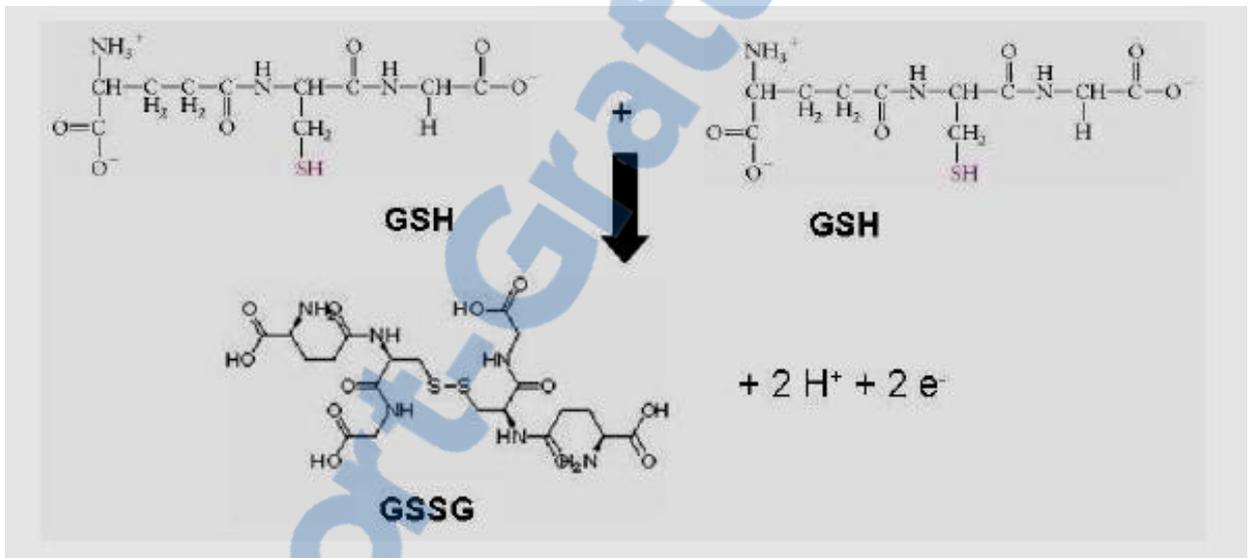


Fig 8 : Oxidation de deux molécules de GSH conduisant à l'établissement d'un pont disulfure et la formation de GSSG.

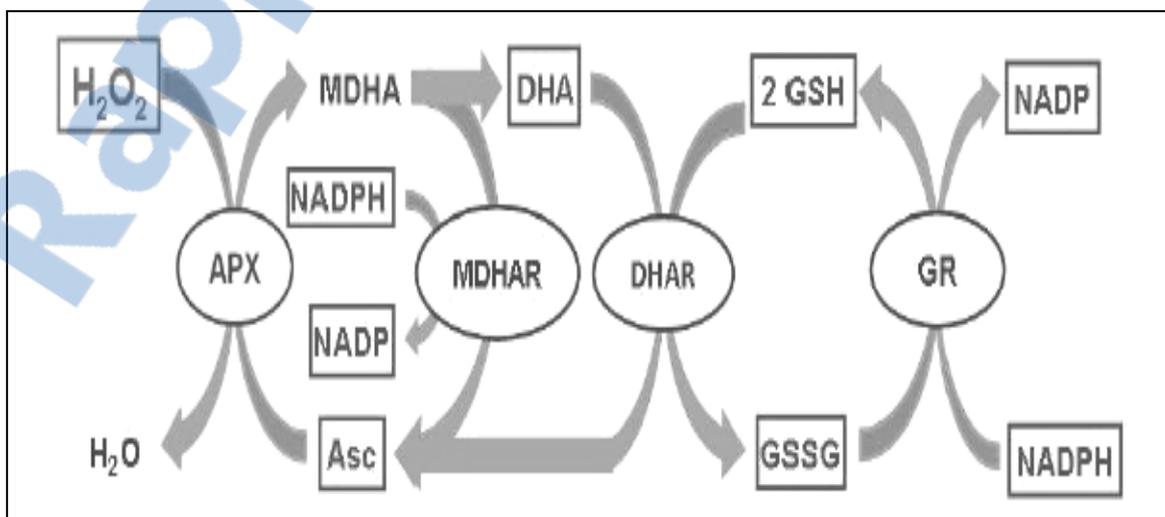


Fig 9 : Cycle Asada-Halliwell-Foyer (Potters *et al.* 2002).

4. Variabilité Génétique des Plantes

4.1. L'origine de la diversité génétique

La diversité génétique est une composante essentielle de la biodiversité. Elle décrit la variabilité des gènes entre ou à l'intérieur des espèces et de leurs populations. L'intérêt actuel porté à la biodiversité montre à quel point il est nécessaire de veiller au maintien d'une ressource génétique suffisamment large pour garantir l'adaptation des organismes face aux changements environnementaux directs (les exploitations forestières et les changements d'usage des terres par exemple) et indirects sur le long terme (changements climatiques globaux). En effet, cette diversité génétique est très importante car elle représente le support de base sur lequel peut agir la sélection. Il est admis que plus la diversité est grande dans un groupe d'individus (sous-population, population, espèce) plus il sera facile pour certains individus de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. En plus de permettre une plus grande adaptabilité des individus, elle permettra également de réduire la dépression de consanguinité et diminuera ainsi le risque d'extinction (Frankham, 2003).

L'étude de la diversité génétique à différents niveaux hiérarchiques d'organisation peut apporter une aide précieuse à la biologie des populations et à la biologie évolutive ; deux disciplines importantes pour la biologie de la conservation. La diversité génétique est alors devenue un outil primordial pour définir des buts, des méthodes et des priorités dans des programmes de conservation (Stockwell et *al.* 2003). Le polymorphisme génétique est à la base de la diversité génétique, il correspond à des variations de séquences d'ADN au sein d'un groupe d'individus. Ces variations naturelles sont dues à des mutations successives au cours de l'évolution qui permettent de caractériser la diversité génétique entre individus et populations.

En général, la majorité des polymorphismes sont neutres (Kimura 1968, 1983), mais une partie de ces variations peut influencer les différences phénotypiques observées entre individus qui pourront leur permettre d'avoir une meilleure fitness dans leur environnement. Le polymorphisme peut nous renseigner sur les différents processus qui façonnent la variabilité génétique. Ils peuvent être de nature démographique (taille des populations, migrations) et sélectif (lié à l'environnement). L'étude de l'importance relative de ces différentes composantes façonnant le polymorphisme permet de mieux comprendre l'histoire évolutive des populations et des espèces. Le niveau de diversité génétique des populations et des variations de fréquences alléliques dépend de l'action respective de quatre forces évolutives pouvant interagir les unes avec les autres : la mutation, la sélection, la migration et la dérive. Elles sont à l'origine de la structure de la diversité génétique et de son évolution.

4.1.1. La Diversité Génétique en Agriculture

La diversité génétique dans les écosystèmes agricoles peut être subdivisée en deux catégories :

- La diversité planifiée : qui comprend la diversité génétique parmi les espèces de plantes cultivées (Vandermeer *et al.* 1998). Ces ressources tant végétales sont à la base de la production agricole.
- La diversité associée : qui comprend la diversité entre les espèces végétales présentes dans les écosystèmes agricoles (Biala *et al.* 2005).

Par rapport à ces définitions, les prairies pluriannuelles et les pâturages, tels qu'on les rencontre fréquemment en Europe centrale, occupent une position intermédiaire. Ils sont bien exploités, au sens agricole du terme, mais leur diversité génétique n'est influencée par les agriculteurs qu'au commencement. Par la suite, cette diversité est influencée de façon prépondérante par l'environnement et par le mode d'exploitation. On constate qu'une forte intensité d'exploitation peut exercer des effets négatifs sur la diversité génétique (Peter-Schmid *et al.* 2008). La diversité génétique, la variété des gènes et des allèles à l'intérieur d'une espèce, définit l'élément de base de la biodiversité. C'est une condition essentielle pour la productivité et la durabilité des systèmes de production agricole

4.1.2. Détermination de la diversité génétique

Au cours des dernières décennies, une intensification générale des pratiques agricoles a fortement réduit la diversité planifiée parmi les espèces végétales et animales. Ainsi, en Allemagne ou en Finlande par exemple, presque toutes les variétés locales de céréales cultivées autrefois ont disparu (Hammer et Diederichsen 2009) ; en Hollande, le nombre des races locales de bovidés a diminué de quelque 90 % au cours des 30 dernières années (Buiteveld *et al.* 2009). Bien que des études isolées documentent ces pertes, il manque des méthodes fiables et simples qui permettent de suivre l'évolution de la diversité génétique dans l'agriculture. Pour cette étude, a été mis au point et utilisé un questionnaire qui permet une évaluation grossière de la diversité génétique de variétés de plantes et de races d'animaux. En plus, il a été déterminé l'influence du mode d'exploitation et celle de facteurs environnementaux sur la diversité génétique du dactyle (*Dactylis glomerata*), une espèce que l'on rencontre fréquemment dans les prairies et les pâturages, au moyen de marqueurs génétiques moléculaires. herbagères différentes.

La diversité génétique de 60 populations provenant des trois études de cas régionales a été déterminée au moyen de 29 marqueurs SSR (*simple sequence repeat*) (Last *et al.* 2013). Les profils des marqueurs SSR de chaque plante ont été comparés entre eux et la diversité génétique a été définie à l'intérieur des populations, entre les populations et entre les régions étudiées.

Comme mesure de la diversité génétique dans les populations, on a pris en compte l'hétérozygotie moyenne attendue (HE) et la diversité génotypique selon Shannon (HG). L'influence du mode d'exploitation a été examinée à l'aide d'analyses de corrélation et de statistiques multivariées.

4. 2. Notion de vulnérabilité et érosion génétique

La vulnérabilité génétique a été définie comme «la situation que l'on observe lorsqu'une plante de grande culture est constamment sensible aux attaques des ravageurs, d'un agent pathogène ou au risque écologique du fait de sa constitution génétique, ce qui crée des possibilités de pertes importantes de cultures». L'érosion génétique, d'autre part, a été définie comme «la perte de gènes individuels et de combinaisons de gènes (par exemple, de groupes de gènes) telles qu'on les retrouve dans les variétés adaptées aux conditions locales. Le terme 'érosion génétique' est parfois utilisé stricto sensu, c'est-à-dire la perte de gènes ou d'allèles, et parfois lato sensu pour indiquer la perte de variétés en général». Ainsi, bien que l'érosion génétique n'implique pas nécessairement l'extinction d'une espèce ou d'une sous-population, elle signifie par contre la perte de variabilité et, par conséquent, la perte de flexibilité (Heywood et Dulloo, 2005). Ces définitions prennent en compte les deux aspects de la question de la diversité, c'est-à-dire la richesse et l'homogénéité. La richesse concerne le nombre total d'allèles et l'homogénéité, la fréquence relative des différents allèles.

4.2.1. Indicateurs de la vulnérabilité et de l'érosion génétique

Au cours de la dernière décennie, l'intérêt pour la mise en place d'indicateurs directs et indirects de la vulnérabilité et de l'érosion génétiques a augmenté, en raison, au moins en partie, du manque de preuves concrètes des deux processus. Le Programme 2010 d'indicateurs de biodiversité, regroupe un grand nombre d'organisations internationales pour élaborer ces indicateurs qui permettent de surveiller les tendances de la diversité génétique. Cependant, à ce jour, il n'y a pas vraiment d'indicateurs pratiques, instructifs et généralement acceptés, pour l'érosion génétique qui soient disponibles. Par conséquent, leur développement devrait être une priorité. Plusieurs qualités sont importantes pour que ces indicateurs soient efficaces:

- être sensibles aux changements dans la fréquence des allèles importants, et être en mesure de leur donner plus de poids qu'aux allèles moins importants: la perte d'un allèle dans un locus de microsatellites hautement polymorphiques, par exemple, est probablement d'une importance moindre par rapport à la perte d'un allèle de résistance aux maladies;
- fournir la mesure de l'ampleur de la perte potentielle, par exemple en évaluant la fraction d'information génétique en danger par rapport à la diversité totale;

- permettre d'estimer la probabilité de la perte tout au long d'une période de temps spécifique, en l'absence d'intervention humaine.

Les indicateurs pour l'évaluation de la vulnérabilité génétique devraient prendre en compte non seulement l'étendue de l'uniformité génétique en soi, mais considérer également les possibles interactions génotype avec environnement. Un génotype donné (population ou variété) pourrait succomber face à un stress biotique ou abiotique de façon différente selon l'environnement.

Quelques indicateurs utiles de la vulnérabilité génétique pourraient être les suivants :

- le degré de la diversité génétique des gènes qui confèrent la résistance ou la tolérance face aux principaux ravageurs et maladies, tant réels que potentiels, ou face aux stress abiotiques;
- le degré de la diversité dans les interactions hôte - microorganismes et la présence de réponses différentielles aux différents biotypes de ravageurs et de maladies: cet indicateur fournirait des informations sur la variété des mécanismes d'adaptation disponibles pour faire face à une situation et, par conséquent, sur la probabilité d'un changement de la population pathogène donnant lieu à une virulence généralisée;
- la présence de graves goulots d'étranglement génétiques lors de la domestication, de la migration ou de la sélection: les indicateurs d'un goulot d'étranglement génétique pourraient provenir des données moléculaires, des informations historiques ou des analyses généalogiques;
- le degré de domination de chaque variété sur de grandes surfaces pourrait représenter un premier indicateur utile pour l'évaluation de la vulnérabilité génétique, en supposant que la vulnérabilité génétique est plus élevée lorsque de grandes surfaces sont cultivées avec une seule variété;
- les distances génétiques entre les lignées parentales d'une variété pourraient être un indicateur supplétif, dans certaines circonstances, du degré d'hétérogénéité et, par conséquent, de vulnérabilité de la variété.

4.3. Approches de la diversité moléculaire

4.3.1. Marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité génétique

La valeur phénotypique d'un individu dépend du génotype (facteurs génétiques) mais aussi des conditions environnementales. La génétique quantitative a permis de modéliser la transmission génétique de caractères ayant une distribution quantitative. L'utilisation de marqueurs moléculaires liés aux facteurs génétiques contrôlant l'expression de caractères d'intérêt agronomique, et le développement de cartes génétiques à haute densité permettent d'accéder à des informations précises : le nombre et l'effet des gènes intervenant dans l'expression d'un caractère, leur localisation sur les chromosomes et leur mode d'action. Un marqueur moléculaire est un locus génétique qui renseigne sur le génotype de l'individu (utilisation en génétique des populations) ou sur le génotype des locus voisins (utilisation en sélection assistée par marqueurs). Il existe plusieurs types de marqueurs, que l'on peut classer en fonction du polymorphisme qu'ils détectent.

Certaines techniques ont l'avantage de révéler de nombreux fragments simultanément, ce sont des techniques de révélation « en masse » de polymorphisme. Il existe aussi des stratégies permettant de détecter du polymorphisme de façon individuelle. L'étude de la diversité ou polymorphisme génétique est liée au développement de la biologie qui a permis le développement de plusieurs marqueurs à savoir les marqueurs morphologiques, les marqueurs biochimiques et les marqueurs moléculaires.

Les marqueurs morphologiques et biochimiques ont largement contribué aux études de la diversité chez les plantes. Ces marqueurs présentent des limites majeures en comparaison avec les marqueurs moléculaires. Les marqueurs morphologiques étant polymorphes, peuvent interférer avec d'autres caractères et sont parfois influencés par le milieu. Les marqueurs biochimiques quant à eux présentent l'inconvénient d'être faiblement polymorphes.

Les marqueurs moléculaires dont le nombre ne cesse de croître avec le développement des techniques de biologie moléculaire (depuis les RFLP, RAPD, AFLP, SSR, ISSR jusqu'aux SNP) ont fait un large consensus en matière de génétique selon leurs avantages respectifs. L'utilisation de ces marqueurs est basée sur la notion du bon marqueur moléculaire qui doit être : Polymorphe, codominant, non épistatique et indépendant du milieu. Le choix d'un bon marqueur par le chercheur est aussi basé sur la technicité et le coût de l'expérience qui doivent être abordables en vue d'une manipulation à grande échelle. Les marqueurs moléculaires ont été largement utilisés chez les animaux et les plantes pour des études de base ainsi qu'appliquées.

L'une des utilisations majeures des marqueurs moléculaires étant l'élaboration physique et génétique des cartes chromosomiques. Ces marqueurs ont contribué aux travaux d'amélioration des plantes (Lefort-Buson *et al.* 1990 a et 1990 b) en assurant une sélection indirecte moyennant des marqueurs moléculaires liés à des caractères d'intérêt ou quantitative traits loci (QTL).

Ces marqueurs présentent l'avantage d'être indépendants à l'environnement d'où la possibilité de les caractériser à différents stades de développement de la plante. Ces marqueurs ont été aussi adoptés pour toutes les études de génétique des populations et d'écologie (Haig, 1998) permettant l'analyse de la structure et du niveau de la diversité des populations; l'élaboration d'hypothèses sur le flux des gènes et la sélection des espèces. Les marqueurs moléculaires sont actuellement très utilisés pour la caractérisation des germplasmés et l'identification génétique des espèces en particulier dans le but de la traçabilité.

4. 3.2. Les marqueurs Microsatellites

Les microsatellites ou séquences simples répétées (SSR) sont polymorphes constitués de séquences répétées en tandem (1-6 bp). La variation du nombre de répétitions du motif de base qui émane des erreurs survenues lors de la réplication d'ADN (Jarne et Lagoda, 1996), ce qui constitue la base du polymorphisme. Ces différences sont révélées sur gel polysaccharide où les motifs en tandem migrent en fonction de leur poids. Par ailleurs, ces marqueurs sont adaptés aux études de populations étroitement apparentées et permettent même les comparaisons entre individus ou cultivars (Takezaki et Nei, 1996 ; Westman et Kresovich, 1997 ; Hokanson *et al.* 1998). Grâce à leur grand contenu informatif, 10 à 20 loci suffissent pour distinguer des génotypes très proches. Ils ont été utilisés aussi bien dans l'étude de la diversité génétique que dans l'élaboration des cartes génétiques du blé, de l'orge et du soja (Röder *et al.* 1995 ; Peakall *et al.* 1998 ; Ramsay *et al.* 2000).

Les SSR sont ``ubiquitaires``chez les procaryotes et les eucaryotes et sont présents même dans les génomes bactériens les plus petits (Field and wills, 1996 ; Hancock, 1996). Les microsatellites peuvent être présents au niveau des séquences non codantes et aussi codantes. La technique SSR se base sur l'amplification par PCR de l'ADN génomique moyennant des amorces spécifiques flanquant les séquences répétées et la séparation des amplifias par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les SSR se sont révélés des marqueurs moléculaires très utiles dans la sélection assistée par marqueurs, l'analyse de la diversité génétique et l'analyse de la génétique des populations chez plusieurs espèces (Gupta 2000, Budak *et al.* 2003). En plus, ce sont de marqueurs multi-alléliques d'où leur usage dans les études phylogénétiques et de l'évolution des espèces. Ainsi, Mhameed *et al.* (1997) utilisant ces marqueurs ont pu établir un arbre phylogénétique composé de *Persea americana* et ses espèces sauvages.

4.4. Analyse de la variabilité génétique

L'étude de la variabilité moyennant les marqueurs moléculaires cités précédemment permet de générer des résultats sous forme de tableaux complexes avec un ensemble de variables nombreuses et souvent de typologie diverses. Les méthodes statistiques uni- ou multi variées permettent l'analyse de la similarité et de la diversité entre les entités étudiées ainsi que le calcul des paramètres génétiques des différentes populations. Les résultats obtenus peuvent être aussi résumé et classés en groupes grâce à des techniques descriptives telles que les analyses factorielles et les méthodes de classifications.

4.1.1 Méthodes de classification

La classification hiérarchique ou hierarchical clustering permet le regroupement ou le clustering d'un ensemble d'échantillons en se basant sur la notion de distance afin d'établir un dendrogramme. En effet, le clustering consiste en le regroupement des échantillons en groupes / sous-groupes ou clusters partageant des caractéristiques communes. Les méthodes de classification sont des méthodes non paramétriques ne considérant qu'une seule hypothèse qui stipule que plus deux entités sont similaires plus elles ont de chance à faire partie du même groupe. Pour réaliser un bon clustering nous devons choisir le coefficient ou indice de similarité adéquat. Celui-ci, dépend essentiellement du type de données à analyser. On distingue ainsi les indices de similarités binaires traitant les données discrètes de type (présence / absence) et les indices de similarités quantitatifs. Ces indices sont aussi classés selon qu'ils traitent ou pas la co-occurrence du zéro ou double absence comme étant une ressemblance. On parle ainsi d'indices symétriques pour le cas des indices qui considèrent la double absence comme de la double présence, par opposition aux autres indices asymétriques.

4.4.1.1. Indices de similarités binaires symétriques :

L'indice représentant cette catégorie est l'indice de SOKAL et MICHENER qui représente le nombre de présences ou d'absences simultanées divisé par le nombre total de relevés.

4.4.1.2. Indices de similarités binaires asymétriques :

Les indices représentant cette catégorie sont l'indice de Jaccard et Sorensen. L'indice de JACARD, le plus utilisé, représente le nombre de cas de présences simultanées des deux échantillons considérés, divisé par le nombre de cas où au moins l'un des deux est présent. L'indice de SORENSEN (S) est assez similaire à l'indice de JACARD, avec une pondération par 2 du terme de co-occurrence. A partir des indices de similarités binaires on peut déduire les indices de distances D comme suit: $D=1-S$.

5. Aspect Génomique de *Medicago truncatula* Gaertn

5. 1. Outils génétiques et génomiques disponibles

M. truncatula, avec un petit génome approximativement de 500 Mbp, a été largement acceptée comme plante modèle pour des aspects multiples de la génétique de légumineuse et de génomique (Cook, 1999). Plusieurs projets à grande échelle sur la génomique de *M. truncatula* ont été lancés par la communauté internationale et des outils essentiels sont développés pour la génomique structurale et fonctionnelle suite au développement des ressources bioinformatiques (Frugoli et Harris 2001). L'analyse génétique d'un organisme exige la mise en œuvre de méthodes et techniques diverses qui vont permettre d'ordonner les gènes, de les localiser sur le génome et enfin de les cloner. La création de cartes génétiques et génomiques est donc indispensable. En outre, l'analyse comparative de ces cartes d'organismes différents permet d'étudier l'évolution de leurs génomes (Zhu *et al.* 2005).

Parmi les marqueurs possibles disponibles, les microsatellites sont généralement utilisés pour de nombreux projets génétiques en raison de leur grande reproductibilité et de la facilité d'identifier des allèles. Les microsatellites sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont l'unité de répétitions varie d'une à six pb. Dans la littérature, on les appelle aussi: simple séquence repeats (SSR), short tandem repeats (STR), ou variable number tandem repeats (VNTR). Les principales contraintes des SSRs, en tant que marqueurs moléculaires, sont l'effort et le coût exigé pour leur développement. Pour cette raison leur utilisation a été limitée à quelques espèces importantes sur le plan agricole.

La recherche des SSRs a été récemment centrée sur les EST (Expressed Sequence Tag) - SSRs, qui sont relativement peu coûteux comparés au développement de SSRs génomiques (Gupta *et al.* 2003) puisqu'ils sont identifiés dans des séquences nucléotidiques. Ces marqueurs sont plus transmissibles aux genres étroitement liés puisqu'ils sont ancrés dans des régions conservées transcrites (Decroocq *et al.* 2003).

5. 2. La génomique structurale et fonctionnelle

Actuellement, l'un des défis majeurs du chercheur est la compréhension des mécanismes complexes chez les organismes vivants. Les phénomènes tels que la croissance, le développement et l'adaptation aux stress en particulier le stress hydrique nécessitent une bonne compréhension et analyse de l'information portée par le génome. Ceci implique deux disciplines piliers de la biologie moléculaire : la génomique structurale et la génomique fonctionnelle. La génomique structurale nous permet de déchiffrer et extraire l'information portée par le génome et par les protéines. La génomique fonctionnelle nous permet par contre de comprendre les modalités de régulation et d'interaction de cette information.

5. 3 La génomique structurale

Cette discipline est basée essentiellement sur le séquençage et l'identification des gènes. La définition des structures introns-exons et régions inter-géniques est une étape cruciale de la génomique structurale. Cette identification s'effectue par comparaison des séquences avec les séquences d'ADNc et aussi par l'utilisation de certains programmes bioinformatiques de prédiction. Depuis la découverte de l'ADN double hélice par Watson et Crick en 1953, les études portant sur l'ADN se sont succédées. Et depuis le séquençage du premier génome d'*Haemophilus influenzae* en 1995, plusieurs organismes ont été séquencés.

5. 3 .1. Le séquençage systématique

Le séquençage est un moyen de décodage des acides nucléiques permettant la découverte des gènes d'un organisme. Le séquençage de l'ADN a été inventé aux années 70 par deux équipes travaillant séparément, l'équipe de Walter Gilbert et l'équipe de Frederick Sanger. L'équipe américaine et allemande ont reçu le prix Nobel de la chimie en 1980. Les méthodes de séquençage proposées sont basées sur des techniques différentes. En effet, La méthode de Sanger est basée sur la synthèse enzymatique sélective alors que celle de Gilbert est basée sur la dégradation chimique sélective. Actuellement la majorité des séquençages réalisés se basent sur la méthode de Sanger. Le séquençage de génomes tire avantage des techniques de biologie moléculaire ainsi que des outils de la bioinformatique. Ainsi, on reconnaît deux grandes techniques de séquençage basées essentiellement sur la fragmentation partielle du génome et le clonage des fragments génomiques dans des vecteurs de clonage. Selon que les clones sont ordonnés avant ou après le séquençage on distingue:

- **La méthode de séquençage par ordre hiérarchique:** cette technique est basée sur le séquençage de fragments digérés après leurs classements. Les fragments génomiques digérés sont de grande taille 50~200 kb et sont clonés dans des vecteurs artificiel comme les chromosomes artificiels bactériens (BAC).
- **La méthode globale ou shotgun est basée sur le séquençage des fragments génomiques dans un ordre aléatoire :** Les séquences des différents clones seront ordonnées par chevauchement à l'aide des programmes bioinformatiques. Cette technique a été popularisée par le séquençage de génomes bactériens, du génome de la drosophile et du génome humain. La technique shotgun présente l'avantage d'être plus rapide et moins coûteuse que la première technique.

5.4 . Séquençage d'étiquettes de séquences exprimées (EST)

Le séquençage d'EST est une variante du séquençage ciblant en particulier les séquences codantes et ignorant les séquences non transcrites. Cette technique permet d'avoir de l'information indépendamment de la taille du génome étudié. En comparaison avec le séquençage systématique, le séquençage d'EST permet d'accéder aux séquences codantes avec un effort et un coût moindres. En pratique on clone les ADNc issus de la rétro-transcription des ARNm dans des vecteurs plasmidiques de clonage formant ainsi des banques d'ADNc. Les clones sont partiellement séquençés sur l'une des extrémités 3' ou 5'. Les séquences obtenues sont classées en groupes correspondant au même gène on parle de "contigs". Ainsi, on peut obtenir la séquence complète d'un gène par la combinaison des séquences de plusieurs clones. Actuellement, la banque de gènes GenBank avec sa division spéciale pour la banque de données EST comprend près de 52 millions d'EST (Adams *et al.* 1991). D'autres bases de données pour les EST contigs sont disponibles sur le web, citons :

5.5 . Intérêt de l'utilisation des ESTs

La méthode la plus efficace pour avoir accès à des séquences codantes est le séquençage systématique de fragments de gènes exprimés. Ces fragments, de longueur excédant rarement 1000 pb, sont généralement appelés des étiquettes de séquences exprimées ou ESTs (Expressed Sequence Tags). Il existe plusieurs banques de données, générales comme Genbank (Benson *et al.* 2003) ou spécifiques d'un organisme comme TAIR pour Arabidopsis (Rhee *et al.*, 2003), MaizeGDB pour le maïs (Lawrence *et al.* 2004), Gramene pour les graminées (Ware *et al.* 2002) et SGN pour les Solanacées (<http://www.sgn.cornell.edu>).

Les ESTs constituent une source remarquable de données pour l'identification de gènes et le développement de marqueurs moléculaires. Lorsque du polymorphisme est trouvé dans des ESTs, leur cartographie permet d'établir des cartes génétiques fonctionnelles utiles dans l'identification de régions génomiques contrôlant des caractères d'intérêt.

Les ESTs étant constituées de séquences codantes, elles sont donc relativement bien conservées entre les différentes espèces végétales. Pour cette raison, il est facile de les utiliser pour comparer des espèces phylogénétiquement proches. Un tel avantage peut être exploité dans le cas de *Medicago truncatula*, où les travaux concernant la cartographie génétique sont en évolution continue.

5. 6. La génomique fonctionnelle

Le marquage de l'ADN ne permet aucune interprétation sur l'action individuelle des gènes et de leurs interactions. En génomique fonctionnelle, en revanche, c'est la connaissance de la fonction de ces gènes et l'analyse de leur expression qui est visée. L'expression (ou transcrit) plus ou moins importante du gène est accessible à travers les changements d'ARNm eux-mêmes traduits en protéines, qui sont en général des enzymes dont la fonction métabolique est connue. L'objectif de ces études peut être la mise au point d'un test de réponse variétale ou bien, le plus souvent, d'inclure dans le génome de l'espèce cultivée des gènes intéressants. Ces techniques de génie génétique sont moins développées sur les légumineuses que sur les céréales (Klueva *et al.* 1998).

5. 7. Le rôle régulateur des facteurs de transcription sous divers stress abiotiques

Les stress salin et hydrique diminuent le potentiel hydrique des cellules végétales. Des études se sont focalisées sur les réponses moléculaires des plantes et les mécanismes de transduction des signaux lors d'un stress hydrique. Chez les plantes, beaucoup de gènes sont induits par la sécheresse, la salinité et le froid (Shinozaki *et al.* 1996, Bray. 1997), ces inductions de l'expression de ces gènes sont réparties en deux groupes selon la fonction de leur produits (Liu *et al.* 2000) :

- Les produits des gènes du premier groupe sont les protéines fonctionnelles qui protègent les macromolécules et les membranes (les protéines LEA, osmoticum, protéines anti-gel, chaperons,...), qui maintiennent le mouvement hydrique à travers les membranes comme :

- Les canaux protéiques hydriques et les transporteurs membranaires.
- Les enzymes catalysant la biosynthèse d'une grande variété d'osmorégulateurs comme la proline, betaine et les sucres,...

- Les enzymes qui détoxifient et permettent un maintien à un niveau normal, la physiologie des cellules ainsi que leur métabolisme biochimique comme, la glutathion- s- transférase, soluble époxyde hydrolase, catalase, superoxyde dismutase et la peroxydase ascorbique.

* Les produits des gènes du second groupe sont :

- les facteurs transcriptionnels comme les DREB « Dehydration responsive element binding protein ».

- Les protéines kinases « protéine kinase ribosomale, protéine kinase de la régulation de la transcription,... ».

- Les protéinases « phosphoestérase, phospholipase C,.. » qui sont impliquées dans les mécanismes de transduction des signaux dus aux stress et le contrôle de l'expression des gènes de tolérance aux stress.

Deux gènes ont été trouvés chez *Arabidopsis thaliana*, et chez *N. tabacum* qui codent pour une protéine kinase et qui sont : ATRR1 et ATRR2 qui sont induits par la sécheresse, la salinité et le froid. (Zhang *et al.* 1999).

Un gène nommé rd 29A a été identifié chez *Arabidopsis* soumise à la sécheresse, l'expression de ce gène est induite d'une façon différentielle sous condition stressante comme le froid, la salinité et la sécheresse, ou sous un traitement par l'acide abscissique exogène (ABA). Ceci suggère que le promoteur du gène rd 29A a au moins deux genres d'éléments agissant en cis, l'un impliqué dans une réponse associée à l'ABA et l'autre dans une réponse indépendante de l'ABA. L'expression du gène rd 29A est différente par rapport aux autres gènes rd (responsive dehydration: sensible à une déshydratation), leurs promoteurs contiennent des éléments DRE activant en cis, impliqués dans la voie rapide d'expression du gène rd 29A, et des éléments ABRE (éléments sensibles à l'ABA) impliqué dans la voie lente de l'expression du gène rd 29A sous condition de stress (Liu *et al.* 2000).

En conclusion, *Medicago truncatula Gaertner*, proche de la luzerne cultivée, a été choisi comme une légumineuse modèle grâce à sa grande diversité génétique. Elle est diploïde et autogame, avec un petit génome. C'est un modèle utilisé pour les études génétiques et moléculaires dans la compréhension des mécanismes de l'adaptation aux stress abiotiques et biotiques. Sa capacité de à pouvoir fixer l'azote atmosphérique fait que cette culture ne nécessite pas d'engrais azoté qui polluent l'atmosphère. Enfin, cette plante protéagineuse présente un intérêt agronomique important qui repose sur un bon rapport production / valeur nutritive du fourrage, des besoins en traitements phytosanitaires faibles et une adaptation à des conditions pédo-climatiques variées.

Chapitre 2

Analyse de la Tolérance au Stress Salin de *Medicago truncatula* Gaertn. en relation avec le Poids et la Teneur en Protéines de Réserves des Graines

Analyse de la Tolérance au Stress Salin de *Medicago truncatula* Gaertn. en relation avec le Poids et la Teneur en Protéines de Réserves des Graines

La salinité est l'un des stress abiotiques qui affecte de manière significative la croissance des plantes et la qualité des graines. Les légumineuses sont des plantes très importantes sur le plan écologique et agricole car ils sont capables d'interagir en symbiose avec des rhizobiums pour la fixation biologique de l'azote (Spaink, 2000 ; Perret *et al.* 2000), ce qui évite l'utilisation d'engrais chimiques, qui affectaient la rhizosphère et polluent les nappes phréatiques. Parmi les espèces annuelles du genre *Medicago*, l'espèce *Medicago truncatula* est largement utilisé comme plante légumineuse modèle pour comprendre la tolérance aux stress abiotiques (Young et Udvardi, 2009). Ce type de légumineuses ont un grand intérêt pour l'agriculture durable. La croissance des plantules au stade précoce de nombreuses plantes cultivées est très sensibles aux stress environnementaux (Penmetsa et Cook, 1997). La longueur de la racine et de la tige fournissent des indications importantes de la réponse de la plante au stress salin (Jamil et Rha, 2004). Chez certaines plantes, la racine peut être plus longue que la tige et, par conséquent, ce rapport peut être inférieure par rapport à d'autres plantes (Snapp et Shenman, 1992). La compréhension de la relation entre le développement des jeunes plants, les conditions environnementales et la qualité des graines au niveau physiologique et agronomique sont des objectifs fondamentaux de la science des semences (Bláha et Pazderů, 2013). Les protéines qui s'accumulent dans les plantes dans des conditions salines peuvent fournir une forme de stockage de l'azote qui est réutilisée plus tard (Singh *et al.* 1987), et peuvent être nouvellement (de novo) synthétisés en réponse au stress salin. Elles sont présentes de manière constitutive à faible concentration (Pareek *et al.* 1997). Il serait très intéressant de trouver une association entre la teneur en protéines de réserves graines et la tolérance au stress salin.

Le but de notre étude est d'évaluer la réponse de la croissance des jeunes plants au stress salin et surtout la croissance de la racine chez quatre génotypes de *M. truncatula* en relation avec le poids des graines et la teneur en protéines de réserves afin de rechercher une corrélation entre l'accumulation de ces protéines et les paramètres de croissance sous stress salin. La détermination du génotype le plus tolérant avec une teneur élevée en protéines de réserves est d'un grand intérêt pour l'agriculture durable et l'écologie afin d'améliorer la productivité de cette légumineuse très importante sur le plan économique et environnemental (fixation de l'azote). Une deuxième approche de cette étude était d'utiliser des graines âgées d'un génotype appartenant au *M. truncatula* afin d'évaluer l'influence de la qualité des graines sur les différents paramètres de croissance en relation avec la tolérance à la salinité .

Matériels et Méthodes

1. Matériel

Nous avons utilisé des graines récoltées en (2010) provenant de génotypes de *M. truncatula*, fournies par différents instituts. *Jemalong*, qui est le génotype de référence, Tru 131 de IDGC de Sidi Belabbès, Tru 26 (35° 23' 17'' N ; 1° 19' 22.16'' E) qui provient de l'ENSA El Harrach (Alger), respectivement, et le génotype Tru 673 qui est représenté par des graines âgées d'une ancienne collection (24/06/1977) de l'ICARDA à Alep (Syrie).

2. Méthodes

Les quatre génotypes ont été utilisés à quatre niveaux de traitement par NaCl (Eau distillée comme témoin 0, 68, 102 et 137 mM) de chlorure de sodium (Amouri et Fyad Lamèche, 2012). Le génotype Tru 673, caractérisé par une faible vigueur des graines (Fig 10), a été utilisé pour étudier l'impact des graines âgées sur la réponse de la racine et la tige à la salinité. Les graines ont été scarifiées et stérilisées pendant 10 minutes dans l'hypochlorite de sodium (6%) puis rincées trois fois à l'eau distillée pendant deux minutes. Dix graines ont été semées dans des boîtes de Pétri et mises à germer sur du papier-filtre imbibé dans l'eau distillée et dans les différentes solutions de chlorure de sodium. Les graines des différents génotypes de *M. truncatula* ont été mises à germer dans des boîtes de Pétri (50 mm) sur deux couches de papier filtre dans un incubateur maintenu à l'obscurité à 25 ± 2 °C. Les papiers filtres ont été changés après 48 heures, afin d'éviter l'accumulation du sel (Rahman *et al.* 1996). Pour évaluer l'effet des différents niveaux de concentrations de NaCl sur les différents génotypes, le dispositif expérimental est un dispositif bloc randomisé avec quatre répétitions, l'émergence de la racine est le critère de la germination.

Pendant dix jours de germination, la longueur de la racine (RL), la longueur de la tige (PL) et la longueur des jeunes plants (SL) ont été mesurés. Le pourcentage final de germination (FGP), le rapport longueur tige et racine et la vigueur des graines (SV) ont été calculés comme suit : $PL : RL = \text{rapport longueur tige (cm) / longueur racine (cm)}$ et la vigueur des graines germées $(SV) = FGP (\%) * SL (\text{cm})$. Dans cette étude, nous avons considéré les génotypes comme tolérants ceux qui ont un faible ratio, c'est à dire que leurs racines sont plus résistantes que leurs tiges.

2. 1. Détermination de la teneur en protéines de réserves des graines

La teneur en protéines de réserves des graines (SPC) a été déterminée par la méthode décrite par Bradford (1976) en utilisant de l'albumine du sérum bovin comme témoin. Quatre graines pour chaque génotype, ont été mélangées avec un tampon d'extraction (50 mM Tris -HCl (pH: 6,8), 2 % de SDS, 2,5 % de bêta -mercaptoéthanol, 10 % glycérol). Après broyage, les échantillons ont été centrifugés à 14000 rpm pendant 15 minutes et le surnageant a été isolé et utilisé pour le dosage des protéines.

L'intensité de la couleur bleue développée a été enregistrée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visibles et la concentration en protéine a été mesurée en utilisant de l'albumine du sérum bovin comme témoin. La teneur des graines en protéines de réserves (SPC: mg g^{-1}) a été calculée en fonction du poids des graines sèches (SDW : mg) pour chaque génotype .

2. 2. Analyse statistique

Tous les tests statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Statistica version 6.1. L'analyse statistique a été effectuée en utilisant l'ANOVA à deux facteurs ($P < 0.01$ et $P < 0,05$). Basé sur les résultats d'analyse de variance, la comparaison multiple de moyennes a été réalisée selon la méthode de Duncan, pour un intervalle de confiance de 95 %, afin de déterminer les variations significatives entre les différents traitements (Duncan, 1955). Dans le Tableau 3, les différentes lettres après les valeurs à l'intérieur de la même colonne et pour chaque caractère, représentent les différences significatives existantes. Les Traits étudiés (rapport tige et racine : PL / RL) et la teneur en protéines de réserves (SPC) ont été soumis respectivement à l'analyse de classification hiérarchique utilisant la procédure de « Wards minimum variance » comme un algorithme de clustering. « Wards méthode minimum » est une procédure de classification hiérarchique dans lequel la similitude est utilisé pour rejoindre des groupes et est calculé comme la somme des carrés entre les deux groupes sommés sur toutes les variables (Hair *et al.* 1998). Le regroupement des génotypes donne des informations sur leur similitude et différence dans les réponses aux stress salin qui facilitent le choix des génotypes utilisés dans les programmes de sélection.

Cette partie expérimentale a été réalisée au sein du Laboratoire d'Amélioration des plantes à l'université d'Oran 1.

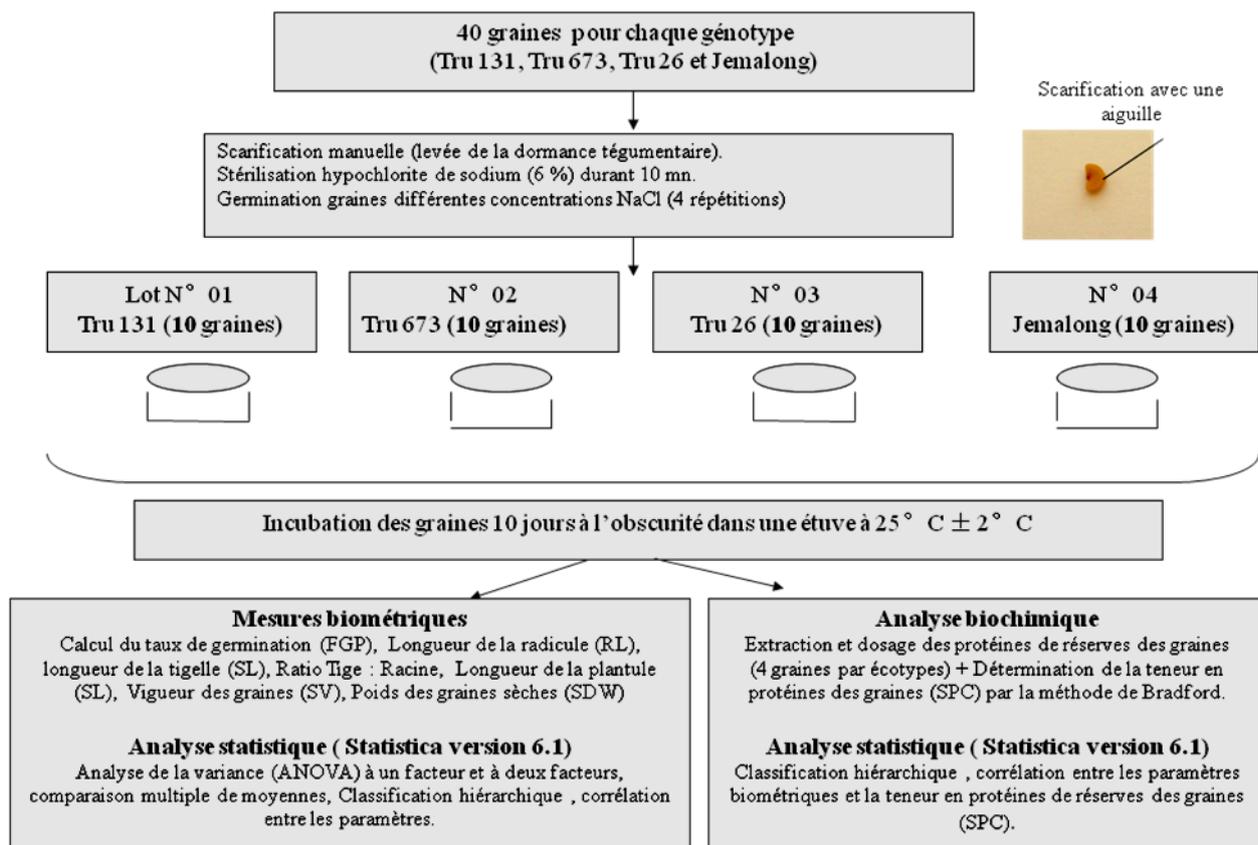


Schéma 1 : Protocole expérimentale pour les analyses biométriques et biochimiques de 4 génotypes de *M. truncatula* à différentes concentrations de NaCl.

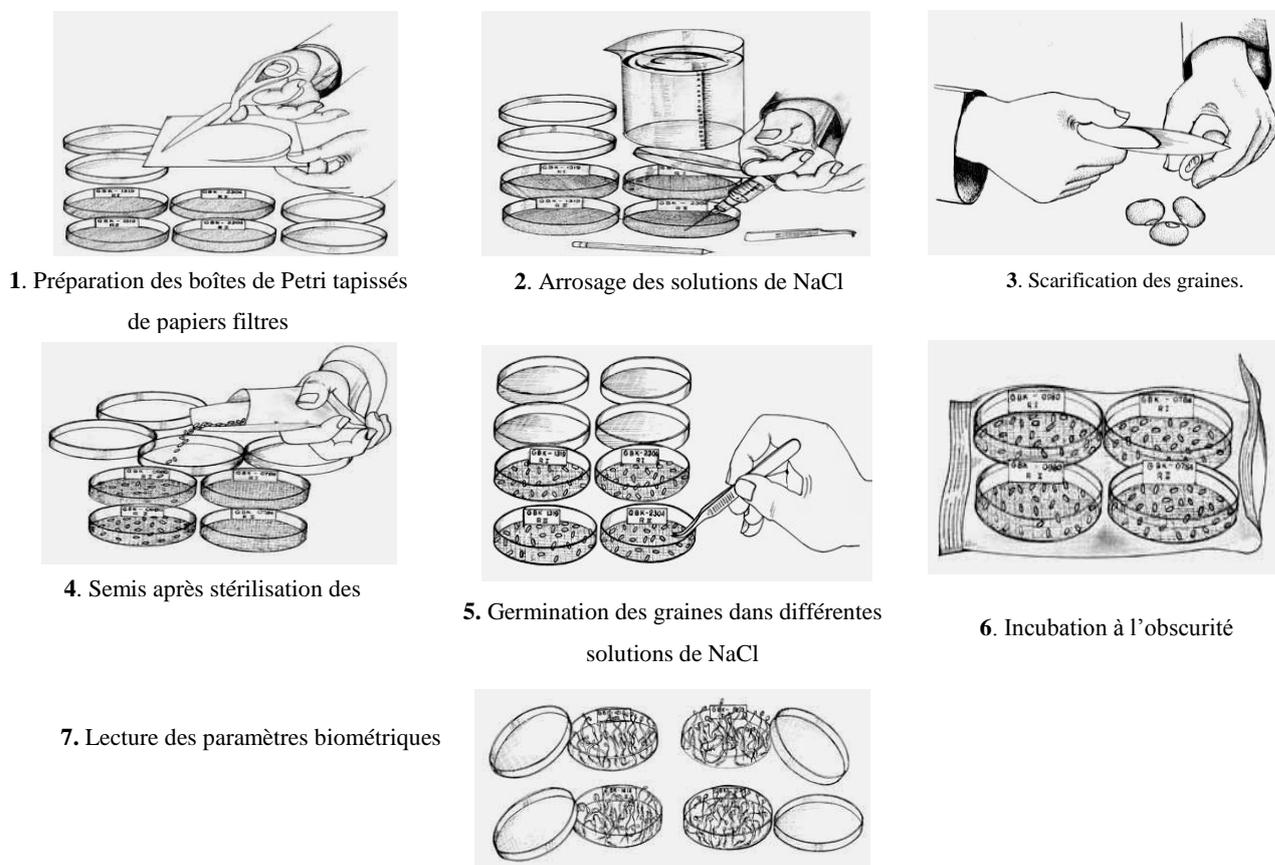


Schéma 2 : Etapes de germination des graines sur le dessus de papiers absorbants dans des boîtes de Petri.

Résultats et Interprétation

Dans ce chapitre, nous présentons nos résultats en 3 points :

1. Influence du stress sel sur les différents paramètres du développement des jeunes plants

Les résultats présentés ici indiquent des différences dans la vigueur des graines germées, la longueur de la racine et de la tige chez les quatre génotypes étudiés. Les données de l'analyse de variance (ANOVA) à un facteur et deux facteurs (Tab 1 et 2), ont montré une différence très significative entre les génotypes en interaction avec le traitement salin pour l'ensemble des paramètres de croissance étudiés et qui diminuent avec l'augmentation de la concentration en NaCl (Tab 3). Par rapport au témoin, la longueur de la racine et la tige diminuent avec la même vitesse (2.9 à 1.17 cm et 3.1 à 1.15), respectivement. Le rapport tige / racine (PL : RL ratio) a diminué (de 1,17 à 0,76) ainsi que la vigueur des graines germées selon le gradient de salinité (de 5,47 à 2). Dans cette étude, nous avons utilisé le paramètre (rapport tige / racine PL : RL ratio) pour avoir plus d'informations sur la réduction de la longueur de la racine par rapport à la longueur de la tige (Fig 11).

Les résultats ont enregistré un faible ratio chez les génotypes Tru 131 et Tru 673 pour la majorité des traitements. Ces données confirment que la partie racinaire est plus résistante à la salinité que la tige chez les génotypes tolérants. Cependant, ce ratio (tige / racine) augmente chez les génotypes jugés sensibles Tru 26 et Jemalong, c'est à dire que la partie de la racine était plus sensible que la tige chez les génotypes sensibles (Fig 11). Les résultats de l'analyse des regroupements, méthode de variance minimum de Ward des différents génotypes de *M. truncatula* pour le paramètre (rapport tige / racine = PL : RL ratio) sous différents niveaux de stress salin, ont montré qu'il y a deux groupes de génotypes (Fig 12). Le premier groupe comprend les deux génotypes tolérants (Tru 131 et Tru 673) avec des valeurs faibles pour le ratio et une distance minimale ($d = 1,08$; Tab 4). Le deuxième groupe comprend les génotypes sensibles (Tru 26 et Jemalong) qui ont une valeur élevée du ratio avec une distance minimale ($d = 1,12$).

Tab 1 : ANOVA à un facteur de l'effet du stress salin sur les différents paramètres de développement des jeunes plants chez les génotypes de *M. truncatula*

Source de variation	RL (cm)			PL		PL/RL		SL (cm)		FGP		SV	
	df	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
0	3	9,855	0,000**	26,95	0,000**	2,60	0,100	13,50	,000**	3,476	0,051	1,488	0,268
68	3	39,55	0,00**	23,13	0,000**	5,36	0,014*	32,24	,000**	0,881	0,478	2,184	0,143
102	3	32,60	0,000**	17,57	0,000**	1,56	0,200	26,83	,000**	0,382	0,768	0,337	0,799
137	3	10,47	0,000**	9,734	0,000**	1,83	0,100	10,18	,000**	1,033	0,413	2,008	0,167

RL : longueur de la racine. **PL** : longueur de la tige. **PL /RL Ratio**. **SL** : longueur de la plantule. **FGP** : pourcentage de germination/ Final germination pourcentage. **VS** : Vigueur des graines. Niveau de signification * P < 0.05, ** P < 0.001, ns: Non significative, **F** : coefficient of Snedecor-Fisher

Tab 2 : ANOVA à deux facteurs de l'effet du stress salin sur les différents paramètres de développement des jeunes plants chez les génotypes de *M. truncatula*

Source de variation	RL			PL		PL/RL		SL		FGP		VS	
	df	F	P	F	P	F	P	P	F	F	P	F	P
Génotypes (G)	3	78,44	0,00* *	70,59	0,000* *	9,280	0,000 *	74,31	0,000* *	3,118	0,035 *	5,469	0,003*
Traitement (T)	3	43,70	0,00* *	65,55	0,000* *	1,897	0,428	62,84	0,000* *	0,112	0,999	5,564	0,002*
Interaction (G x T)	9	3,45	0,00* *	4,33	0,000* *	0,712	0,695	3,40	0,000* *	1,161	0,334	0,372	0,943

Niveau de signification * P < 0.05, ** P < 0.001, ns: Non significative, **F** : coefficient of Snedecor-Fisher

Tab 3 : Classification des moyennes des différents niveaux des stress salin sur les différents paramètres de développement chez *M. Truncatula*.

NaCl (mM)	RL (cm)	PL (cm)	PL/RL	SL (cm)	FGP	SV
0	2,908 a	3,104 a	1,179a	6,012 a	0,882 a	5,471a
68	2,289 a	2,372 a	1,012b	4,661 b	0,743 a	4,369 ab
102	1,923 b	1,964 b	0,885b	3,888 c	0,746 a	3,542 bc
137	1,175 c	1,154 c	0,765c	2,327 d	0,647 a	2,00 c

Les moyennes mentionnées avec la même lettre pour chaque trait n'est pas significative à 5% selon le test de Duncan.

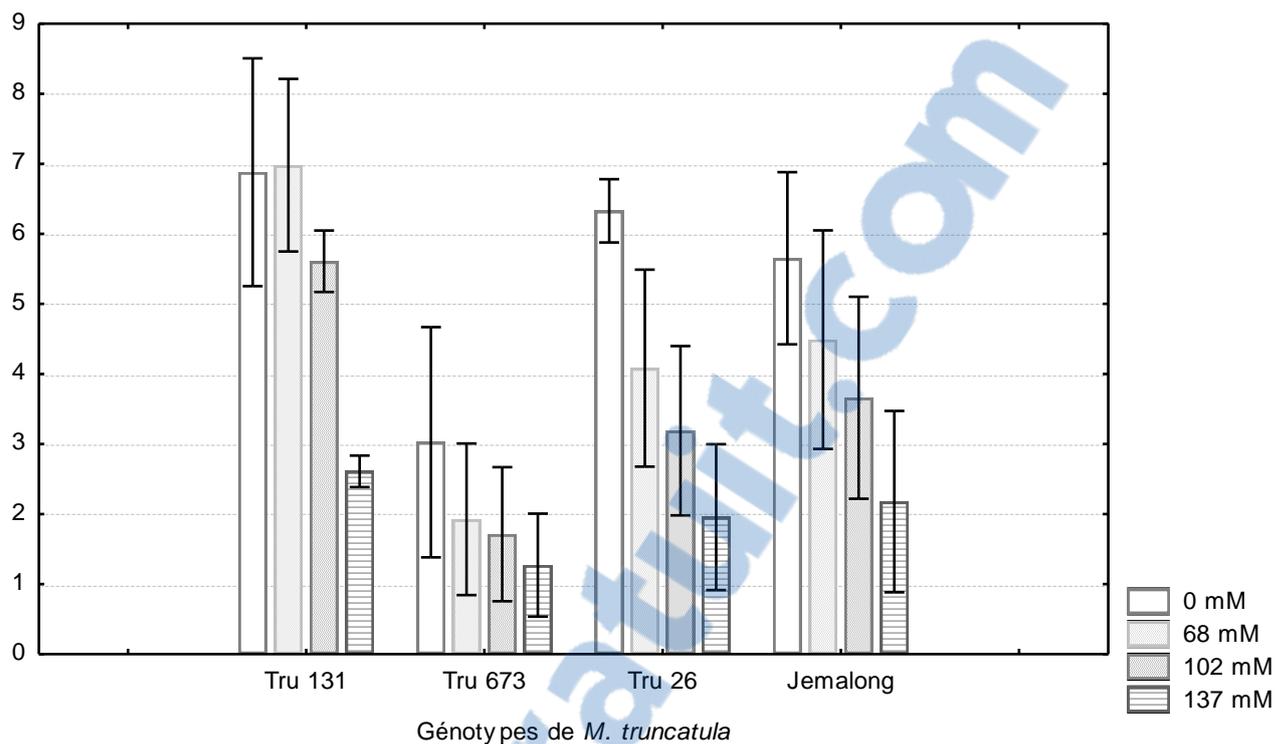


Fig 10 : Vigueur des grains des différents génotypes de *M. truncatula* sous différentes condition de stress salin. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 4 répétitions).

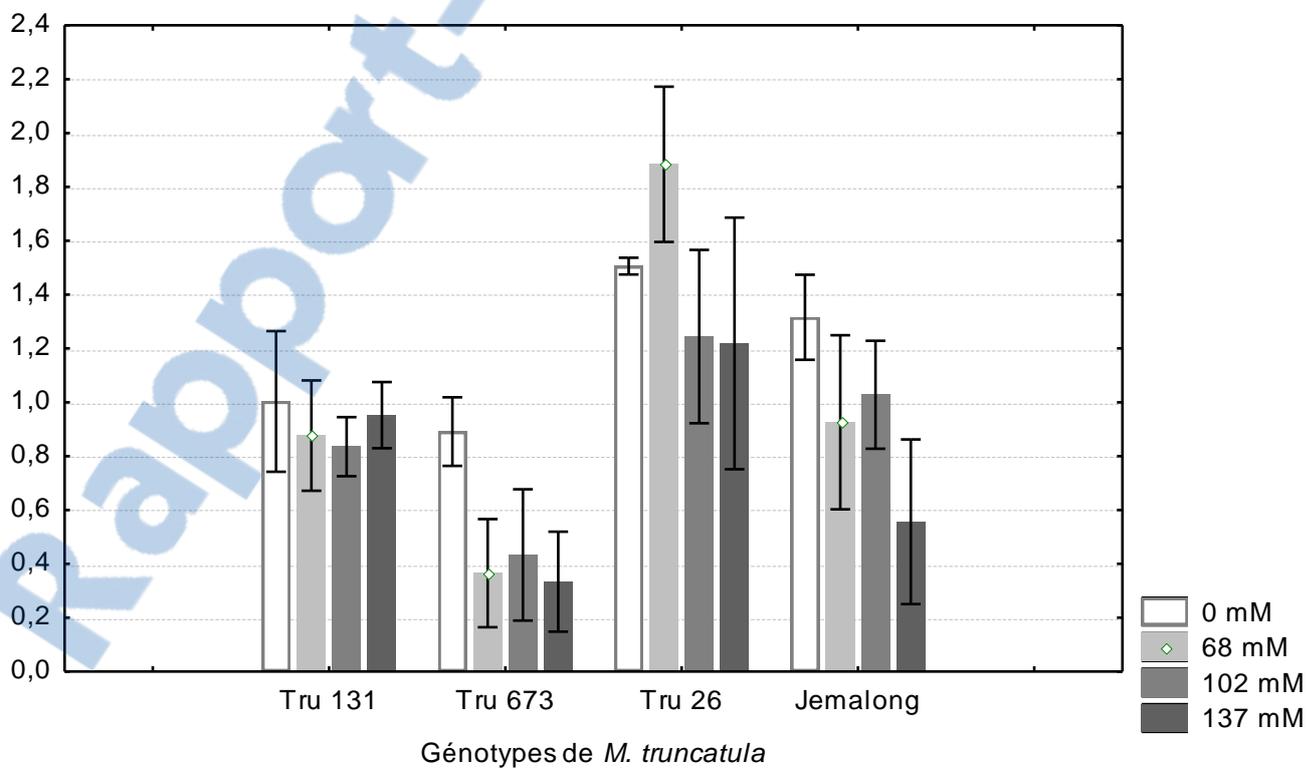


Fig 11 : Valeurs moyennes du ratio (Tige / racine) chez les différents génotypes de *M. truncatula* sous différentes concentrations de stress salin. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 4 répétitions).

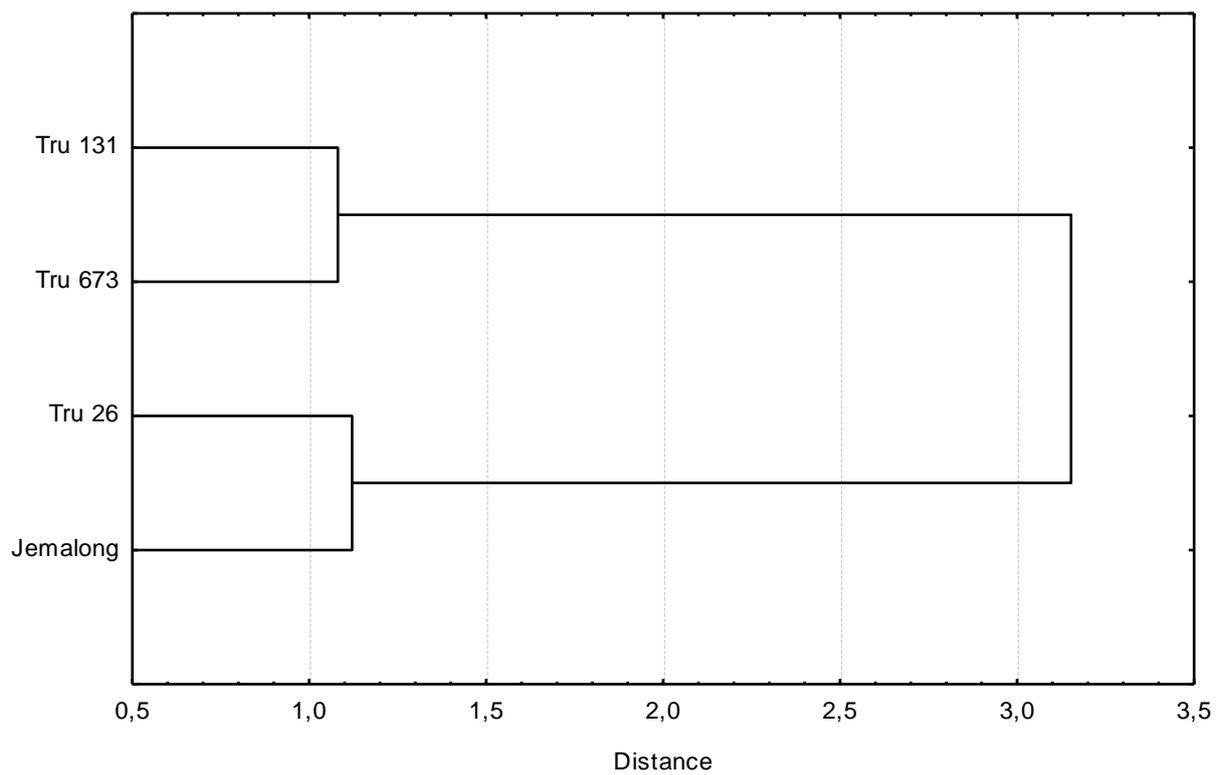


Fig 12 : Analyse des groupes des génotypes de *M. Truncatula* sous différentes concentrations de salinité pour le paramètre ratio (Tige /Racine).

2. Analyse du poids et de la teneur en protéines de réserves des graines

Les données du poids des graines sèches (SDW) représenté sur la figure 13, montrent que le génotype tolérant (Tru 131) avait un poids élevé (5,67 mg/graine) et le génotype sensible (Tru 26) avec un poids faible (2,27 mg/graine). À propos de la teneur en protéines de réserves (CPS), le génotype tolérant (Tru 131) qui a une teneur supérieure en protéine de réserves (CPS = 0,31 mg g⁻¹) que celles des génotypes sensibles (Jemalong et Tru 26) (CPS : 0,15 mg. g⁻¹ et 0,077 mg g⁻¹), respectivement (Fig 14). L'analyse des clusters pour la teneur en protéines de réserves (CPS) organise les génotypes de *M. truncatula* en deux groupes (Fig 15). Ce résultat est le même obtenu à partir de l'analyse du cluster sur le rapport tige / racine (Fig 12). Le premier groupe comprend les deux génotypes tolérants (Tru 131 et Tru 673) avec une distance minimum (d = 1,01). Le deuxième groupe comprend ceux qui sont sensibles (Tru 26 et *Jemalong*) avec une distance minimum (d = 1,00 ; Tab 5). Ces données suggèrent que les génotypes avec une haute teneur en protéines de réserves sont plus tolérants que chez les génotypes sensibles .

3. Relation entre les différents paramètres du développement des jeunes plants sous stress salin avec le poids des graines et la teneur en protéines de réserves

Il existe une relation positive et hautement significative entre le poids sec des graines (SDW) et la longueur de la racine (RL) avec un coefficient de corrélation ($r = 0,95^*$; Tab 6). La figure 16, illustre cette association, par exemple, le génotype tolérant (Tru 131) qui a un plus haut poids des graines (SDW) a une longueur racinaire élevée (RL) et une meilleure croissance racinaire. En outre, nous avons constaté un coefficient de corrélation positive ($r = 0,92$) entre la teneur en protéines et le poids des graines (SPC et SDW ; Tab 6). La figure 17, illustre cette relation et le génotype le plus tolérant (Tru 131) a une valeur élevée que chez la plus sensible (Tru 26). Une autre donnée intéressante, est l'association entre la teneur en protéines de réserves (SPC) et la longueur racinaire (RL) avec un coefficient de corrélation ($r = 0,84$; Tab 6). La figure 18 montre cette association pour le génotype le plus tolérant (Tru 131) qui a la longueur la plus élevée des racines et une teneur supérieure en protéines de réserves par rapport à la sensible (*Jemalong*) sous différentes concentrations de salinité.

Tab 4 : Matrice des distances entre les géotypes de *M. truncatula* sous différents niveaux de stress salin pour le ratio (Tige /Racine).

Géotypes	Tru 131	Tru 673*	Tru 26	Jemalong
Tru 131	0			
Tru 673*	1,08	0		
Tru 26	2,07	1,38	0	
Jemalong	3,00	2,05	1,12	0

*Graines âgées

Tab 5 : Matrice des distances entre les géotypes de *M. truncatula* pour la teneur en protéines de réserves.

Géotypes	Tru 131	Tru 673*	Tru 26	Jemalong
Tru 131	0			
Tru 673*	1,01	0		
Tru 26	2,01	1,00	0	
Jemalong	3,00	2,00	1,00	0

*Graines âgées

Tab 6 : Coefficients de corrélation (r) entre différents paramètres de développement des jeunes plants sous différentes concentration des salinité, poids des graines sèches et la teneur en protéines de réserves chez *M.truncatula*.

Traits	SV	PL/RL	RL	PL	FGP	L	SPC	SDW
SV	1							
PL/RL	0,76	1						
RL	0,92	0,10	1					
PL	0,92	0,72	0,70	1				
FGP	0,97*	0,63	0,84	0,94	1			
SL	1,00*	0,42	0,93	0,91	0,96*	1		
SPC	0,55	-0,45	0,84	0,20	0,41	0,59	1	
SDW	0,79	-0,17	0,95*	0,53	0,64	0,82	0,92	1

RL : longueur de la racicule. PL: longueur de la tigelle. PL /RL Ratio. SL: longueur de la plantule. FGP: pourcentage de germination. VS: Vigueur des graines. SPC: Teneur en protéines de réserves des graines. SDW: poids sec des grains. Niveaux de signification de corrélation * P < 0.05

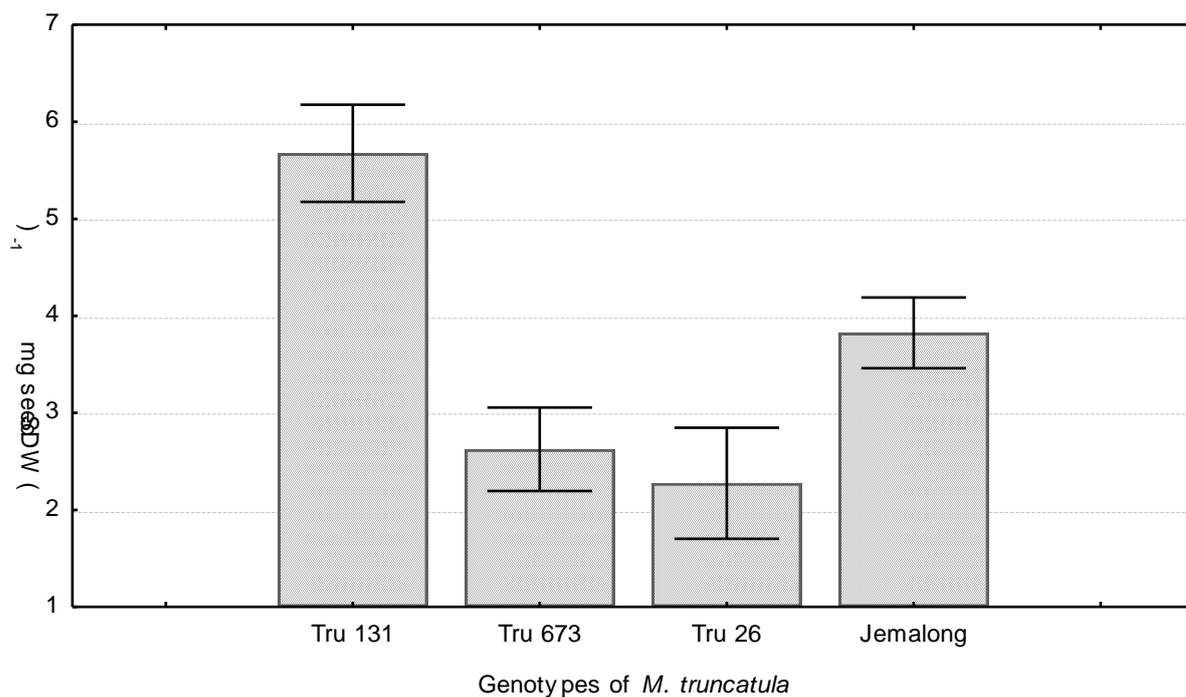


Fig 13 : Poids des graines sèches des différents génotypes de *M. truncatula*. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 4 répétitions)

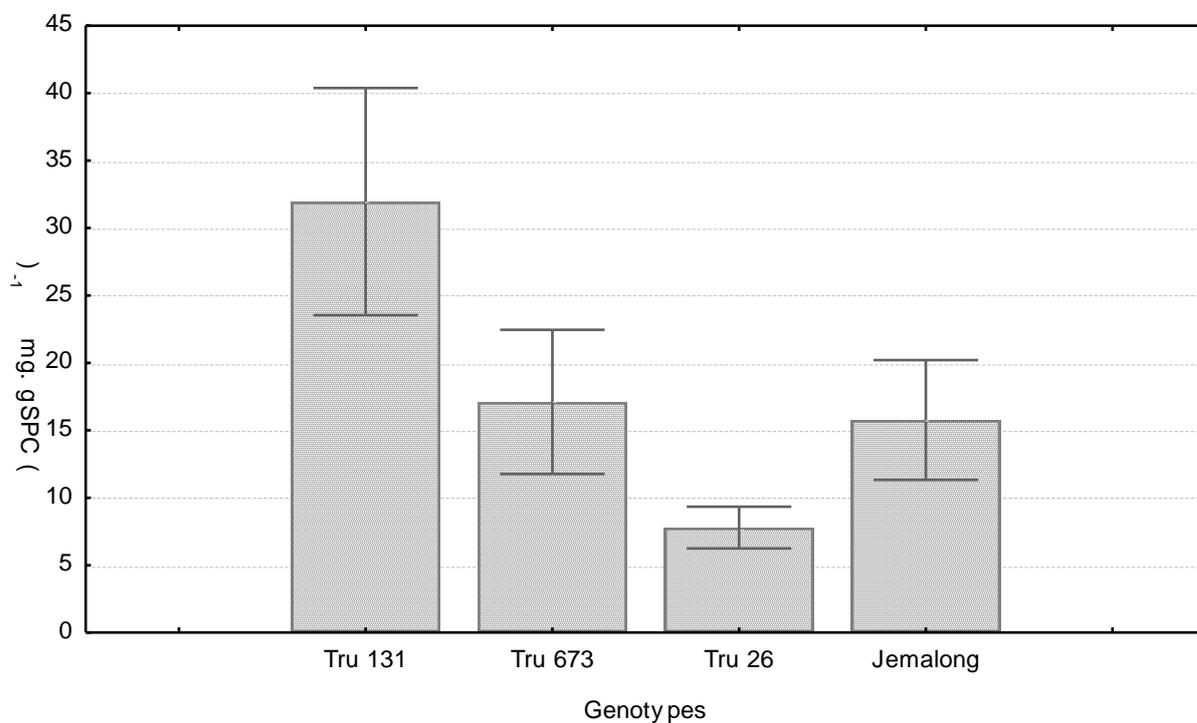


Fig 14 : Teneur en protéines de réserves chez les différents génotypes de *M. truncatula*. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 4 répétitions)

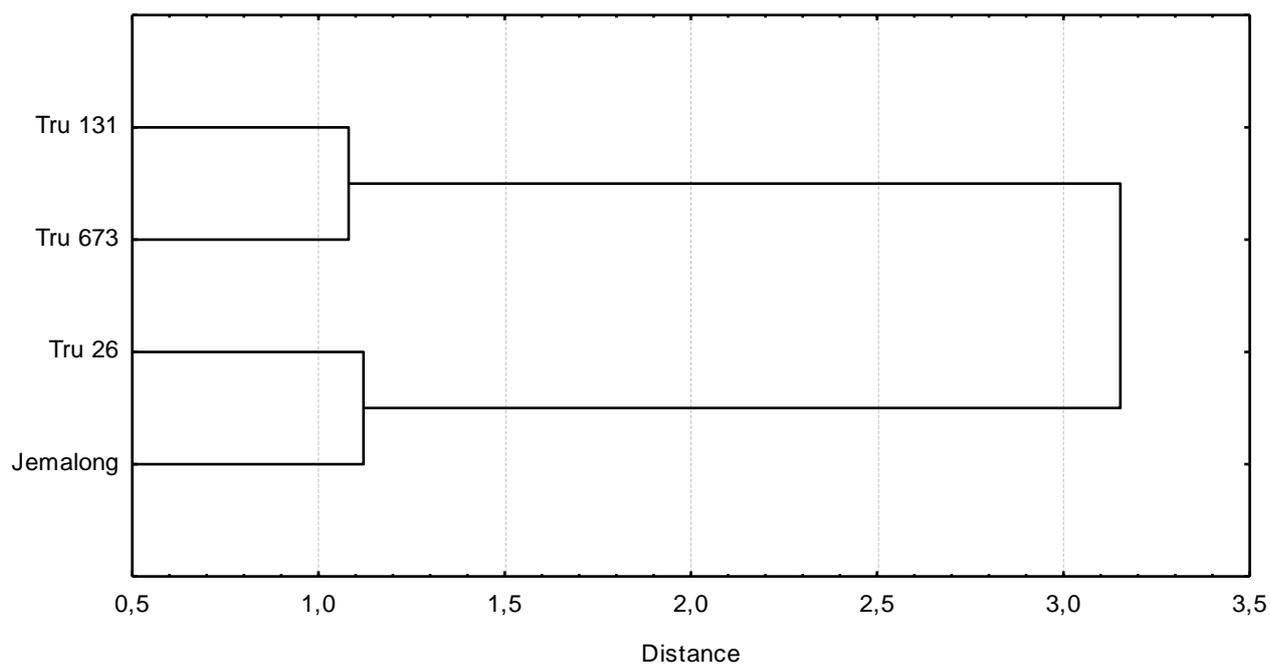


Fig 15 : Analyse des groupes des génotypes de *M. Truncatula* pour la teneur en protéines de réserves.

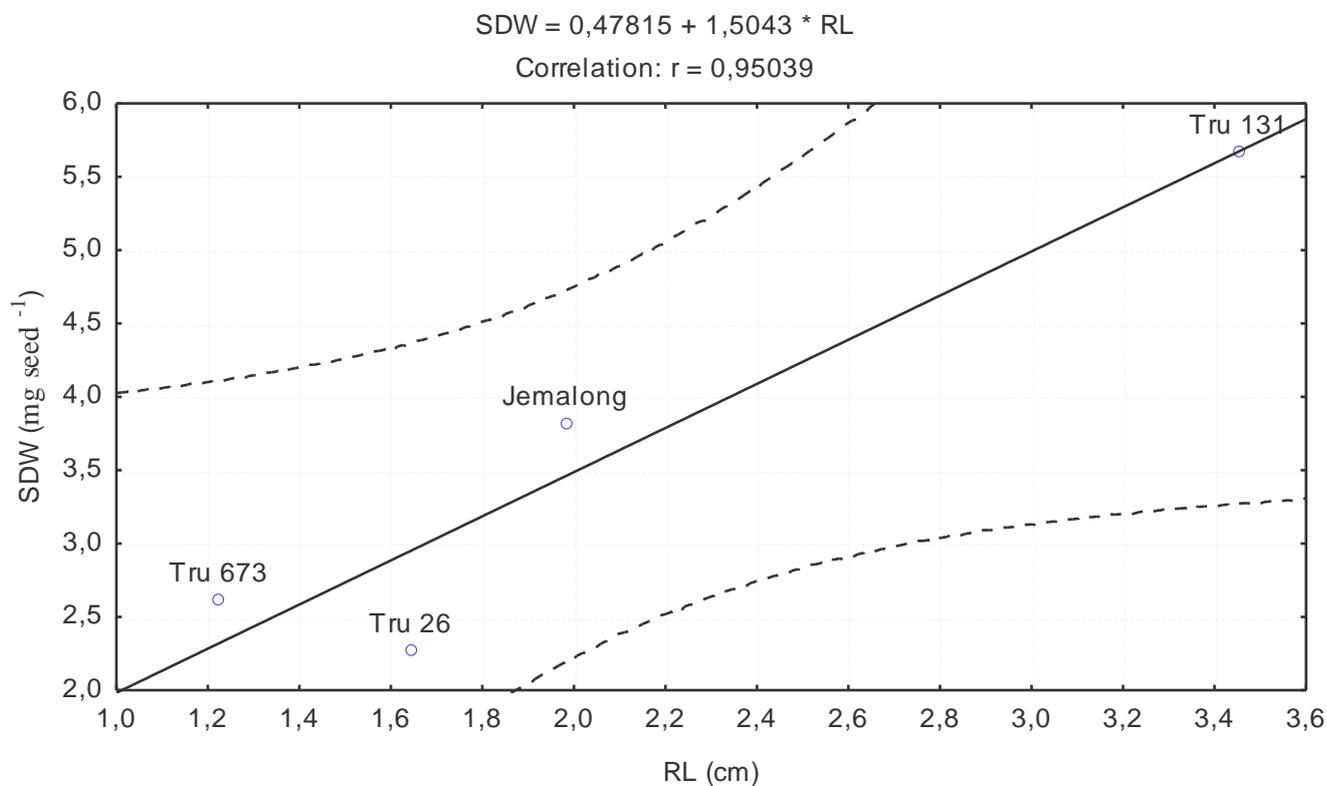


Fig 16 : Relation entre la longueur de la Racine (RL) et le poids des graines sèches (SDW) sous différentes concentration en stress salin chez les génotypes de *M.truncatula*.

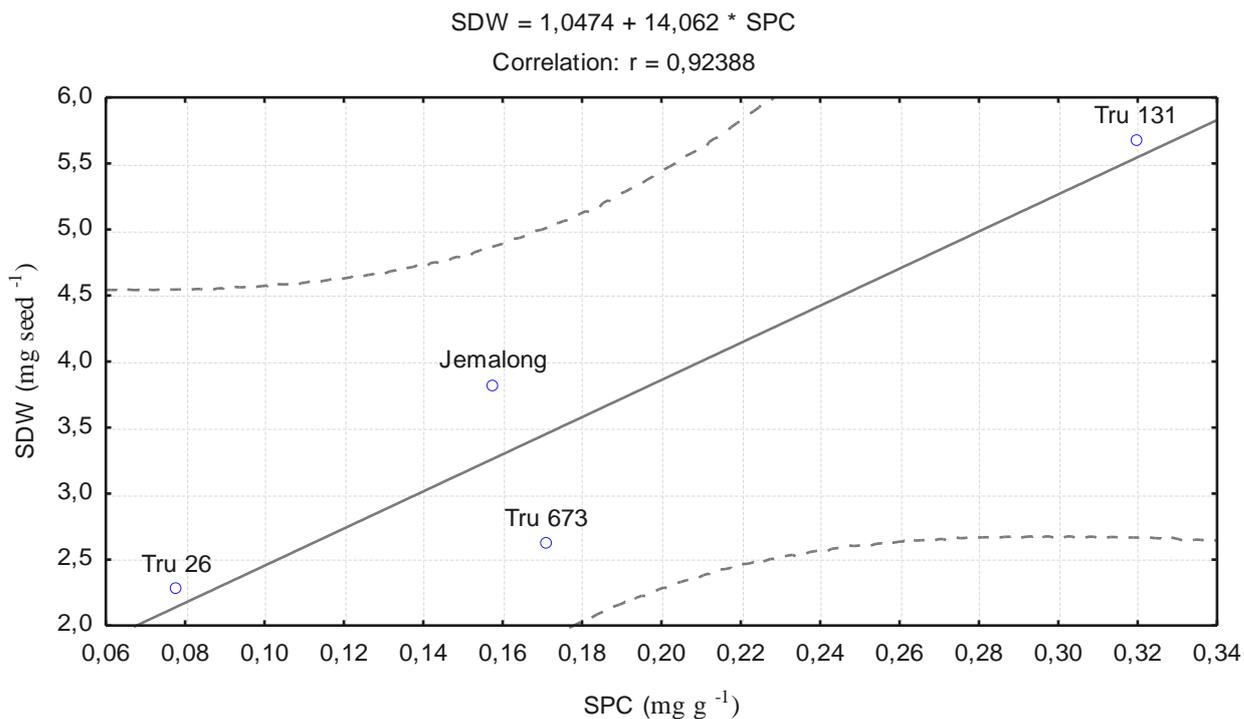


Fig 17 : Relation entre la teneur en protéines de réserves (SPC) et le poids des graines sèches (SDW) chez les génotypes de *M.truncatula*.

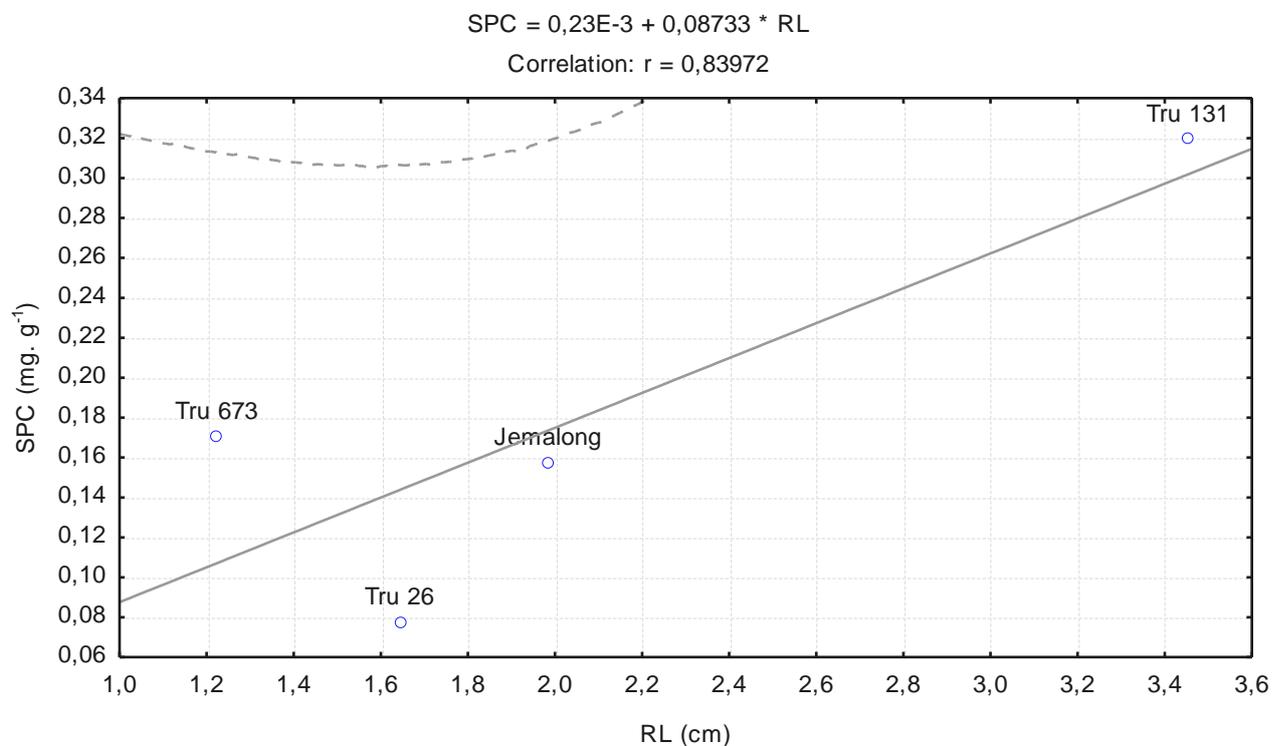


Fig 18 : Relation entre la teneur en protéines de réserves (SPC) et la longueur de la racine (RL) chez les génotypes de *M.truncatula* .

Discussion

La croissance des plantules est l'étape critique pour l'étude du comportement des plantes dans des conditions salines (Bosque - Perez *et al.* 1998). Les résultats montrent qu'en général, tous les paramètres de développement mesurés ont diminué avec l'augmentation de la salinité. La salinité élevée peut inhiber l'allongement de la racine et en ralentissant l'absorption de l'eau par la plante (Werner et Finkelstein, 1995). La capacité des plantes à tolérer le stress salin varie selon le stade du développement durant leur cycle de vie (Khan *et al.* 2002) et l'émergence des plantules est essentielle pour la mise en place des populations végétales (Khan et Gulzar, 2003). La majorité des recherches indique que la plupart des cultures annuelles sont tolérantes au stade germination mais sensible au cours du développement végétatif précoce (Maas et Grattan, 1999). Par ailleurs, Les racines sont la partie la plus sensible de la plante et ont un rôle central sur le contrôle de la transmission rapide d'information aux autres parties de la plante (Bláha et Pazderů, 2013). Ainsi, il est intéressant d'examiner la croissance racinaire par rapport à l'allongement de la tige dans différentes conditions de stress salin. Les résultats ont enregistré un faible ratio chez les génotypes Tru 131 et Tru 673 pour la majorité des traitements. Ces données confirment que la partie racinaire est plus résistante à la salinité que la tige chez les génotypes tolérants. Le génotypes Tru 26 et Jemalong ont montré une faible tolérance au stress salin. Récemment, des travaux ont montré que le génotype Tru 26 est sensible au stress par le froid. Zahaf *et al.* (2012), ont analysé le transcriptome de la partie racinaire chez deux génotypes de *M. truncatula* ayant des réponses contrastées au stress salin : TN1.11 (tolérant), échantillonné dans un sol tunisien salin, et Jemalong A17 génotype de référence (sensible). Ainsi, les génotypes tolérants ont montré une croissance accrue des racines sous stress salin et une accumulation différentielle des ions de sodium par rapport à *Jemalong* A17. Les mêmes auteurs ont constaté que les longueurs des racines chez ces deux génotypes contrastés ont été significativement réduites après 90-150 mM NaCl par rapport aux plantes non traitées. Dans notre étude, nous avons observé une réduction significative de la longueur des racines après 68-102 mM de NaCl par rapport à des plantes témoins. Les résultats analysées confirment que le génotype Tru 673 (issues de graines âgées) est associé au génotype tolérant Tru 131. Bláha et Pazderů (2013) ont rapporté que pendant une longue durée de conservation des graines, ces derniers perdent rapidement l'énergie de germination (faible vigueur) et les graines âgées peuvent influencer la croissance optimale des graines.

Il semble que les changements les plus importants pendant une longue durée de conservation des graines, proviennent des conditions environnementales qui peuvent causer la dégradation des protéines de réserves. D'autre part, des graines de qualité sont des graines non endommagées qui ont un taux élevé de germination, qui produiront des jeunes plants uniformes et vigoureux (Dickson, 1980). Concernant le sensibilité de Jemalong, le même résultat chez le génotype sensible Jemalong A17 sous stress salin a été trouvé par (Zahaf *et al.* 2012).

Les résultats obtenus ont montré que les génotypes avec une haute teneur en protéines de réserves sont plus tolérants (Tru 131 et Tru 673) que chez les génotypes jugés sensibles (Tru 26 et Jemalong). Dornbos *et al.* (1991) ont constaté que le stress hydrique réduit le poids moyen de la graine de 15% à 27°C, et de 22% à 33° C. Aussi, Erskine et Ashkar (1993), a expliqué la réduction du poids moyen des graines chez la lentille avec l'augmentation de la limitation de l'eau de la graine, peut être entraîné par la stimulation de la maturité des graines en situation de stress. La taille des graines est considéré comme un facteur important que pendant les premiers stades de croissance (Ghassemi- Golezani ,1992) et il est intéressant d'utiliser des graines d'un poids élevé, comme le cas des graines du génotype le plus tolérant (Tru 131) dans l'agriculture. Djemel *et al.* (2005) ont affirmé que les graines de *M. truncatula* accumulent de grandes quantités de protéines de réserves jusqu'à 32-42 % du poids sec. Ceci suggère que le génotype le plus tolérant (Tru 131) a un potentiel génétique (gènes) pour résister au stress salin. Les protéines qui s'accumulent dans les plantes dans des conditions salines peuvent fournir une forme de stockage de l'azote qui est réutilisée plus tard (Singh *et al.*1987) et peuvent jouer un rôle dans l'ajustement osmotique. Leur fonction de protection consiste à stabiliser les structures membranaires (Tolleter *et al.* 2010). L'induction de la tolérance au stress est corrélé avec l'apparition à la fin de l'embryogenèse des protéines (LEA) et aux protéines de choc thermique (HSP) qui s'accumulent lors de la maturation tardive des graines sous contrôle de l'acide abscissique (ABA) (Gallardo *et al.* 2001). Ces protéines qui sont impliquées dans la tolérance au déficit hydrique et sur la longévité des graines orthodoxes sont également induits par la salinité et peuvent agir comme osmoprotecteurs et antioxydants (Kalemba et Pukacka, 2007).

Les résultats ont montré que le génotype tolérant (Tru 131) qui a un plus haut poids des graines (SDW) a une longueur racinaire élevé (RL) et une meilleure croissance raculaire. Toon *et al.* (1990) ont montré que la taille élevé des graines ont une meilleure qualité et un grand potentiel génétique pour la germination. Cependant, la qualité des graines peut être liée à la variation de la teneur en nutriment de ces graines (Abidîne *et al.* 1993) et aussi de le type de collection des graines (Bellari et Tani, 1993). Après l'anthèse et en cas de carence d'eau, une corrélation positive a été trouvée entre le poids des grains et l'indice de récolte chez le blé (Koocheki *et al.* 2006).

Les racines sont influencées par la qualité des graines au début de la croissance des plantes. Généralement, on sait que la qualité biologique des graines est également l'un des facteurs fondamentaux qui influence sur la croissance et le développement des racines pendant la période de végétation (Bláha et Pazderů, 2013). En plus, les résultats analysés démontre que le génotype le plus tolérant (Tru 131) qui a la longueur la plus élevée des racines a aussi une teneur supérieure en protéines de réserves par rapport à la sensible (Jemalong). (Ingram et Bartels, 1996) ont affirmé que chez les plantes supérieures, le stress osmotique induit plusieurs protéines qui sont liés aux protéines (LEA) et aux protéines du choc thermique (HSP). La corrélation entre l'accumulation de ces protéines et la tolérance au stress salin indique le rôle de protecteur contre le stress hydrique et que la qualité des graines a augmenté au cours des derniers stades de développement, après que les graines ont atteint un poids sec maximal (Sanhewe *et al.* 1996).

En conclusion, l'étude de l'effet du stress salin sur le développement des plantules chez quatre génotypes de *M. truncatula*, montre une variabilité significative entre les différents génotypes. Un ratio faible (Tige / racine) a été observée chez les génotypes tolérants (Tru 131) et (Tru 673). Ceci explique la résistance racinaire au stress salin par rapport à la tige. En outre, cette étude montre l'influence de l'âge des graines de l'écotype (Tru 673) sur le développement de la racine et la croissance de la tige séparément, mais pas sur le rapport tige : racine et la capacité à tolérer le stress salin. Cela peut s'expliquer par la présence des gènes impliqués dans la tolérance à la salinité. Le même regroupement des génotypes a été obtenu pour la teneur en protéines de réserves (CPS). Cela permet de conclure que les génotypes avec un rapport tige : racine élevé ont une teneur élevée en protéines de réserves chez les génotypes les plus tolérants (Tru 131 et Tru 673) que celles des génotypes sensibles (Tru 26 et Jemalong). Néanmoins, d'autres investigations sont nécessaires pour évaluer l'accumulation de ce type de protéine en rapport avec la tolérance à la salinité.

Chapitre 3

Analyse de la Diversité Génétique des Protéines de Réserves par Electrophorèse

Rapport Gratuit.com

Analyse de la Diversité Génétique des Protéines de Réserves par Electrophorèse

Les graines de *Medicago truncatula* accumulent une large quantité de protéines à la maturité jusqu'à 32- 42 % du poids sec (Djemel *et al.* 2005). La salinité est un stress abiotique important qui affecte significativement la croissance des légumineuses en relation avec l'expression des protéines issues des protéines de réserves des graines. Ce genre de protéines sont considérés comme des facteurs influençant sur la diversité génétique (Rodrigues-Quijano *et al.* 2001). Ils sont polymorphes et extrêmement stables (Valero *et al.* 2009).

La méthode SDS-PAGE est une technique adéquate pour identifier les variétés et sont utilisés avec succès dans l'évaluation de la diversité génétique (Sharma et Maloo, 2009). La caractérisation des graines est nécessaire pour l'évaluation des ressources génétiques et l'utilisation des génotypes intéressants dans les programmes de conservation et d'amélioration (Hamrick *et al.* 1991 ; Crawford *et al.* 2001). L'évaluation du niveau et de la structure de la diversité génétique des protéines de réserves des graines chez *M. truncatula* est un acquis pour l'amélioration des plantes et les programmes de conservation des ressources génétiques.

Le but de notre étude est l'évaluation de la diversité génétique entre les différents génotypes de *M. truncatula* et la détermination des bandes protéiques en relation avec la tolérance au stress salin.

Matériels et méthodes

1. Matériel

Des graines appartenant aux quartes génotypes différents de *M. truncatula*, étudiés dans le chapitre (2) ont été utilisés pour l'analyse de la diversité génétique des protéines de réserves.

2. Méthodes

2. 1. Extraction des protéines de réserves et SDS-PAGE

Nous avons extrait les protéines de réserves des graines selon la procédure de Fyad Lamèche (1998) modifiée. Les protéines sont extraites à partir de chaque graine pour chaque génotype et homogénéisées avec le tampon d'extraction (50 mM Tris-HCl (pH :6,8), 2% SDS, 2,5 % beta-mercaptoethanol, 10 % Glycerol). Les échantillons sont centrifugés à 14000 tours par minute durant 15 min et le surnageant est séparé pour les différents essais. La procédure Laemmli (1970) a été utilisé pour l'analyse des protéines par l'électrophorèse en SDS PAGE discontinu verticale (4,5 et 7,5 %). La méthode de coloration standard et la décoloration a été utilisé pour visualiser clairement les fragments protéiques pour un scorer (scoring) des bandes : les gels ont été colorés dans 0.25 % de bleu de coomassie brillant blue - R250, décolorés dans 50 % de méthanol v/v, 40 % d'acide acétique v/v et 10% d'eau distillée.

2. 2. Analyse des données

Les électrophoregrammes de chaque génotype ont été scorés et la présence d'une bande (1) ou l'absence (0) a été noté. La présence ou l'absence d'une bande ont été enregistré dans une matrice binaire et analysé par le logiciel Statistica (version 6.1), basé sur le coefficient de similarité de Jaccard. Le dendrogramme est construit selon de la méthode d'un groupe de paire non pondéré avec les moyennes arithmétiques (UPGMA ; Fig 20).

Cette partie expérimentale a été réalisée au sein du Laboratoire d'Amélioration des Plantes à l'université d'Oran 1.

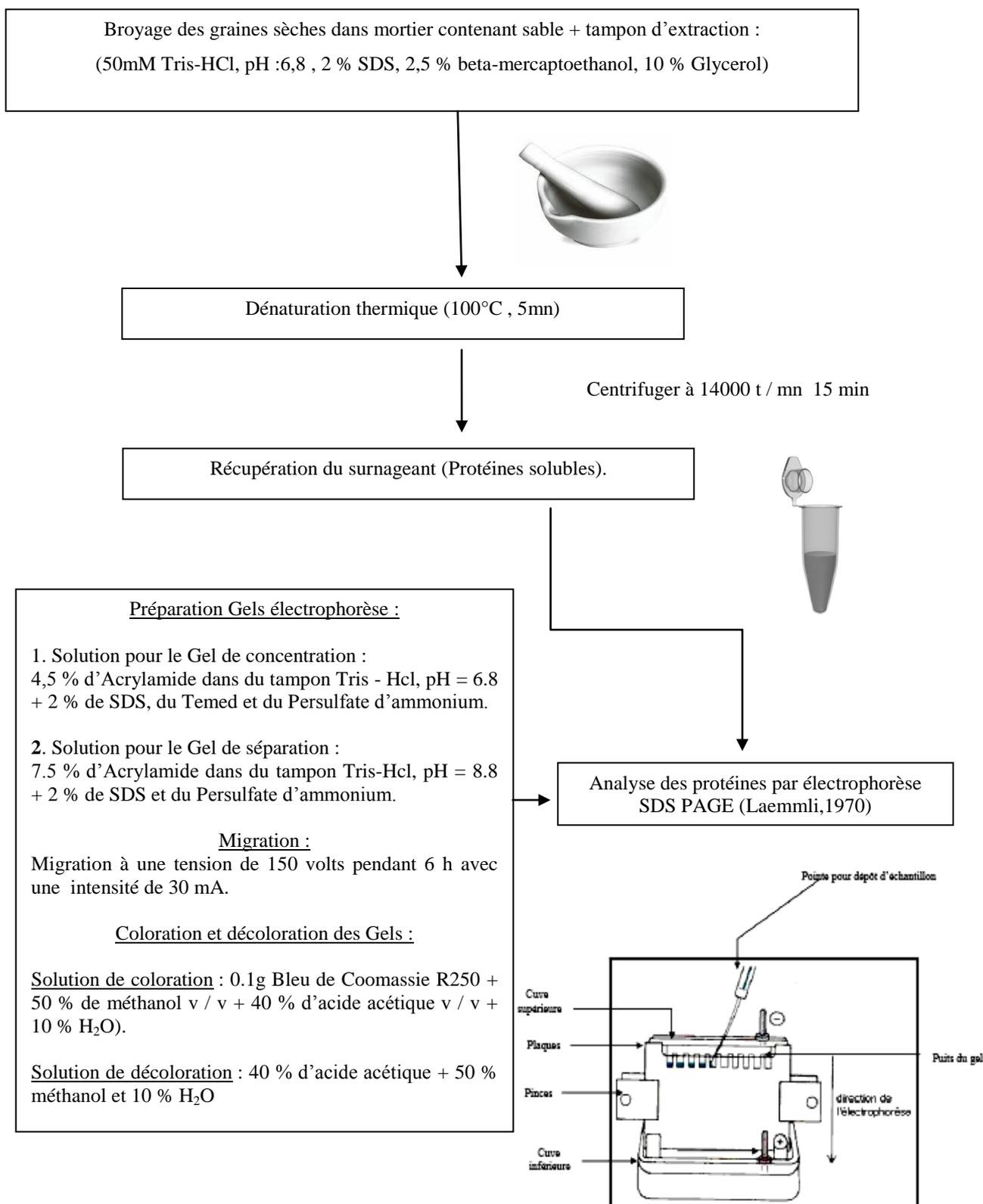


Schéma 3 : Protocole d'extraction et analyse des protéines de réserves par électrophorèse SDS PAGE

Résultats et interprétation

1. Analyse du polymorphisme des profils protéiques

Les profils des protéines chez les différents génotypes de *Medicago truncatula* ont été étudiés et révèlent des variations quantitatives et qualitatives en terme du nombre de bandes, leurs intensités et leurs poids moléculaires (Tab 7). En se basant sur le poids moléculaire des bandes, les profils ont révélé trois régions.

La région I (10 - 40 kDa) comprend 10 bandes. La région II (40 - 60 kDa) consiste en 5 bandes et la région III (60 - > 80 kDa) apparaît avec 5 bandes. Les 20 bandes protéiques (polypeptides) de poids moléculaire divers allant de 10 à > 80 kDa ont été identifiées. Deux sont monomorphiques (bande 1 et 9) localisées dans la région I et II, respectivement, et sont communes chez tous les génotypes. Les génotypes montrent une considérable variation dans le nombre de bandes protéiques allant de 7 à 14 bandes. Parmi ces génotypes, le génotype tolérant Tru 131 montre un maximum de bandes protéiques (14), alors que le génotype sensible Tru 26 montre un minimum de 7 bandes. Les génotypes Tru 673 et *Jemalong* ont enregistré un nombre moyen de bandes, dix et onze respectivement. Les bandes 6, 11 et 15 sont absentes chez le génotype sensible (Tru 26). Cependant, la bande (4) est présente seulement chez *Jemalong* et les bandes 3,5,8,10 et 18 sont présentes chez le génotype Tru 673, les bandes 7 et 20 chez le génotype Tru 131. Toutefois, les bandes 13 et 14 (région III) très polymorphes, sont présentes chez les génotypes tolérants (Tru 131 et Tru 673) mais non chez les génotypes sensibles (Tru 26 et *jemalong*). Ces bandes protéiques (polypeptides) peuvent être considérées comme spécifiques aux génotypes tolérants (Fig 19). En même temps, on note la présence des bandes 16 et 17 hautement polymorphes chez le génotype tolérant Tru 131 et le génotype sensible. Ces bandes sont absentes chez les autres génotypes.

2. Recherche de similarités par analyse des clusters

L'indice de similarité pour les quatre génotypes varie de 13,3 à 66,7 %. Un haut pourcentage de similarité entre les génotypes Tru 131 et *jemalong* a été enregistré et qui est de 66,7 %, malgré leurs différences pour la tolérance au stress salin, car il y a plus de bandes intenses (variations quantitatives) chez le génotype tolérant (Tru 131) que le génotype sensible (*jemalong*), alors qu'un minimum de similarité existe entre les génotypes (Tru 26 et Tru 673) avec des variations quantitatives majeures. L'analyse du regroupement (Clustering) des génotypes basée sur l'indice de similarité et UPGMA donne trois groupes différents (Fig 20). Le premier groupe comprend un génotype modérément tolérant (Tru 673). Le deuxième groupe composé de deux génotypes contrastés Tru 131 et *Jemalong* vis-à-vis du stress salin mais avec des modifications quantitatives majeures (présence des mêmes bandes avec différentes intensités). Le troisième groupe comprend un seul génotype (Tru 26), jugé sensible au stress salin.

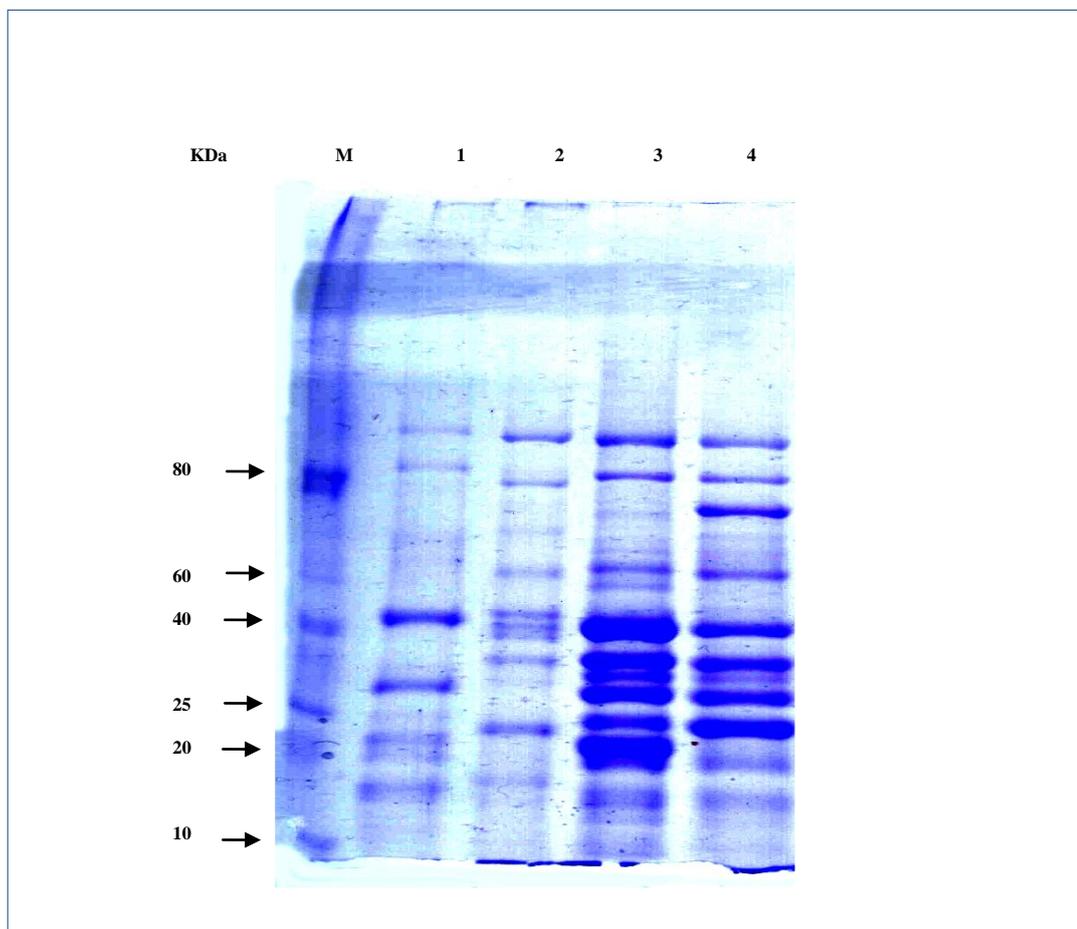


Fig 19 : Profils des protéines de réserves chez les quatre génotypes de *M. truncatula*.
M: molecular weight marker (10 - 256 KDa: *BioLabs*).
1 : Tru 26. 2 : Tru 673. 3 : Tru 131. 4 : Jemalong.

Tab 7 : Nombre et Type de bandes de la diversité génétique chez les quatre géotypes de *Medicago truncatula*.

Région	Bandes N°	Valeurs Rf	Poids moléculaire (kDa)	Géotypes			
				Tru 26	Tru 673	Tru 131	Jemalong
Région I	1	0,37	>80	1	1	1	1
	2	0,41	> 60 - 80	1	0	1	1
	3	0,43		0	1	0	0
	4	0,46		0	0	0	1
	5	0,49		0	1	0	0
Région II	6	0,55	> 40- 60	0	1	1	1
	7	0,57		0	0	1	0
	8	0,62		0	1	0	0
	9	0,64		1	1	1	1
Région III	10	0,65	10- 40	0	1	0	0
	11	0,66		0	1	1	1
	12	0,69		1	0	1	1
	13	0,71		0	0	1	1
	14	0,74		0	0	1	1
	15	0,79		0	1	1	1
	16	0,82		1	0	1	0
	17	0,84		1	0	1	0
	18	0,86		0	1	0	0
	19	0,89		1	0	1	1
	20	0,91		0	0	1	0
Nombre totale de bandes				07	10	14	11
Nombre de bandes monomorphiques				02 (Region I and II)			

Tab 8 : Matrice de similarité basée sur le coefficient de Jaccard pour les protéines de réserves des graines chez les géotypes de *M. Truncatula*.

Genotypes	Tru 26	Tru 673	Tru 131	Jemalong
Tru 26	1	0.133	0.500	0.385
Tru 673		1	0.263	0.312
Tru 131			1	0.667
Jemalong				1

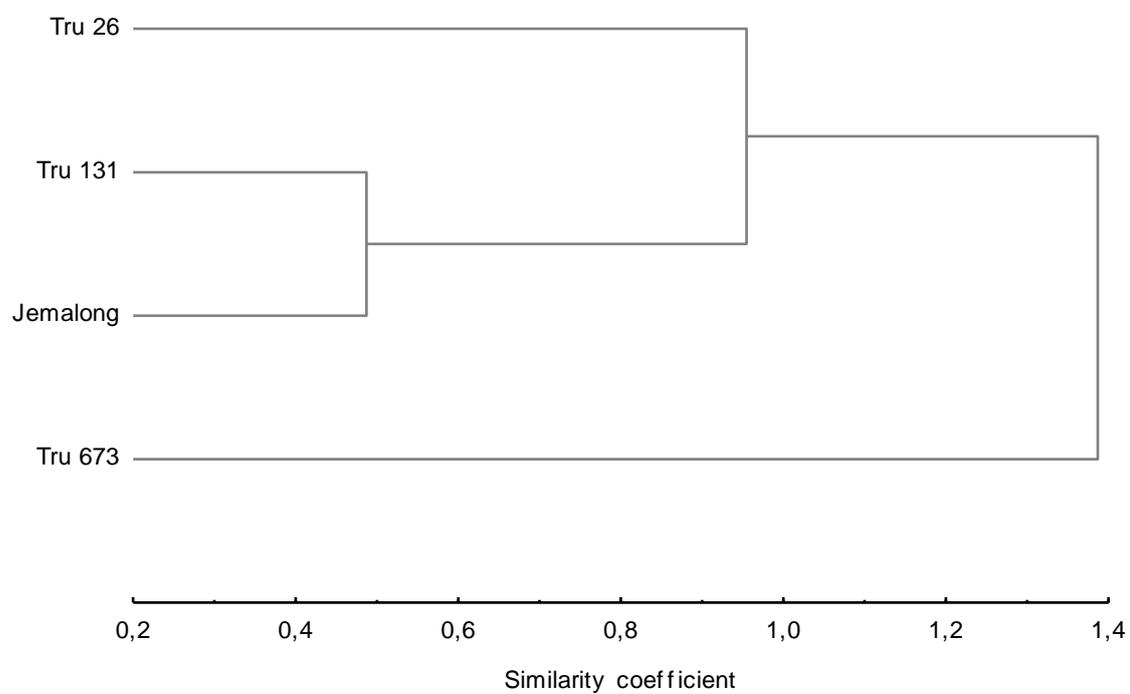


Fig 20 : Dendrogramme (UPGMA) basé sur les profils protéiques des protéines de réserves chez *M. Truncatula*.

Discussion

Les profils des protéines chez les différents géotypes de *Medicago truncatula* révèlent des variations quantitatives et qualitatives. Les profils protéiques des graines sont souvent spécifiques des espèces et hautement stables (Ladizinsky et Hymowitz, 1979). Ces mêmes auteurs rapportent la présence d'une variation dans le nombre et la position et l'intensité des bandes chez des accessions de *M. truncatula*, suggérant que ces bandes sont sous contrôle d'un système de gènes quantitatives.

Les résultats décrits ci-dessus, montrent que la région III est plus polymorphe que les régions I et II. Ceci suggère que la région III est hautement polymorphe et sans la présence de bandes monomorphes. Cette région est peut être impliquée dans le contrôle de la tolérance au stress salin chez *Medicago truncatula*. Fyad Lamèche *et al.* (1996) affirment que la variation des bandes (absence ou présence) au sein des espèces annuelles du genre de *Medicago* peut être due à l'expression d'un seul locus, ou chaque bande est contrôlée par un allèle et chaque bande correspond à un monomère. Une autre suggestion signalée par Shepherd (1968) et Kalinova (2006), que chaque bande est gouvernée par plusieurs gènes localisés sur différents chromosomes.

L'indice de similarité pour les quatre géotypes, nous a permis d'évaluer le degré de ressemblance et de diversité entre les profils protéiques de chaque géotype. Damerval *et al.* (1987) suggèrent que les variations quantitatives dans les niveaux du produit d'un gène révélées par la technique d'électrophorèse est une base plus importante dans la détection des changements morphologiques et adaptatives que les variations classiques (présence /absence) de bandes. Dans le même contexte, Malik *et al.* (2009), montrent que des accessions du soja à partir de sources variées diffèrent considérablement, indiquant qu'il n'y a pas une relation définie entre la diversité génétique et la diversité géographique. Des résultats similaires ont été reportés par (Ghaffour *et al.* 2003) chez le pois chiche. Le degré de lien génétique entre les géotypes, en se basant sur les informations obtenues du dendrogramme (pedigree) peut être parfois être imprécis ou incomplet (Maccaferri *et al.* 2003). Djabeur *et al.* 2008, ont montré que des modifications intraspécifiques existent dans les profils protéiques de l'espèce *Lygeum spartum L.*, une graminée pérenne. Ces modifications étaient concomitantes avec des facteurs externes climatiques.

Le dendrogramme obtenu dans notre étude, révèle une diversité génétique modérée car deux parmi les quatre génotypes sont dans différents groupes appartenant à la même espèce. Nos résultats suggèrent que les deux génotypes contrastés (Tru 673 et Tru 26), montrent un meilleur démarquage des profils protéiques pour leurs présence ou absence de bandes, mais l'intensité des bandes est très recommandée pour une bonne discrimination entre les génotypes tolérants et sensibles, ceci est illustré par exemple, par la comparaison entre le génotype tolérant (Tru 131) avec une intensité des bandes élevée et le génotype sensible (Tru 26) avec une faible intensité.

En conclusion, la technique SDS-PAGE des protéines de réserves des graines peut être utilisé pour l'évaluation de la diversité génétique chez *Medicago truncatula* en relation avec les données sur la tolérance au stress salin. L'analyse des résultats a révélé une variation modérée entre les génotypes, ainsi les bandes 13 et 14 sont spécifiques des génotypes jugés tolérants Tru 131 et Tru 673. Aussi l'intensité des bandes protéiques en relation avec le stress salin est vraiment recommandée pour discriminer entre les génotypes tolérant et ceux jugés sensibles comme par exemple entre Tru 131 et Tru 26. Ces informations peuvent être utilisées pour identifier spécialement les nuances entre les différents génotypes sous stress salin chez l'espèce modèle *Medicago truncatula*.

Chapitre 4

Étude du Comportement de deux Génotypes contrastés de *Medicago truncatula* Gaertn vis-à-vis du Stress Salin

Étude du Comportement de deux Géotypes contrastés de *Medicago truncatula* Gaertn. vis-à-vis du Stress Salin

A un stade précoce de développement des jeunes plants, la germination devient un facteur déterminant pour le développement de la plante sous l'action de la salinité. Ainsi, toutes les graines n'ont pas la même capacité de tolérer la dessiccation. Les protéines qui s'accumulent chez les plantes en croissance sous l'effet du stress salin, jouent un rôle important dans l'ajustement osmotique (Singh *et al.* 1987). Il est donc intéressant de trouver une association entre la teneur en protéines solubles au cours de l'ontogénèse et la tolérance au stress salin, car, la diminution de la synthèse des protéines et le polymorphisme dans les profils protéiques est un phénomène commun pour les différentes plantes sous stress salin (Merril, 1990).

L'objectif de la présente étude, est d'évaluer la variabilité génétique au niveau phénotypique (aptitude de germination) et au niveau biochimique (synthèse des protéines solubles) pour la tolérance au stress salin entre deux géotypes contrastés, l'un tolérant Tru 131 et l'autre sensible Jemalong.

Matériels et méthodes

1. Matériel

Notre étude a porté sur deux géotypes contrastés de *M. truncatula*. Le tolérant (Tru 131) nous a été fournis par l'IDGC Belabess et le géotype Jemalong «sensible», ont été utilisés à quatre concentrations de NaCl (0, 68, 102 et 137 mM).

2. Méthodes

2.1. Condition de germination et paramètres calculés

Pour chaque géotype, quarante graines scarifiées après désinfection sont réparties en quatre lots, le lot témoin et trois lots traités à différentes concentrations. Les graines sont mises à germer à l'obscurité en boîte de Petri fermées et tapissées avec du papier filtre imbibé du milieu correspondant, dans une étuve à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Chez *Medicago truncatula*, la condition optimale est l'obscurité et la lumière diminue la vitesse de germination (Gimeno Gilles, 2009). Les graines germées sont dénombrées quotidiennement afin d'analyser la cinétique de germination, l'émergence de la radicule étant l'indicateur de la germination. Les boîtes de Pétri sont arrosées tous les deux jours (3 ml par boîte de solution des différentes concentrations de NaCl) pour maintenir les graines toujours imbibées.

Neuf jours après le semis et à une température de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, le taux de germination (TG) est calculé afin d'analyser la capacité germinative, car après cette durée, un taux élevé de graines germées est observé aux différentes doses de salinité. Ces taux représentent le pourcentage de graines germées par rapport au total de graines semées.

Pour déterminer la tolérance d'un génotype, un indice (I.T) égal au rapport de la valeur notée sous stress sur celle du témoin, est calculé. Il a été considéré que les plantes tolérantes ont un indice de tolérance plus élevé que les plantes sensibles. Afin de normaliser les deux variables (TG et I.T), les valeurs ont été analysées après transformation mathématique par $(\text{Arcsin}\sqrt{x})$ afin de normaliser les données (loi normale). Le dispositif expérimental utilisé est un dispositif bloc, échelonné dans le temps, complètement aléatoire, avec trois répétitions ($n = 3$). Dans chaque répétition, chaque génotype est représenté par dix individus.

2.2. Détermination de la teneur en protéines des jeunes plants sous stress salin

La teneur en protéines de réserves a été déterminée par la même méthode décrite dans le chapitre 2. La teneur des jeunes plants en protéines solubles (mg / g) a été calculée en fonction du poids frais des jeunes plants (mg) pour chaque génotype.

Cette partie expérimentale a été réalisée au sein du Laboratoire d'Amélioration des Plantes à l'université d'Oran 1.

Résultats et interprétation

1. Etude de la variabilité de la tolérance à la salinité au niveau phénotypique et biochimique durant la germination

Le stress salin, quelle que soit la concentration en NaCl, diminue le taux de germination des graines. Le test de l'analyse de variance à deux facteurs, s'est révélé hautement significatif pour l'effet traitement sur le taux de germination (Tab 9). Les taux de germination en absence de stress sont compris entre 90 et 100 %. Le génotype Tru 131 présente l'indice de tolérance le plus élevé pour le taux de germination quel que soit le traitement par rapport à Jemalong. Les indices de tolérance du taux de germination enregistrés sur l'ensemble des trois répétitions de l'expérience montre que le génotype Tru 131 est le plus vigoureux et qui tolère le mieux au stress salin, tandis que le génotype Jemalong, le moins vigoureux, tolère le moins l'effet de ce stress.

A la lecture du Tableau 9 sur l'analyse de variance à deux facteurs, ceci montre un effet génotype et traitement significatifs pour l'indice de tolérance (IT), et un effet traitement hautement significatif pour le poids frais des jeunes plants. Sous stress salin, le génotype Tru 131, montre un poids frais élevé des jeunes plants (Fig 23) et une teneur en protéines augmenté par rapport à Jemalong (Fig 24).

2. Cinétique de germination

La cinétique de germination présentée sur les Figures 27, 28 et 29, montrent que les courbes relatives aux taux de germination des graines sous stress salin, sont situées en dessous de celles du témoin (Fig 26). Elles diminuent au fur et à mesure que la concentration de NaCl augmente. En conditions témoins, les deux génotypes Tru 131 et Jemalong, présentent une capacité de germination élevée surtout pour Jemalong. Pour ce dernier, la capacité germinative se stabilise à partir du deuxième jour (J2), alors que chez Tru 131, la vitesse se stabilise à partir du huitième jour (J8). Sous stress salin, les résultats de l'essai montrent que les concentrations 68, 102 et 137 mM de NaCl réduisent la vitesse et la capacité germinative des graines. Toutefois, le génotype Tru 131, s'avère le plus tolérant, avec une capacité de germination plus élevée que celle de *Jemalong* (Fig 25).

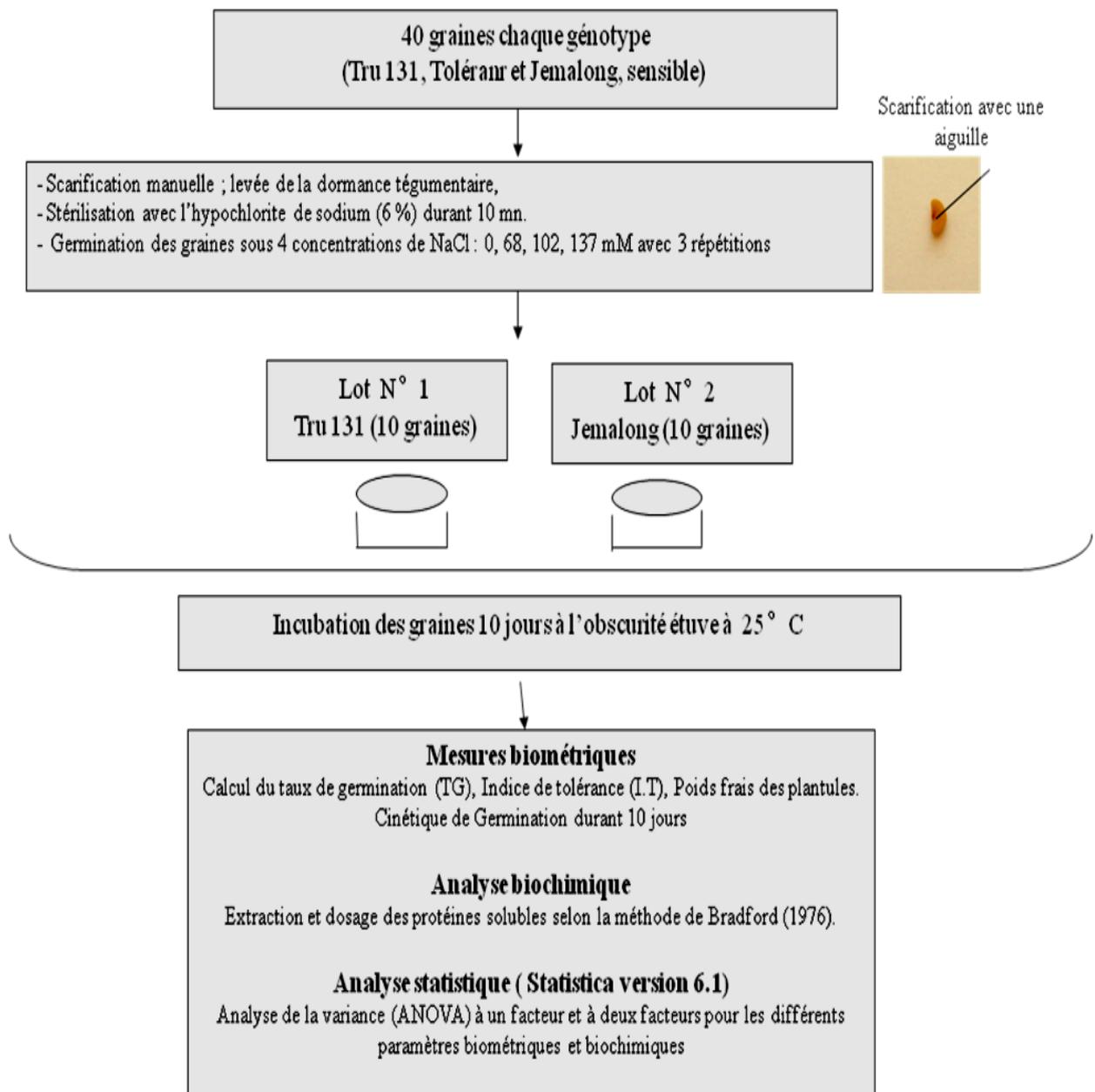


Schéma 4. Protocole expérimentale pour les analyses biométriques et biochimiques des génotypes : Tru 131, tolérant et Jemalong, moins tolérant, sous différentes concentration de NaCl.

Tab 9 : Résultats de l'analyse de variance à deux facteurs de l'effet traitement, génotype et leurs interaction pour les paramètres : taux de germination et indice de tolérance, poids frais et teneur en protéines

Source de variation	Génotypes (G)		Traitement (T) (stress salin)		Interaction (GxT)	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Taux de germination TG : %	0,04	0,853	24,27	0,000**	1,61	0,227
Indice de tolérance (IT)	6,32	0,029*	24,66	0,000**	0,09	0,911
Poids frais : mg	0,424	0,533	8,107	0,008*	1,147	0,388
Teneur en protéines : mg/g	4,737	0,061	1,020	0,434	0,311	0,817

*P < 0.05, ** P < 0.001; ns, non significatif

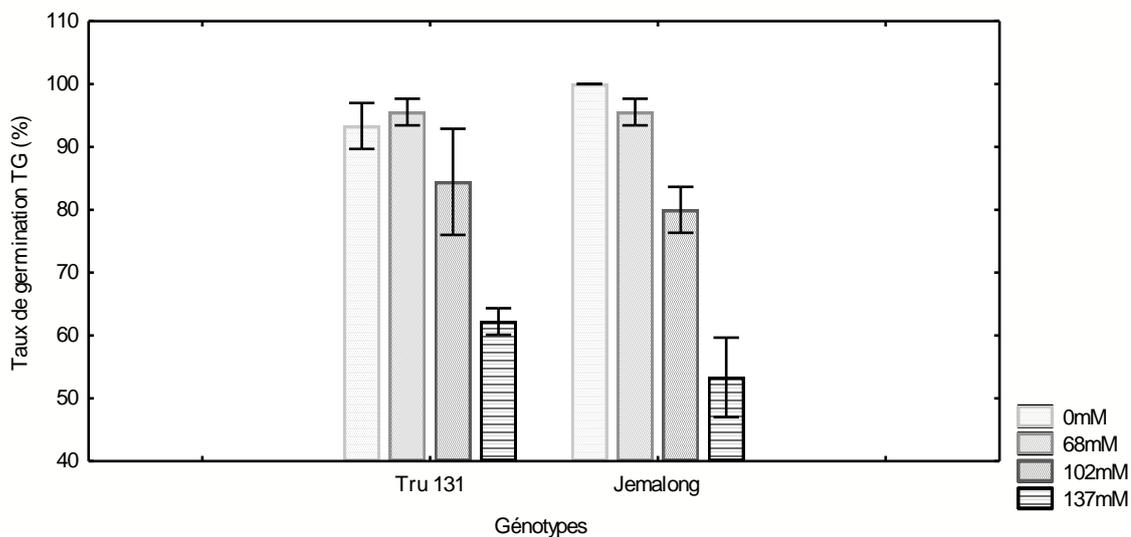


Fig 21 : Résultats du taux de germination des deux génotypes de *M. truncatula* Tru 131, tolérant et Jemalong, moins tolérant) sous l'effet NaCl. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 3 répétitions).

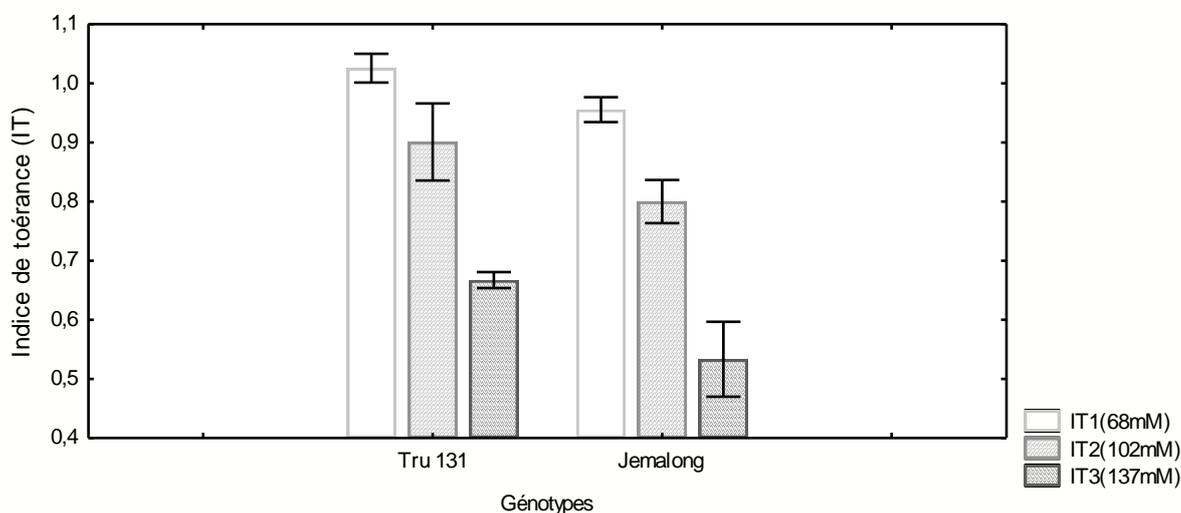


Fig 22 : Indice de tolérance des deux génotypes de *M. truncatula* (Tru 131, tolérant et Jemalong, moins tolérant) sous l'effet NaCl. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 3 répétitions).

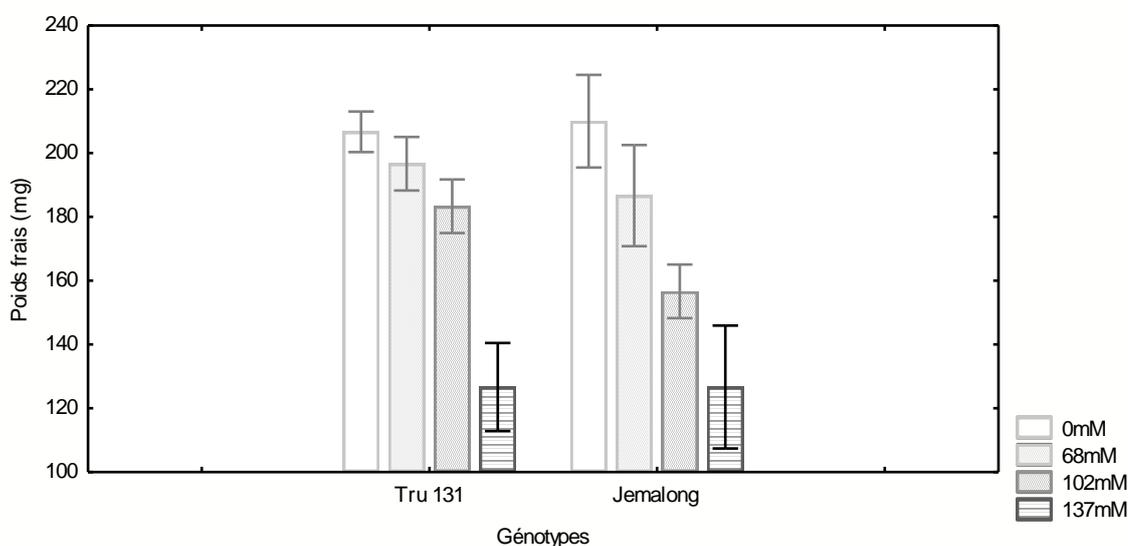


Fig 23 : Poids frais des jeunes plants des deux génotypes de *M. truncatula* Tru 131, tolérant et Jemalong, moins tolérant) sous l'effet NaCl. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 3 répétitions).

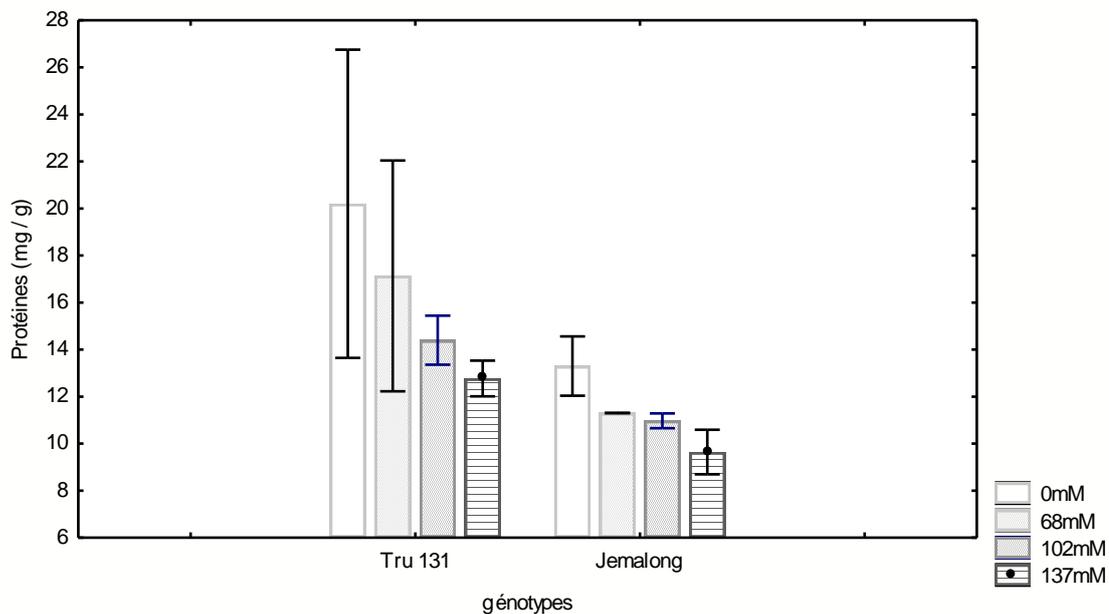


Fig 24 : Teneur en protéines solubles des jeunes plants chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula* (Tru 131, tolérant et Jemalong, moins tolérant) sous différentes concentrations NaCl. Les résultats sont des moyennes \pm S.E (n = 3 répétitions).

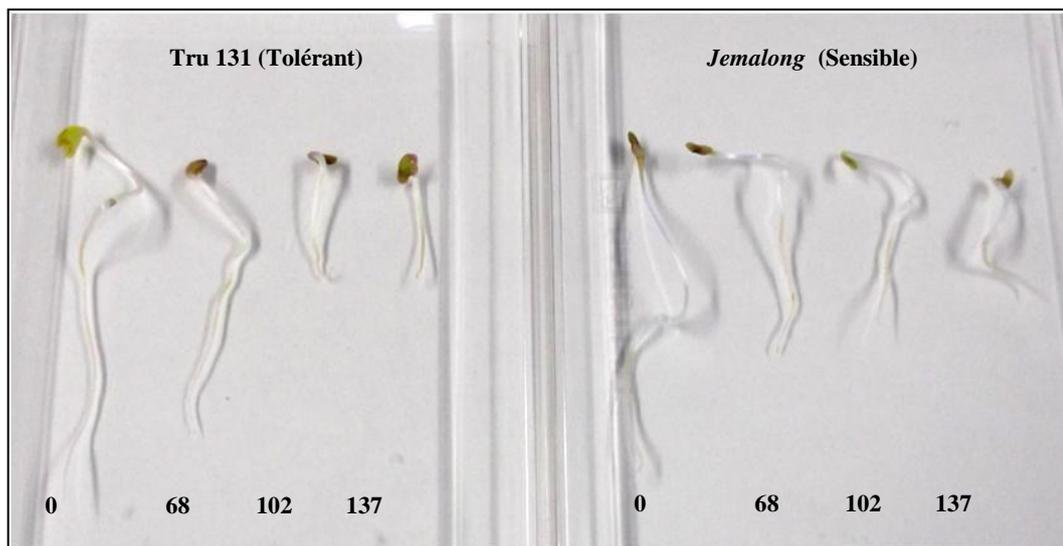


Fig 25 : Croissance des plantules de deux génotypes contrastés de *M. truncatula* (Tru 131 et Jemalong) sous différentes concentrations NaCl.

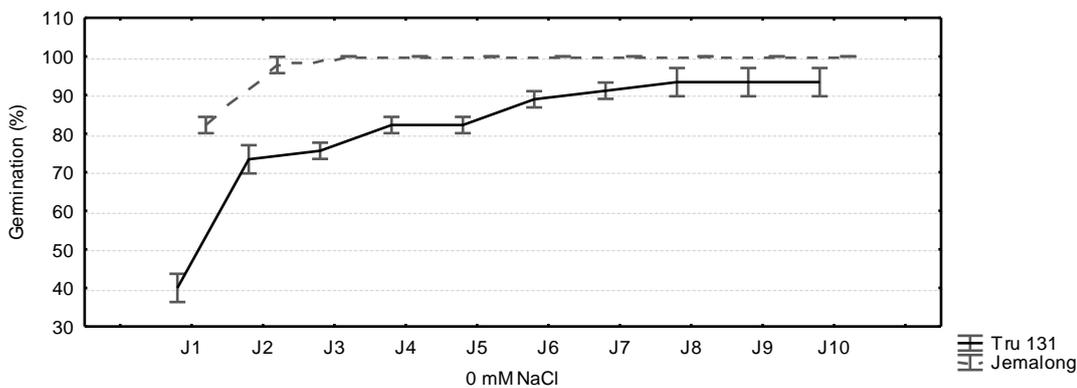


Fig 26 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* en condition témoin

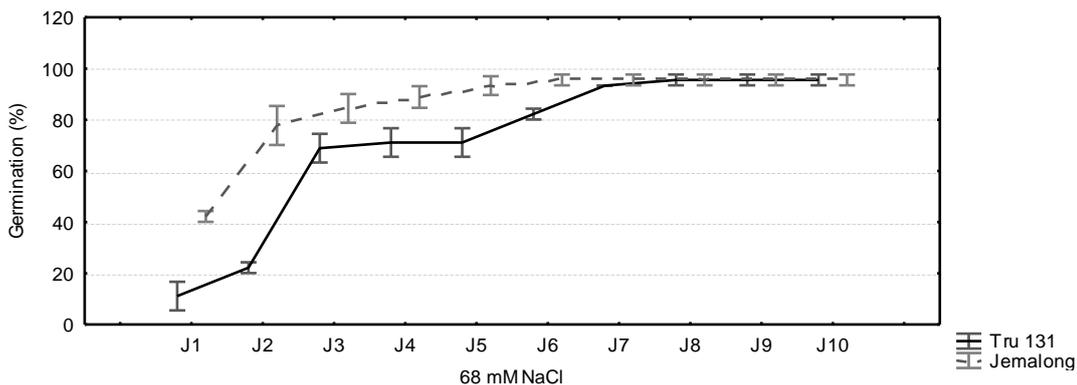


Fig 27 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* à une concentration de NaCl faible (68mM)

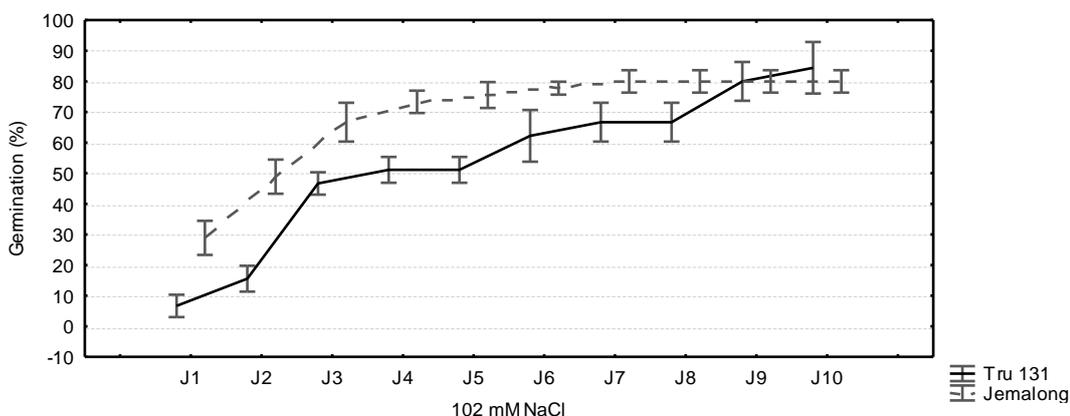


Fig 28 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* à une concentration de NaCl modérée (102mM)

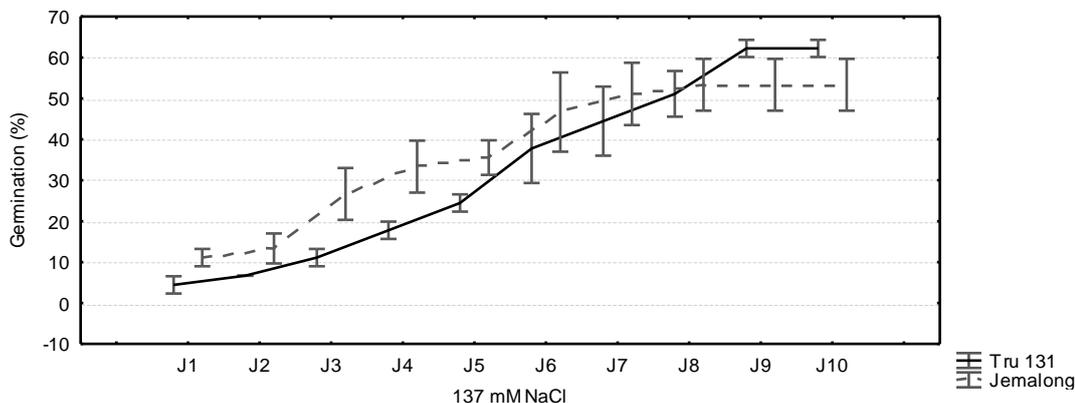


Fig 29 : Cinétique de germination des graines des deux génotypes de *Medicago truncatula* à une concentration de NaCl maximale (137 mM)

Discussion

Les données obtenus après une durée de traitement de neuf jours, indiquent que les taux de germination des graines diminuent considérablement avec l'augmentation de la salinité (Fig 21). Ainsi, toutes les graines n'ont pas une capacité identique de tolérer la salinité (Gimeno Gilles, 2009). Selon Prado *et al.* (2000), la diminution du taux de germination des graines soumises à un stress salin serait due à un processus de dormance osmotique développé sous ces conditions de stress. Les résultats analysés, illustrent que le génotype Tru 131 qui est le plus vigoureux avec un poids frais élevé des jeunes plants et une teneur en protéines augmentée, tolère le mieux le stress salin par rapport au *Jemalong*. Farissi *et al.* (2014) ont constaté que la salinité affecte négativement la production fourragère des populations marocaines de luzerne. Il en est de même pour divers paramètres qualitatifs (rapport feuilles/tiges et teneurs des plantes en azote et en protéines). Chez *Medicago sativa*, le gène *Alfin1* code pour une famille de facteurs de transcription et leur expression est corrélée avec la tolérance au sel (Winicov et Bastola 1999). Une teneur élevée en protéines solubles a été observée chez des cultivars de riz tolérants au stress salin (Ashraf et Harris, 2004). Agastian *et al.* (2000) ont rapporté que les protéines solubles augmentent à faible dose de salinité et diminuent à forte concentration chez des cultivars de mûriers.

Il a été reporté aussi que le stress salin déclenche l'expression de plusieurs protéines osmo-sensible dans les tissus de riz et une corrélation a été trouvée entre l'accumulation de ce type de protéines chez les génotypes tolérants, par rapport aux génotypes de riz sensibles la salinité (Chourey *et al.* 2003 ; Kumar *et al.* 2009). Chez les végétaux supérieurs, le stress osmotique induit la synthèse de plusieurs protéines dans les tissus végétatifs, qui sont reliés aux protéines LEA (late-embryogenesis-abundant proteins). La corrélation entre l'accumulation de ce type de protéines et la tolérance au stress, indique le rôle protecteur de ces protéines sous déficit hydrique (Ingram et Bartels, 1996). Ainsi, le protéome qui contient des niveaux élevés en protéines LEA et en chaperons, ont un rôle important dans la tolérance au stress en relation avec la dormance des graines (Grobei *et al.* 2009). A forte dose de NaCl, chez les deux génotypes étudiés, la synthèse des protéines solubles est diminuée.

La cinétique de germination révèle un ralentissement du processus de germination en fonction du stress salin. La cinétique de germination semble être régulée par la température, l'optimum varie d'un génotype à un autre et d'une espèce à l'autre selon le milieu auquel est adaptée (Gimeno Gilles, 2009). Une certaine précocité de germination a été remarqué chez *Jemalong* par rapport à Tru 131. D'après Ben Miled *et al.* (1986). Ceci semble être due à une différence dans le temps nécessaire à la graine pour mettre en place les mécanismes lui permettant d'ajuster sa pression osmotique interne.

Aussi, on remarque qu'il y a une différence dans la vitesse de germination entre les deux génotypes. Ceci est en fonction de la température et de la réponse au déficit hydrique (Brunel Muguet, 2008).

Les plantes ont développé des mécanismes complexes pour affronter les changements environnementaux. Au niveau moléculaire, ceci est illustré par de nombreux changements dans le transcriptome, observés chez les plantules, les feuilles, les racines (Kreps *et al.* 2002). De ce fait, il est possible de rechercher les bases génétiques qui expliquent le polymorphisme de réponse au stress salin au cours de la germination et durant l'ontogénèse afin de déterminer les gènes responsables de la tolérance à la salinité.

En conclusion, la variation des capacités germinatives des graines permettent de bien discriminer les génotypes quant à leur tolérance ou sensibilité au sel au cours de la germination. Ainsi, le génotype Tru 131, présente la meilleure aptitude à la germination en conditions salines avec une teneur élevée en protéines, et peut être considéré comme le plus tolérant par rapport à Jemalong. La Culture de cette plante tolérante et son introduction dans les zones arides et semi-arides, semble présenter un grand intérêt agronomique (production fourragères) et pédologique (fixation de l'azote atmosphérique).

Chapitre 5

Caractérisation Physiologique et Biochimique de la Racine de deux génotypes contrastés de *Medicago truncatula* Gaertn sous Stress Salin

Caractérisation Physiologique et Biochimique de la Racine de deux génotypes contrastés de *Medicago truncatula* Gaertn. sous Stress Salin

La salinité élevée affecte les plantes causant un stress hyper-osmotique et un déséquilibre ionique, générant des effets secondaires comme l'accumulation des éléments (ROS : reactive oxygen species) et une croissance ralentie (Hasegawa *et al.* 2000, Zhu 2001). Les enzymes antioxydants jouent un rôle crucial dans la protection des tissus des plantes sous condition de stress, principalement la salinité et la sécheresse (Franca *et al.* 2007, Lima *et al.* 2002, Poli-doras *et al.* 2005, Fotopoulos *et al.* 2008, Fotopoulos *et al.* 2010). Il a été reporté que certaines espèces peuvent développer une forte tolérance au stress salin car il y a une augmentation des enzymes antioxydants et d'autres composants (Lopez *et al.* 1996, Shalata *et al.* 2001). Divers études indiquent aussi la surexpression des gènes antioxydants, entraînant des niveaux élevés en éléments « ROS » qui améliorent la tolérance aux stress abiotiques y compris le stress salin (Badawi *et al.* 2004, M'Hamdi *et al.* 2010, Tseng *et al.* 2007, Zhao et Zhang, 2006). L'étude de ces gènes antioxydants ainsi que les enzymes et les composants qui offrent un certain degré de tolérance au stress salin peut être un avantage dans la compréhension de la tolérance à la salinité et l'amélioration des cultivars tolérants au stress abiotiques.

Le but de notre étude est d'évaluer l'importance de la défense antioxydante dans la manifestation de la tolérance à la salinité et les altérations dans le statut oxydatif chez les deux génotypes contrastés étudiés de *M. truncatula* (tolérant et sensible) au niveau racinaire.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Notre étude a été conduite sur deux génotypes contrastés de *M. truncatula*. Jemalong, le génotype de référence qui est moyennement sensible et le génotype tolérant T131 (Amouri *et al.* 2014).

2. Méthodes

2. 1. Condition de croissance sous le traitement par NaCl

Après scarification et stérilisation, les graines sont placées à 4°C durant une journée dans des boîtes de Pétri afin d'homogénéiser la vitesse de germination, ensuite transférés dans différents traitements de NaCl (Control : 0 mM, T1: 68 mM, T2: 102 mM et T3: 137 mM). Après 7 jours de traitement, les racines des jeunes plants sont sujettes aux différentes analyses physiologiques et biochimiques.

2. 2. Mesure des différents paramètres biométriques (longueur et poids des racines)

La longueur de la racine a été mesurée chez 10 individus de plantules de chaque boîte de Petri. En plus, chaque racine est pesée pour déterminer le poids frais individuel (RW).

Le poids sec (DW) est déterminé après séchage des échantillons de (5) racines à 70°C durant 48h. Notant que ce paramètre est utilisé pour le calcul de la masse moléculaire des antioxydants et le contenu en protéines solubles racinaires.

2. 3. Calcul du potentiel hydrique de la racine

Le potentiel hydrique des racines (Ψ_w) des deux génotypes et pour chaque traitement de NaCl, est mesuré par un appareil appelé osmomètre (Annexe1), ce potentiel est exprimé en unité de pression (MPa). Des échantillons de cinq (5) racines de chaque boîte sont utilisées pour mesurer le potentiel hydrique (Schéma 6).

2. 4. Détermination de l'activité Guaiacol peroxydase

L'activité Guaiacol peroxydase (EC 1.11.1.7) (GPX) a été mesurée selon l'augmentation dans l'absorbance à 470 nm en fonction de l'oxydation du Guaiacol (Nickel et Cunningham, 1969). Le milieu réactionnel comprend 100 μ L de H₂O₂ (1.5 %) + 100 μ L de Guaiacol (20 mM). Les racines des deux génotypes pour les différents traitements sont incubées durant 6 h dans le milieu réactionnel à 4° C. L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à UV visibles (Schéma 7). L'activité enzymatique est exprimée en nmol de tétraguaiacol produit par mg de protéines par minute.

2. 5. Extraction et dosages des protéines solubles racinaires

L'extraction est faite à partir de 200 mg de racines traités et non traités par NaCl des deux génotypes étudiés de *M. truncatula*. les échantillons sont homogénéisés dans 50 mM du Tris Hcl (pH=7,8) (1/4, w/v) contenant 0,1 mM EDTA, 2mM dithiothreitol (DTT), 0,2 % (v/v) Triton X-100 et 1mM PMSF. Les homogénats sont filtrés au travers une feuille de miracloth et centrifugés à 25000 x g durant 25mn à 4°C (Schéma. 8). Le surnageant est récupéré pour le dosage des protéines solubles par la méthode de Bradford (1976).

2. 6. Extraction et détermination de la masse moléculaire des antioxydants

Le Gluthatione (GSH) et l'Ascorbate (ASC) sont extraits à partir d'échantillons de racines conservées à froid et analysées, selon la méthode décrite par (Zabala *et al.* 2006), et analysés par l'électrophorèse capillaire à haute performance (Beckman Coulter Inc., USA).

L'extraction est faite à partir de 60 à 100 mg d'extrémités de racines, homogénéisées avec de l'azote liquide et de l'acide métaphosphorique (2%), contenant 1mM EDTA (1/3 ; v/v). Pour avoir la quantité du pool total du Gluthatione (GSH+GSSH) et de l'ascorbate (ASC+DHA), Les extraits des antioxydants sont traités avec le dithiothreitol (DTT). Les formes réduites sont directement mesurées à partir d'extraits de pointes de racines (Davey *et al.* 2003) après calibration avec du GSH et ASC purifiés (Schéma. 9).

Nb : Pour chaque paramètre étudié, les racines ont été conservées dans l'azote liquide.

2. 7. Analyse statistique

Nous avons représenté les résultats de tout les paramètres en moyenne \pm SE (erreur standard), pour chaque traitement, avec 3 répétitions de mesures. Tout les tests statistiques sont obtenus par le logiciel Statistica version 6.1 et Microsoft office Excel. Nous avons utilisé l'analyse de variance à deux facteurs (ANOVA) afin d'étudier l'interaction entre l'effet traitement par NaCl et l'effet génotype (pour $P < 0.01$ et $P < 0.05$).

Cette partie expérimentale a été effectuée au sein du Laboratoire de Physiologie Végétale à l'Université de NAVARA en Espagne.

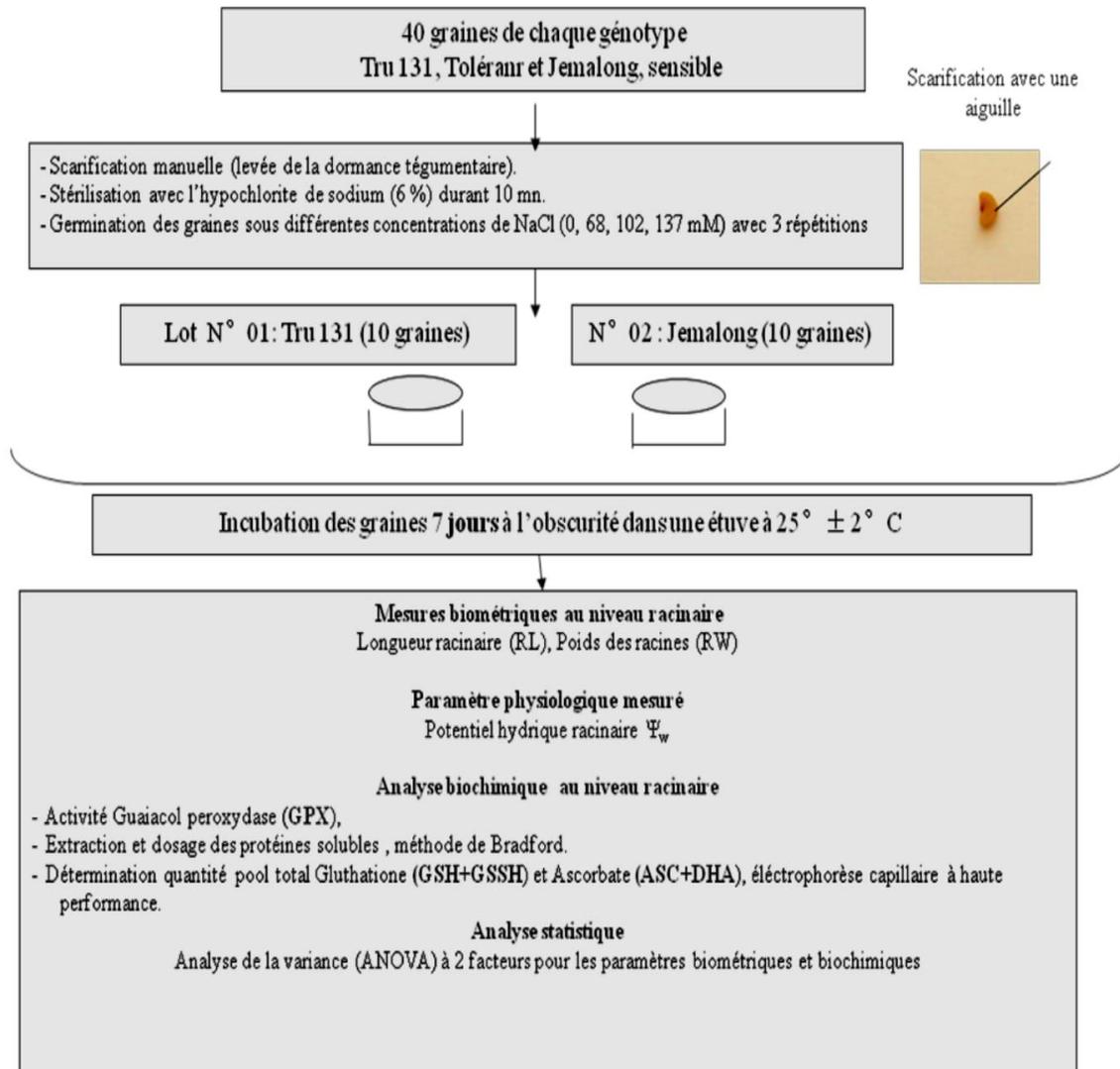


Schéma 5 : Protocole expérimentale pour les analyses biométrique, physiologique et biochimique au niveau racinaire, de 2 génotypes Tru 131 et Jemalong, sous différentes concentration de NaCl.

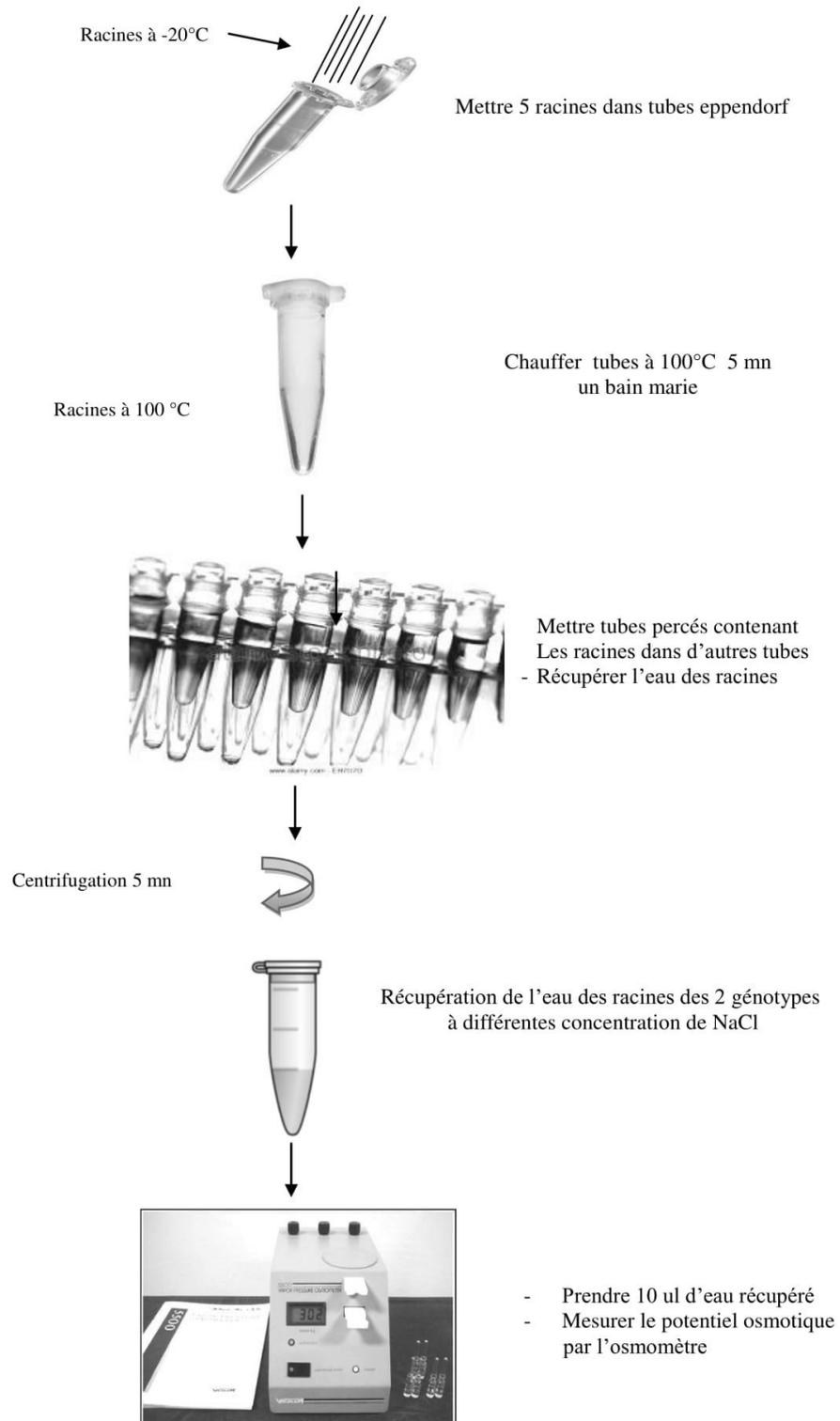


Schéma 6 : Etapes de mesure du potentiel hydrique (Ψ_w) racinaire des 2 génotypes de *M. truncatula* à différentes concentration de NaCl

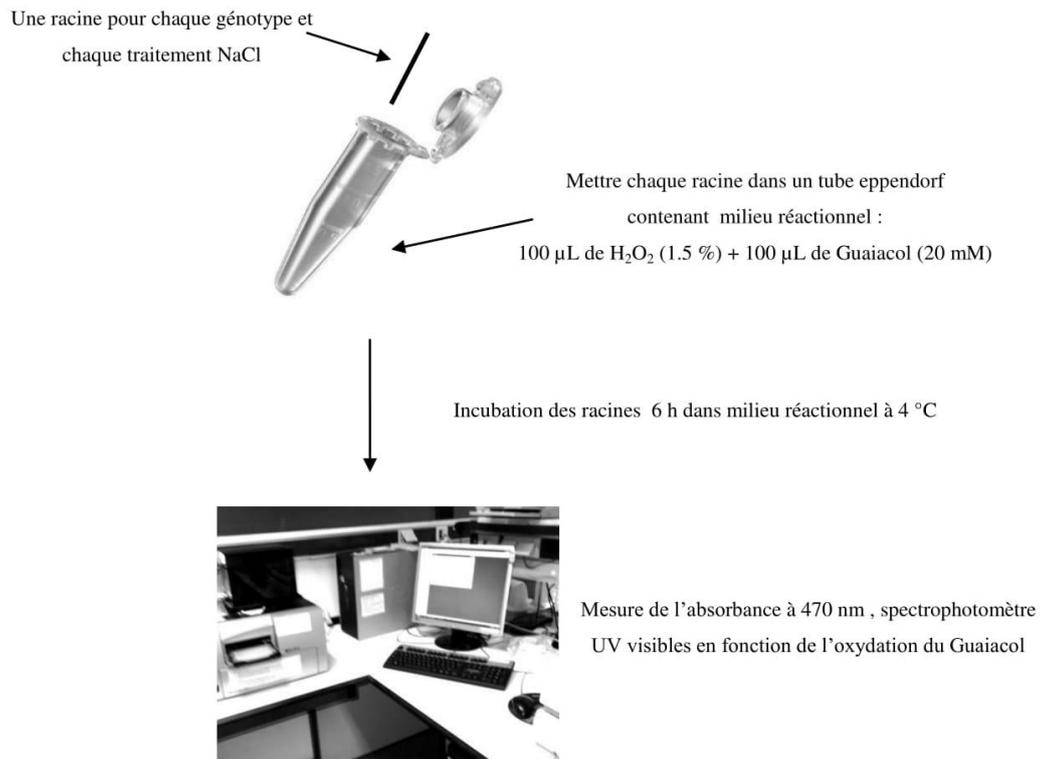


Schéma 7 : Mesure de l'activité GPX au niveau des racines des 2 génotypes de *M. truncatula* aux différents traitement par NaCl

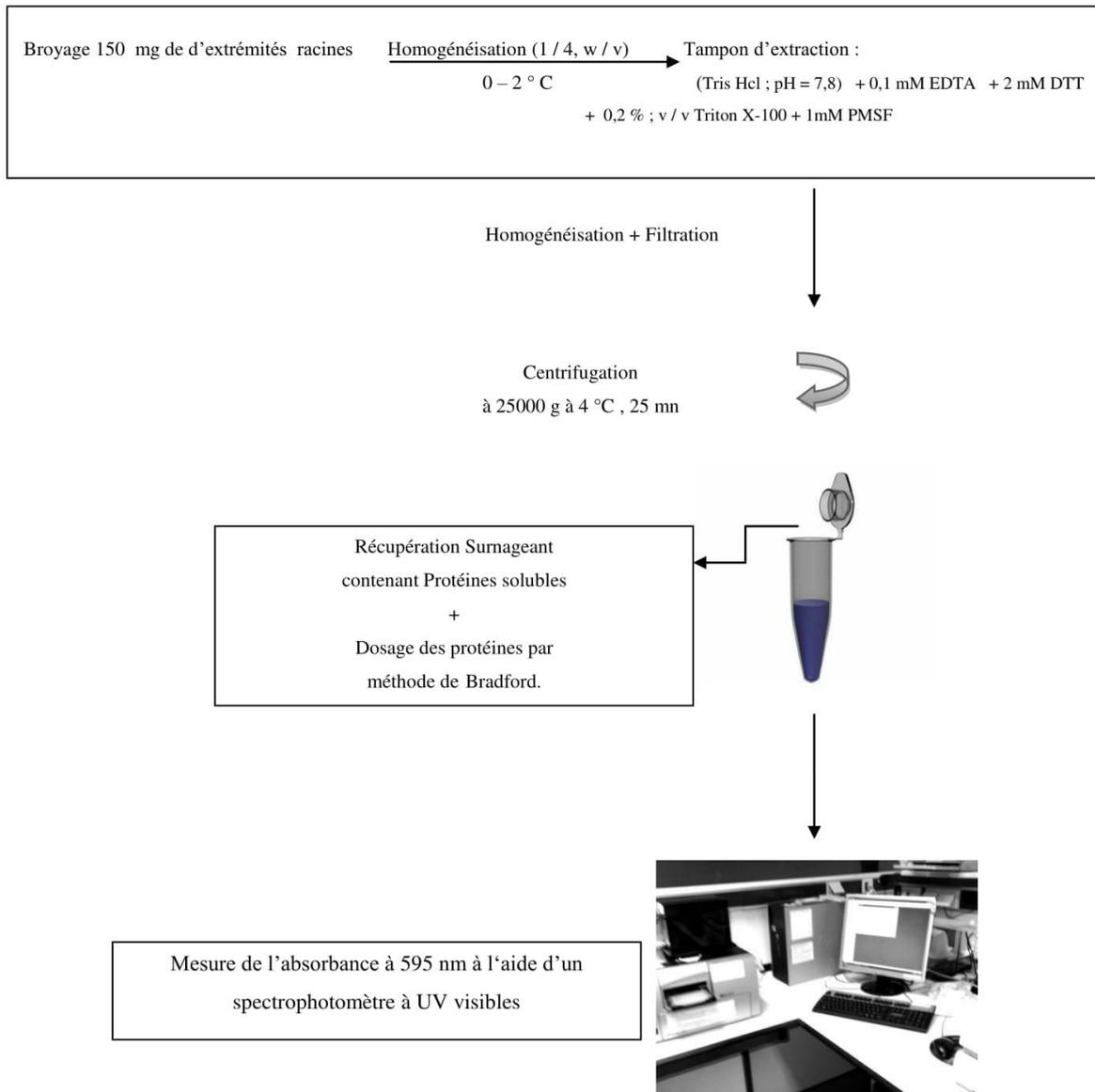


Schéma 8 : Extraction et dosage des protéines solubles racinaires de 2 génotypes de *M. truncatula* (Tru 131 et Jemalong) à différentes concentration de NaCl

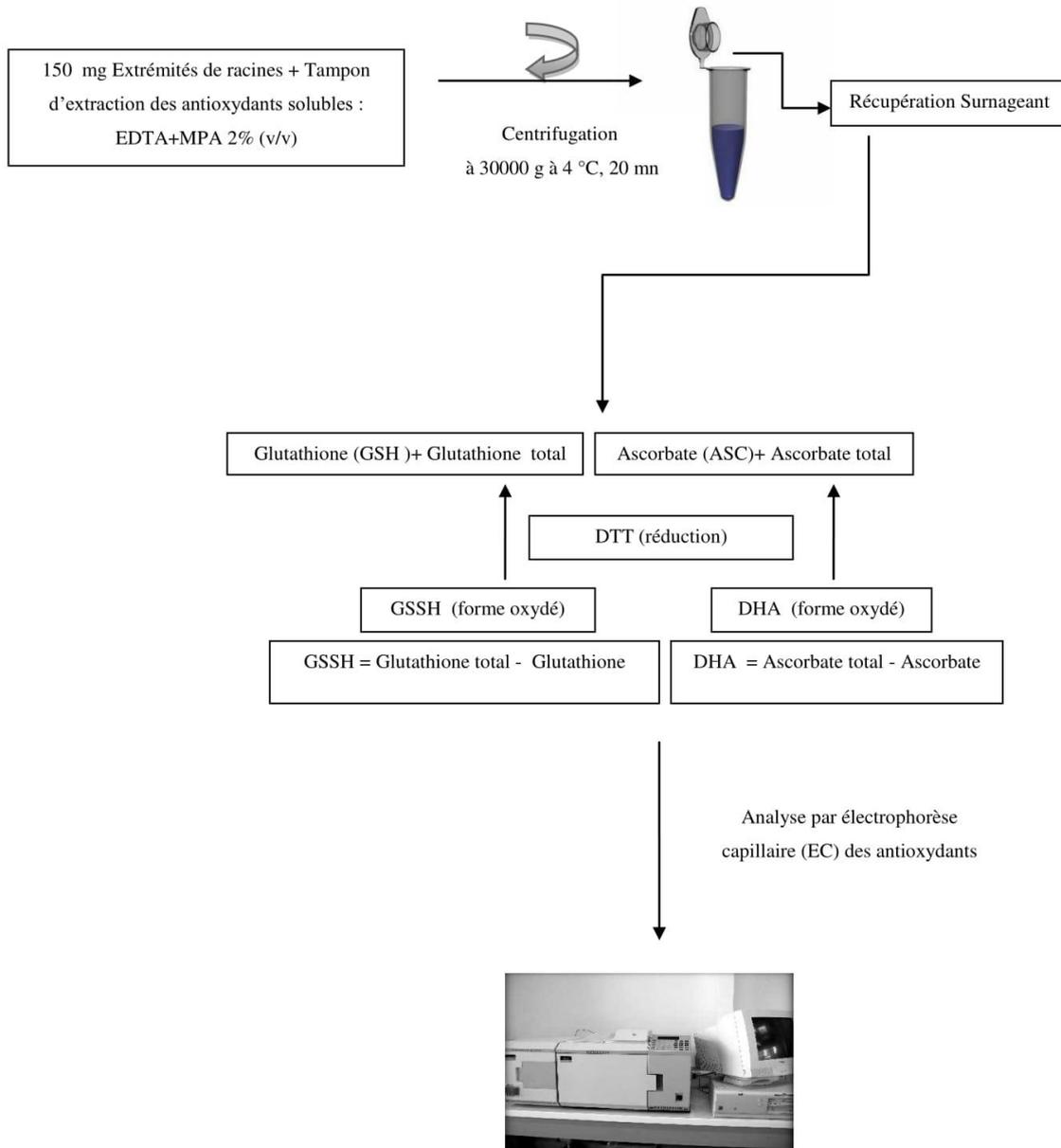


Schéma 9 : Extraction et analyse des antioxydants de 2 génotypes de *M. truncatula* à différentes concentrations de NaCl

Résultats et interprétation

1. Effet du stress salin sur la longueur, le poids et le potentiel hydrique de la racine

Les résultats de l'analyse de variance (Tab 10) ne montrent pas des différences significatives concernant la longueur de la racine (RL), poids individuel des racines (RW), leur potentiel hydrique. Chez les jeunes plants traités au stress salin, la longueur de la racine diminue (Fig 30). En général, tout les paramètres de croissance racinaire mesurés diminuent avec l'augmentation de la salinité.

Le potentiel hydrique des racines, diminue considérablement chez le génotype jugé tolérant Tru131 par rapport génotype sensible Jemalong (Fig 32), ceci démontre la capacité des racines du génotype tolérant Tru 131, à absorber suffisamment de l'eau du milieu extérieur par rapport au génotype moins tolérant.

Concernant le poids sec des (DW), les résultats n'ont pas montré des différences significatives au stade de 7 jours du développement des racines, mais on remarque que le génotype Tru 131 présente un poids élevé surtout à la concentration de 102 mM de NaCl (voir résultats en annexe 1).

2. Effet du stress salin sur l'activité Gaïacol peroxydase (GPX)

L'activité in vivo de Gaïacol peroxydase, (Fig 33), montre qu'il y a une augmentation de l'activité Guaiacol peroxydase à la concentration minimale de 68 mM de NaCl chez les deux génotypes, alors qu'à la dose de 102 mM, l'activité GPX diminue chez les deux génotypes. A une concentration maximale de 137 mM de NaCl, l'activité GPX augmente significativement chez le génotype tolérant Tru 131, de 2,96 à 6,28 nmols/mg prot/min, par rapport au génotype Jemalong.

Il est intéressant de noter que lorsqu'il y a une augmentation dans le contenu en protéines solubles chez le génotype tolérant Tru 131 à une concentration élevée de 137mM (Fig 34), en parallèle, il y a une augmentation dans l'activité GPX qui est impliqué dans la tolérance au stress salin. Inversement, l'activité GPX diminue avec le contenu en protéines chez le génotype sensible Jemalong à 102 mM de NaCl.

3. Effet du stress salin sur le contenu racinaire en protéines

Le contenu racinaire en protéines solubles chez le génotype tolérant Tru 131 diminue de 14,92 % jusqu'à la dose de 137 mM de NaCl. Alors que chez Jemalong la diminution du contenu protéique s'observe qu'après la dose 102 mM c'est-à-dire seulement à la concentration maximale de 137mM (Fig 24).

4. Effet du stress salin sur le contenu racinaire en Ascorbate et en Gluthatione

Nous avons considéré les résultats obtenus avec trois traitements (0, 68 et 137 mM) au lieu de quatre, car il n'y a pas de différence de résultat obtenu avec le traitement de 102 mM comparé à celui du traitement 68 mM, et ceci afin de simplifier les interprétations des résultats.

Les résultats obtenus à partir de l'analyse de variance sur l'analyse de l'Ascorbate et le Gluthatione (Tab 10), ont montré une différence significative entre les deux génotypes contrastés étudiés pour les paramètres antioxydants au niveau racinaire (GSH+GSSH) et non significative pour le pool d'Ascorbate. Ces résultats suggèrent que tous les paramètres liés au Gluthatione (GSH) sont utiles pour discriminer entre les deux génotypes contrastés. Ainsi, le pool GSH+GSSH s'avère un bon critère pour l'évaluation de la tolérance au stress salin au niveau racinaire chez *Medicago truncatula*.

La figure 35, montre que la salinité a provoqué une augmentation du pool ASC+DHA à une faible concentration de NaCl (68 mM) chez les deux génotypes Tru 131 et Jemalong (6,56 et 6,63 mg / g DW) respectivement (Tab 11). A la concentration plus élevée de 137mM, le pool ASC+DHA augmente beaucoup plus chez le génotype tolérant (7,96 mg / g DW) par rapport au sensible (5,78 mg / g DW).

La figure 36, montre que quelque soit la concentration de NaCl, le pool GSH+GSSH est largement supérieur chez le génotype tolérant (Tru 131) par rapport à *Jemalong*, moins tolérant. Par exemple, à la dose de 137 mM de NaCl, le génotype Tru 131 a un pool de 2,99 mg / g DW, alors que *Jemalong* exprime seulement 0,16 mg / g DW.

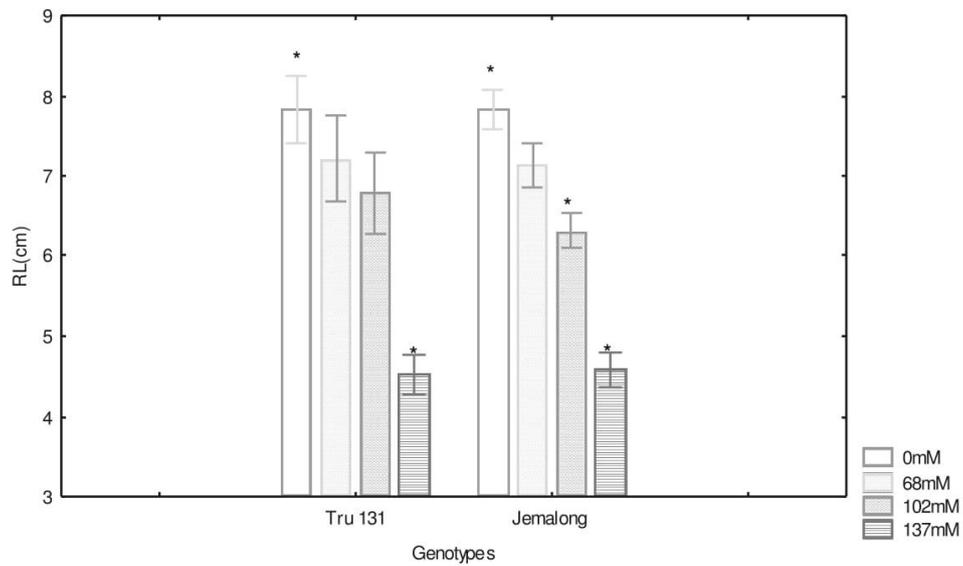


Fig 30 : Longueur racinaire (RL) chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula*, Tru 131 et Jemalong, exposés au stress salin

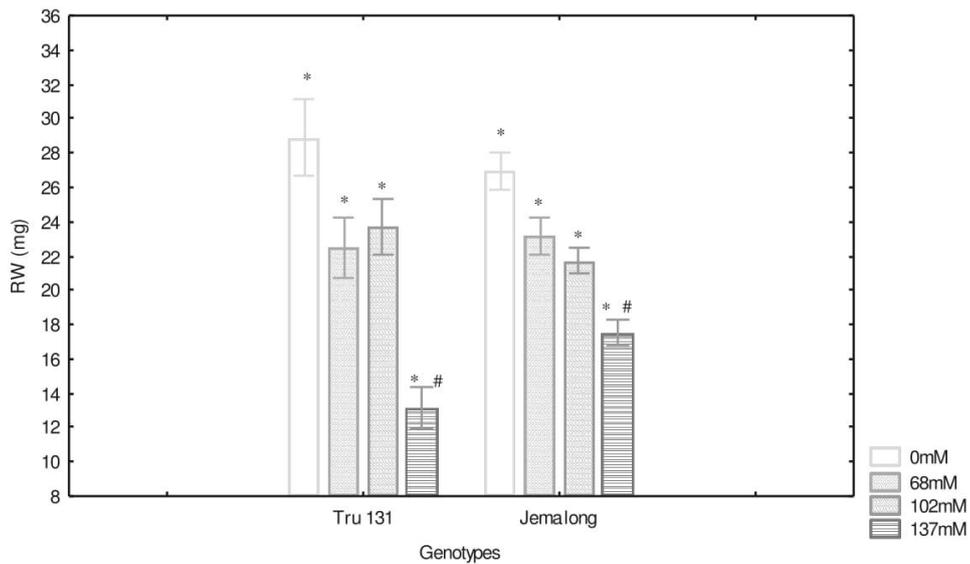


Fig 31 : Poids frais individuel racinaire (RW) chez les deux génotypes contrastés de *M. truncatula*, Tru 131 et Jemalong, exposés au stress salin.

Les Résultats des deux paramètres sont exprimés en moyenne \pm S.E (n = 3). Pour chaque paramètre, * représente des différences significatives entre les traités et les témoins pour le même génotype. # représente la différence entre génotypes pour le même traitement à P <0.05.

Tab 10 : Résultats d'analyse de variance à deux facteurs. 1. Effet traitement (stress salin). 2. Effet génotype. 3. Effet interaction sur les paramètres morphologiques, physiologiques et biochimiques au niveau racinaire.

P < 0.05, ** P < 0.001; ns, non significant; F: coefficient of Snedecor-Fisher.

Source of variation	Genotypes (G)		Salt stress treatment		Interaction (GxT)	
	F	P	F	P	F	P
Longueur racinaire (RL)(cm)	0,22	0,638	28,38	0,000**	0,19	0,900
Poid individuel des racines (RW) (mg)	0,08	0,777	25,30	0,000**	2,14	0,096
Potential hydrique (MPa)	86,66	0,000**	46,38	0,000**	5,40	0,009*
Protéines solubles (mg/g DW)	57,39	0,000**	1,68	0,212	1,58	0,234
Activité GPX (nmols/mg protein min)	15,39	0,001*	5,09	0,012*	5,47	0,009*
ASC+DHA (mg/g DW)	0,242	0,631	1,872	0,188	2,876	0,080
GSH+GSSH (mg/g DW)	26,74	0,000**	1,71	0,206	2,24	0,123

Tab 11: Résultats obtenus de l'effet du stress salin sur les paramètres biochimiques (protéines solubles, activité GPX, pools : ASC+DHA et GSH+GSSG) au niveau racinaire.

Génotypes	Nacl (mM)	mg protein/ g DW ± SE	GPX Activity (nmols / mg prot / min) ± SE	ASC+DHA mg/g DW	GSH+GSSG mg/g DW
Tru 131 (T)	0	44,66 ± 4,96	2,22 ± 0,23	5,81 ± 0,57	1,28 ± 0,49
	68	42,13 ± 2,99	3,70 ± 0,94	6,56 ± 0,65	3,03 ± 0,63
	102	34,81 ± 4,05	2,96 ± 0,19	4,98 ± 0,34	1,12 ± 0,16
	137	29,74 ± 3,24	6,28 ± 1,09	7,96 ± 2,02	2,99 ± 1,20
Jemalong (S)	0	57,67 ± 1,94	2,15 ± 0,08	4,76 ± 0,43	0,00 ± 0,00
	68	61,75 ± 5,74	2,80 ± 0,29	6,63 ± 0,61	0,30 ± 0,30
	102	63,57 ± 2,43	2,41 ± 0,24	7,10 ± 0,08	0,20 ± 0,20
	137	57,30 ± 5,90	2,05 ± 0,34	5,78 ± 0,65	0,16 ± 0,16

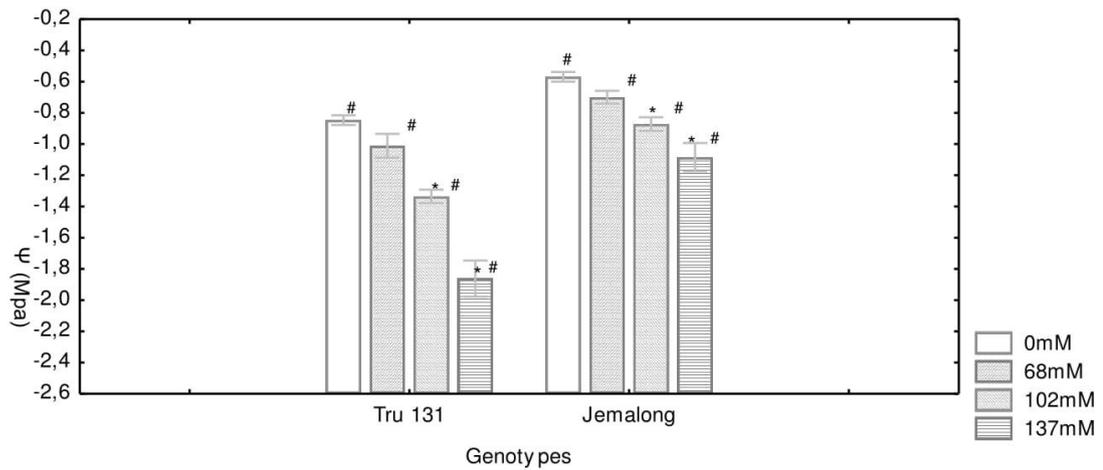


Fig 32 : Potentiel hydrique des racines des deux génotypes contrastés de *M. truncatula*, T 131 et Jemalong, exposés au stress salin. Résultats exprimés en moyenne \pm S.E (n = 3)

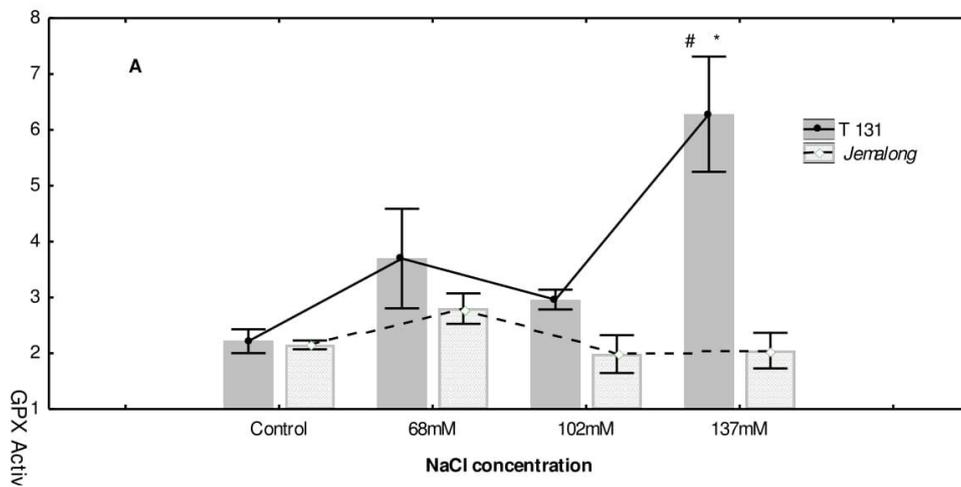


Fig 33 : Activité de l'enzyme Guaiacol peroxydase exprimée en (nmols/mg prot/min) dans les racines des deux génotypes contrastés de *M. truncatula* T131 et Jemalong exposés aux différents traitements par NaCl. Résultats exprimés en moyenne \pm S.E (n = 3)

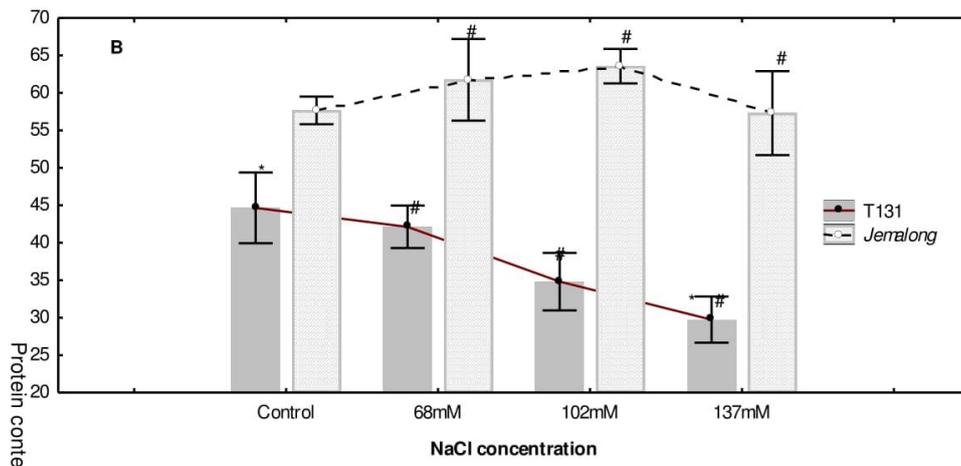


Fig 34 : Contenu en protéines solubles exprimés en mg /g poids sec racinaire des deux génotypes de *M. truncatula* exposés au stress salin. Résultats exprimés en moyenne \pm S.E (n = 3)

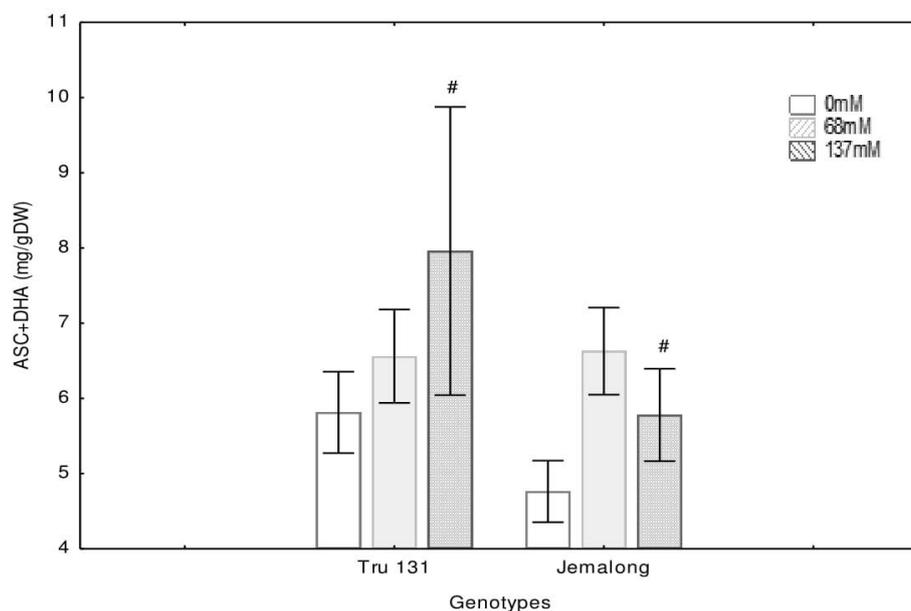


Fig 35 : Contenu racinaire en pools d'Ascorbate ASC+DHA chez les deux géotypes contrastés de *M. truncatula* T131(T) et *Jemalong* (S) exposés aux différents traitements par NaCl. Résultats exprimés en moyenne \pm S.E (n = 3)

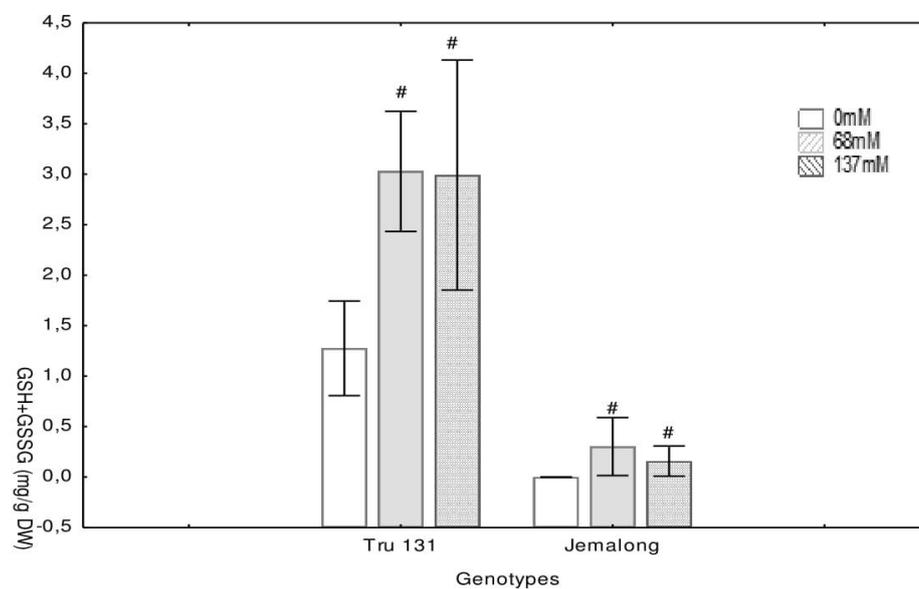


Fig 36 : Contenu racinaire en pool de Glutathione GSH+GSSG chez les deux géotypes contrastés de *M. truncatula* T131(T) et *Jemalong* (S) exposés aux différents traitements par NaCl. Résultats exprimés en moyenne \pm S.E (n = 3)

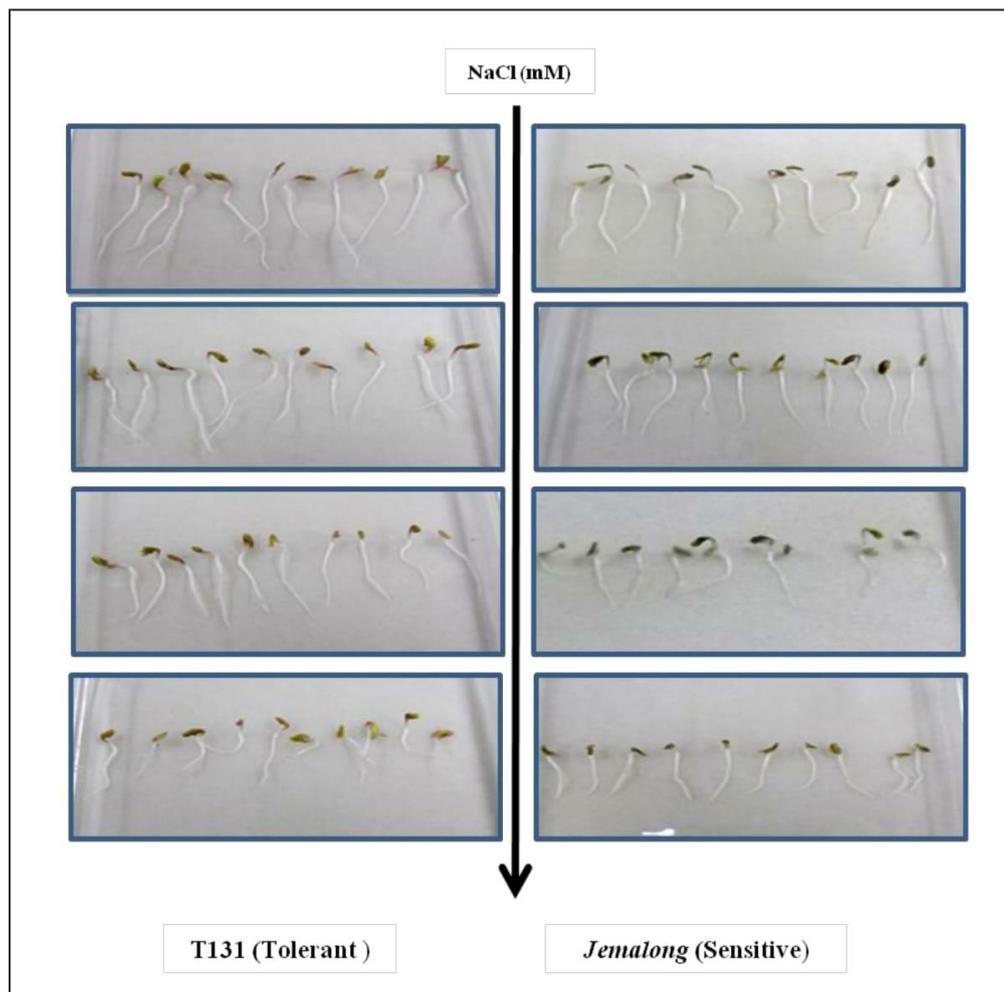


Fig 37 : Développement des plantules des deux géotypes contrastés de *M. truncatula* T131(T) et Jemalong (S) traités aux différentes concentrations de NaCl.

Discussion

Les résultats ont montré une que la salinité induit une diminution de la longueur et le poids de la racine chez les deux génotypes. La salinité élevée peut inhiber l'élongation racinaire par la diminution du contenu en eau par la plante (Werner et Finkelstein, 1995).

Zahaf *et al.* (2012) analysent le transcriptome des racines chez deux génotypes de *M. truncatula* ayant une réponse contrastée vis-à-vis du stress salin ; TN1.11 (Tolérant), échantillonné dans un sol salin tunisien, et le génotype de référence Jemalong A17 qui est sensible et trouvent que les longueurs racinaires chez ces deux génotypes contrastés sont significativement réduit après 90 - 150 mM NaCl de traitement en comparaison avec les racines non traitées.

Dans notre étude, nous avons observés une réduction significative de la longueur de la racine à partir de 102 mM de NaCl de traitement comparativement aux racines de plantules témoins. D'autres part, nous avons observé que le stress salin a diminué le potentiel hydrique des racines, beaucoup plus chez le génotype jugé tolérant Tru 131 comparé au génotype sensible Jemalong. On sait qu'une plante peut absorber l'eau du sol si le potentiel hydrique de la racine est inférieur à celui du sol (Ψ_w racine < Ψ_w sol). Le potentiel hydrique et le potentiel osmotique des plantes deviennent de plus en plus négatifs avec l'augmentation de la salinité ainsi que la pression de la turgescence (Romero-Aranda *et al.* 2001 ; Parida et Das, 2005). Depuis que le stress salin implique aussi bien le stress osmotique qu'ionique (Hayashi et Murata, 1998), l'arrêt de la croissance est directement relié à la concentration des sels solubles ou au potentiel osmotique de l'eau du sol (Greenway et Munns, 1980). Il est bien établi qu'une forte concentration de soluté dissout dans la zone racinaire abaisse le potentiel hydrique du sol (Amane *et al.* 1999).

Concernant l'analyse biochimique, on remarque qu'il y a augmentation dans le contenu en protéines solubles et l'activité GPX qui est impliqué dans la tolérance au stress salin chez le génotype jugé tolérant Tru 131 à une concentration élevée de NaCl (> 68mM) par rapport au génotype sensible *Jemalong*.

Il a été noté que la concentration en protéines solubles chez *Medicago sativa* est diminuée sous stress salin et cette réduction est reliée à l'inhibition de leurs synthèse ou la stimulation de leurs hydrolyse (Irigoyen *et al.* 1992). Gandonou *et al.* (2011) montrent que la concentration en protéines solubles diminue dans les racines de la variété sensible au stress salin CP65-357 chez le cultivar (*Saccharum* sp.) de la canne à sucre. Mittova *et al.* (2002) ont trouvé que chez la tomate cultivée (*Lycopersicon esculentum*), la meilleure protection des racines de la variété cultivée tolérante (*L. pennellii*) par l'induction du stress oxydatif du à la salinité, est corrélé avec l'augmentation de l'activité GPX.

Zahaf *et al.* (2012), révèlent que l'activité GPX chez *M. truncatula* augmente significativement dans les nodules des racines en réponse à la salinité du génotype tolérant TN.11 en comparaison avec Jemalong A17 (sensible). Cette enzyme peut être très importante pour la défense oxydative dans les nodules racinaires de *M. truncatula* sous stress salin. Elle est suggérée comme un marqueur biochimique potentiel pour la tolérance au stress salin et hydrique (sécheresse). Elle est essentiellement impliquée dans la lignification et le renforcement de la paroi cellulaire et confère une meilleure protection de l'intégrité tissulaire (Mhadhbi *et al.* 2004, 2008, 2009).

D'après les résultats obtenus sur le contenu protéique racinaire, on note que *Jemalong* qui est sensible au stress à une teneur élevée en protéines de racines par rapport au génotype tolérant (Tru 131). Il a été noté que le contenu en protéines solubles des racines de deux cultivars de blé (Sensible et tolérant) au stress salin, est élevé chez Gemmeza1, sensible comparé à Sakha 93, tolérant (Radi *et al.* 2013). Ainsi, une teneur élevée en protéines solubles a été observée chez des cultivars d'orge, tournesol, millet et de riz sous l'effet du stress salin (Ashraf et Harris 2004).

Cependant, Agastian *et al.* (2000) ont rapporté que les protéines solubles sont élevées à faible dose de salinité mais diminuent significativement à forte concentration chez des cultivars de mûriers, ce qui semble concorder avec nos résultats. L'augmentation dans la carbonylation des protéines a été utilisée comme un indicateur de dommages oxydatifs chez les plantes exposées à de sévères stress abiotiques (Ferreira-Silva *et al.* 2012 ; Moran *et al.* 1994 ; Miller *et al.* 2007), ceci explique l'augmentation des protéines des racines chez le génotype sensible *Jemalong* avec probablement l'accumulation des composés ROS due aux dommages causés par le stress oxydatif lors d'un stress salin.

Les résultats obtenus sur l'analyse des antioxydants, montrent qu'au niveau racinaire, les deux pools ASC+DHA et GSH+GSSH augmentent à la concentration maximale qui est de 137 mM de NaCl chez le génotype tolérant Tru 131 beaucoup plus par rapport au génotype sensible *Jemalong*. Khan et Panda (2008) ont affirmé que deux variétés de riz (Lunishree et Begunbitchi), ont montré une augmentation du contenu en ascorbate (ASC) sous stress salin à des concentrations faibles chez la variété Lunishree, permettant une meilleure protection antioxydative. Concernant le pool GSH+GSSH, on remarque une augmentation élevée à la concentration de 137 mM de NaCl chez le génotype tolérant Tru131 par rapport au génotype *Jemalong* sensible. Gietler *et al.* (2015) ont montré que le pool total du Glutathione (GSH+GSSH) augmente chez les jeunes plants du Blé (*Triticum aestivum* L), tolérants au déficit hydrique par rapport aux plantules sensibles, après 06 jours de germination.

En conclusion, dans cette étude il apparaît que le génotype tolérant Tru 131 exprime une meilleure croissance racinaire sous l'effet du stress salin par rapport à Jemalong qui est sensible au stress. Concernant le contenu protéique des racines des jeunes plants, Jemalong (sensible) semble exprimer plus de protéines par rapport à Tru131 (tolérant) avec toutefois une augmentation de l'activité gyalcol peroxydase (GPX) chez le tolérant comparée à Jemalong. Cette enzyme a un rôle de protecteur des racines contre les ROS lors d'un stress oxydatif.

Enfin, l'analyse des antioxydants a montré qu'à la concentration maximale de NaCl (137 mM), les deux pools d'ascorbate (ASC+DHA) et de glutathion (GSH+GSSH) augmentent significativement chez le génotype Tru 131 jugé tolérant par rapport à Jemalong.

Chapitre 6

Analyse de la Diversité Génétique de Différents Ecotypes de *Medicago truncatula* Gaertn. par les Marqueurs Moléculaires

Analyse de la Diversité Génétique de Différents Ecotypes de *Medicago truncatula* Gaertn. par les Marqueurs Moléculaires

Récemment, les méthodes moléculaires, fondées sur l'amplification enzymatique *in vitro* de fragments d'ADN spécifiques par la technique PCR, ont été appliquées chez les « Medics ». L'analyse du polymorphisme génétique par les techniques de la biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement. En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité et le génotype d'une plante peut être déterminé à un stade très précoce, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN (Najimi *et al.* 2003). En ce qui concerne l'intérêt des microsatellites en génétique, ils sont connus, en plus de leur haut degré de polymorphisme, pour être des marqueurs neutres, co-dominants et avantageusement bien distribués sur l'ensemble du génome (Powell *et al.* 1996, Santoni *et al.* 2000). Un bon marqueur doit être à hérédité simple, multiallélique et co-dominant (Najimi *et al.* 2003). Les SSR ou « Single sequence repeat » répondent bien à ces critères et présentent, en plus de leur reproductibilité, une méthode d'étude facile et une définition bien supérieure à d'autres marqueurs (Manifesto *et al.* 1999). Ces marqueurs sont très polymorphes et hypervariables et constituent donc des outils intéressants pour l'étude de la diversité génétique. Dans le présent travail, nous avons utilisé les étiquettes de séquences exprimées de microsatellites appelées (EST-SSR) qui sont des ressources importantes pour l'investigation de la diversité génétique car ces marqueurs montrent une variation seulement dans la partie exprimée (gènes exprimés) dans le génome et qui offrent une opportunité d'exploiter des motifs conservés présents en simple ou peu de copies pour le développement de microsatellites (SSR).

L'objectif de notre travail est l'analyse moléculaire révélée par les marqueurs EST-SSR de la diversité génétique chez les différentes accessions de l'espèce *Medicago truncatula* Gaertn., afin de déterminer les différences et les similitudes qui existent entre elles et, également de faire le choix le plus adéquat des accessions génétiquement éloignées et complémentaires pour la réalisation des croisements de départ, dans les programmes d'amélioration variétale sous stress salin. Dans cette étude, nous avons essayé de caractériser les marqueurs « EST-SSR », sur de nouvelles accessions de *M. truncatula*, en provenance du pourtour méditerranéen et du proche orient dans le but d'obtenir des informations sur leur diversité génétique en les comparant aux deux génotypes contrastés au stress salin afin de déterminer celles qui sont associées au génotype jugé tolérant. Ceci nécessite une analyse phénotypique sur le comportement de l'ensemble de ces écotypes sous l'effet du stress salin afin d'affiner les associations marqueurs EST-SSR phénotype pour la tolérance au stress salin.

Matériel et méthodes

1. Matériel végétal

Les graines des différentes accessions (ICARDA) provenant du pourtour méditerranéen et du proche orient (Tableau 12) ainsi celles des deux génotypes contrastés au stress salin, Tru 131, Tolérant et Jemalong, sensible, ont été utilisés dans cette étude pour la caractérisation moléculaire en utilisant quatre marqueurs EST SSR (MTIC 044, MTIC 124, MTIC 077 et MTIC 335) (Tableau 13).

2. Méthodes

2.1. Caractérisation moléculaire

2.1.1. Extraction d'ADN et amplification par PCR

L'ADN génomique est extrait pour chaque génotype, à partir de jeunes plants (plantules) obtenus après 7 jours de germination (10 graines par génotype). L'ADN est isolé en utilisant la méthode (CTAB) adapté par Udupa *et al.* (1999). Les trois loci EST-SSR (MTIC 044, MTIC 077 et MTIC 124) sont localisés sur le chromosome 3 (LG 3) et MTIC 335 sur le chromosome 7 (LG7) (Tab13). Ils ont été choisis, à partir d'une série de microsatellites, développée par Journet *et al.* (2001), chez *Medicago truncatula* (2n=16) via la base de donnée « GenBankEST » disponible sur le web: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/>.

L'amplification de l'ADN génomique a été faite, selon la technique adoptée par Udupa *et al.* (1999) dans une réaction PCR (miniprep) de 10 ul contenant 50 ng d'échantillon d'ADN, tampon PCR 1x, 0.2 mM dNTPs, 10 pmole pour chaque amorce et 1 unité de la Taq polymérase. Le programme d'amplification comprend une période initiale de la dénaturation de l'ADN et l'activation de la Taq polymérase à 94°C pendant 2mn, suivie de 35 cycles avec 3 phases : 94 °C durant 30 s, 55°C durant 30 s, et 72°C durant 45 s. L'extension finale est faite à 72°C durant 7 mn. Les produits PCR sont analysés en gel continu de polyacrylamide 6 % dénaturant. Après électrophorèse, les bandes d'ADN sont colorées avec le bromure d'éthidium (BET) et visualisées sous UV.

Pour chaque locus, la composition des allèles SSR est déterminé pour chaque génotype. Les valeurs du contenu d'information sur le polymorphisme (PIC) ou « polymorphism Information Content » est calculé selon la formule suivante (Anderson *et al.* 1993): $PIC = 1 - \sum P_{ij}^2$: [P_{ij} est la fréquence de l'allèle i révélée utilisant l'amorce j]. La diversité génétique pour chaque locus est calculé comme suit : $H_i = 1 - \sum P_i^2$, avec H_i (l'index de la variation génétique) et P_i (la fréquence d'allèle à chaque locus) (Nei, 1973).

2.1.2. Analyse de données

L'analyse des profils électrophorétiques des différents produits de la PCR a été effectuée par un simple examen visuel des pistes d'électrophorèse. La présence des fragments a été déterminée visuellement et introduite dans une matrice de données binaires (0/1) présence (1) ou absence de la bande (0). A partir de ces données nous avons calculé la matrice de similarité en utilisant le coefficient de Jaccard par «Simple Matching». ensuite le dendrogramme de similarité a été établi en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair group Method using arithmetic Averages).

Ces analyses ont été effectuées par l'intermédiaire du programme d'analyses en utilisant le logiciel Statistica version 6.1.

La matrice de données a été aussi employée pour calculer comme précédemment, le (PIC) ainsi que la diversité génétique (H_i) révélé par chaque marqueur EST-SSR. En complément, d'autres paramètres ont été analysés et ou calculés (nombre de répétitions de motif EST-SSR, nombre d'allèles, nombre total de bandes et le taux de bandes polymorphes) afin de trouver des corrélations et d'en déduire des conclusions sur une éventuelle association entre ces paramètres en relation avec le polymorphisme génétique.

Cette partie expérimentale a été effectuée au sein du Laboratoire de Biologie Moléculaire à l'INRA de Rabat.

Tab 12 : Informations sur les 11écotypes de *Medicago truncatula* étudiées.

Numéro d'accession	Code	N	Origine	Longitude	Latitude	Altitude	Tolérance stress salin
IG 53097	Tru 1	7	Algérie Blida	E02 41	N36 24	200	-
IG 53105	Tru 2	8	Algérie Batna	E06 28	N35 19	1,050	-
IG 53115	Tru 3	8	Algérie Annaba	E07 43	N36 55	730	-
IG 53945	Tru 4	8	Algérie Bordj bou arreridj	E04 58	N36 07	1,260	-
IG55917	Tru 5	6	Syrie Hama	E37 0200	N350100	500	-
IG 53965	Tru 6	6	Liban Zahe	E3601	N3352	1,000	-
IG 53175	Tru 7	3	Maroc Centre	W07 28	N33 40	5	-
IG 53939	Tru 8	7	Tunisie Bajah	E09 23	N36 30	400	-
IG 53326	Tru 9	7	Jordanie Al balqa	E3546	N3159	550	-
<i>M. Truncatula</i> <i>Jemalong</i>	<i>Jemalong</i>	10	France Montpellier	-	-	-	S
<i>M. Truncatula</i> 131	T 131	10	Algérie IDG Sidi Bel Abbès	-	-	-	T

N : Nombre d'individu, **S** : sensible (stress salin), **T** : tolérant (stress salin), - : pas d'information (stress salin)

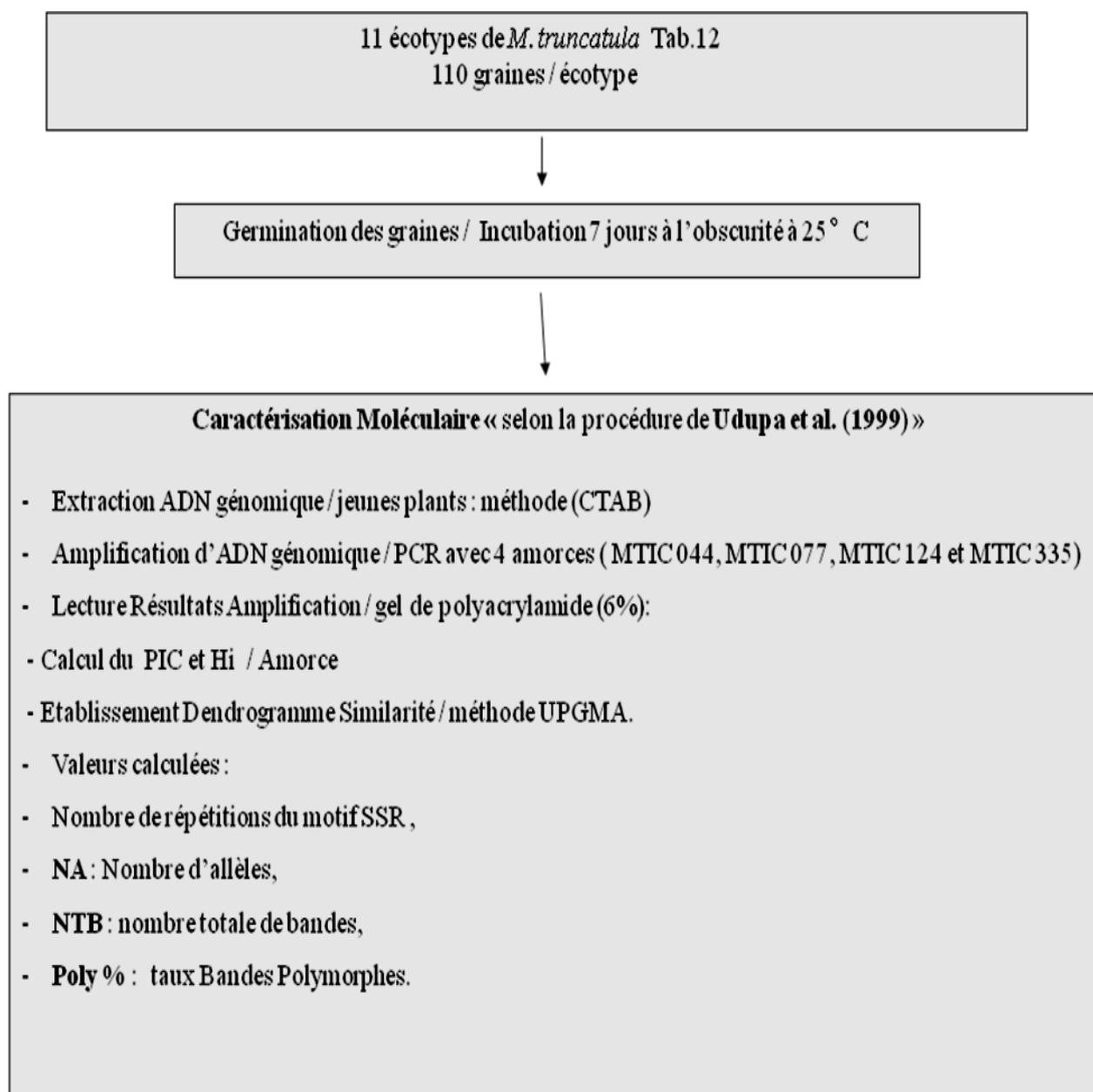


Schéma 10 : Protocole expérimentale pour l'analyse moléculaire de la diversité génétique de 11 écotypes de *M. truncatula* utilisant les marqueurs EST-SSR

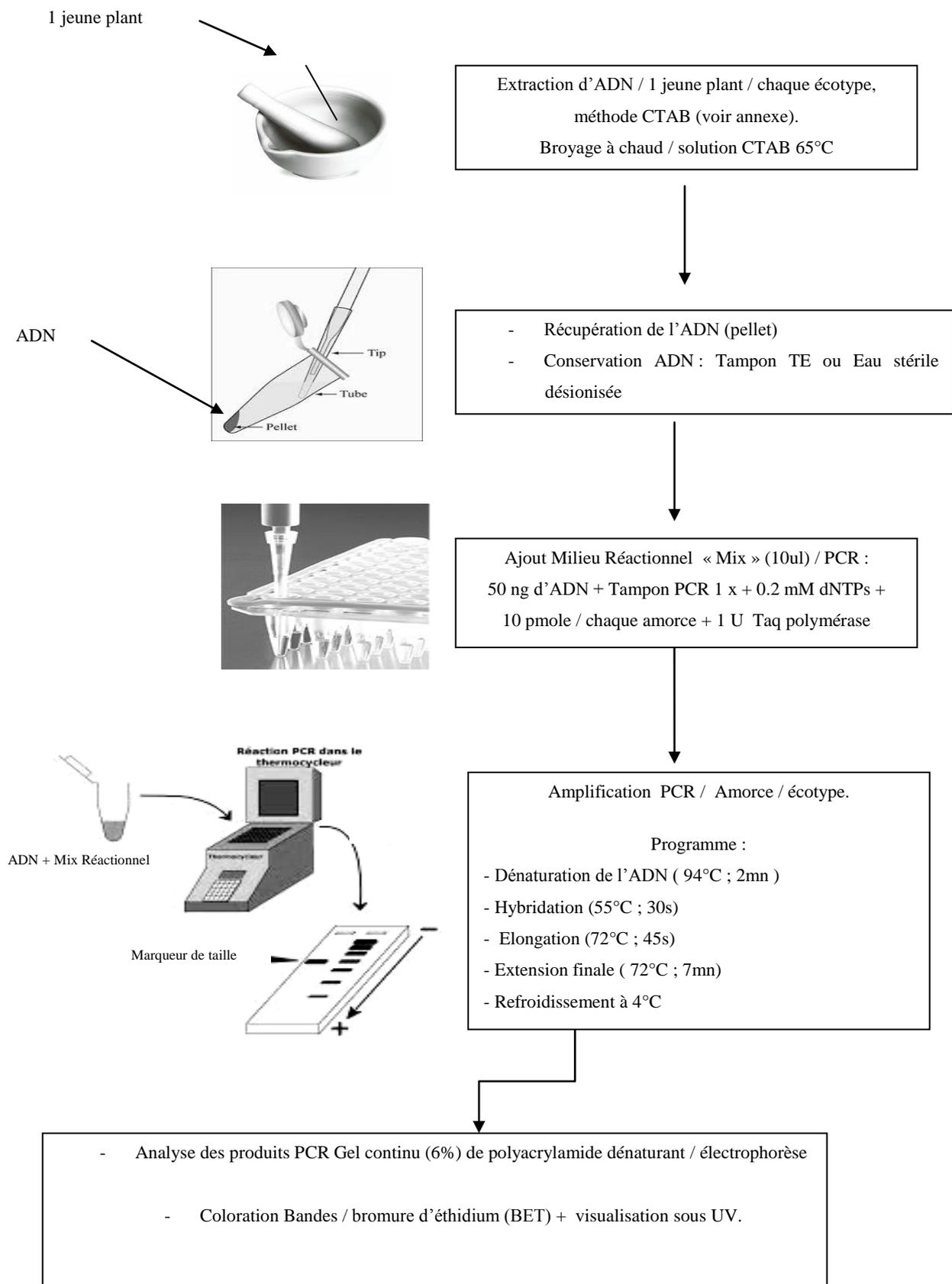


Schéma 11 : Extraction et Amplification d'ADN par à partir de jeunes plants des différentes accessions de *M. truncatula*

Résultats et interprétation

1. Analyse de la diversité moléculaire révélée par les marqueurs EST-SSR

Pour la collection analysée, les marqueurs EST-SSR utilisés, se sont révélés polymorphes à l'exception du marqueur MTIC 044 qui a montré un très faible polymorphisme ($PIC = 0,12$ et $H_i = 0,13$), alors que par exemple le marqueur MTIC 124 a montré un polymorphisme modéré ($PIC = 0,36$ et $H_i = 0,47$) (Tab 13). Le PIC donne une estimation sur le polymorphisme au sein d'un locus en tenant compte du nombre d'allèles, des fréquences de ces allèles (Smith *et al.* 1997). Le nombre total d'allèles enregistrés pour les quatre marqueurs est de 24, donnant une moyenne de 6 allèles par locus et un taux de polymorphisme de 32,58 %. Senior *et al.* (1998) ont reporté que le PIC est synonyme du terme « diversité génétique : H_i » comme décrit par Weir (1996). La valeur du PIC, calculée pour chaque paire d'amorces (locus) varie de 0,12 à 0,49 avec une moyenne de 0,33 et la valeur de H_i varie de 0,13 à 0,37, avec une moyenne de 0,36. Parmi ces marqueurs, les MTIC 124, MTIC 077 et MTIC 335 sont les plus informatifs alors que le MTIC 044 a une faible informativité. Pour les quatre amorces, une moyenne de 65,5 bandes reproductibles ont été obtenues avec un nombre moyen de 20,5 bandes polymorphes (Tab 14).

En effet, plusieurs facteurs peuvent affecter le nombre de bandes par paire d'amorces à savoir le génotype, les séquences des amorces ainsi que les variations mineures dans les protocoles d'amplification. La majorité des bandes se situent entre 100 et 300 pb, comme l'indique la Figure 41 par exemple.

2. Corrélation entre les différents données moléculaires étudiés et les marqueurs (EST-SSR) :

La figure (38), montre les différents paramètres étudiés en relation avec le polymorphisme par rapport à l'ensemble des amorces analysées : (NR : Nombre de répétitions du motif SSR, NA : Nombre d'allèles, H_i : diversité génétique, PIC : potentiel en information du polymorphisme, NTB : nombre totale de bandes, Poly % : taux de bandes polymorphes comme le montre le tableau (14), ceci afin de trouver une éventuelle corrélation entre les différents données moléculaires. Les résultats montrent des corrélations positives entre les valeurs PIC, H_i , le % de bandes polymorphes (Poly %) et le nombre d'allèles (NA) (les coefficients de corrélations (r) qui varient entre 0,75 et 0,99) (Tab 15).

3. Relations génétiques (Similarités / Dissimilarités) et classification des accessions par rapport au deux génotypes contrastés au stress salin :

3.1 Analyse basée sur chaque marqueur EST SSR :

- MTIC 044 :

L'analyse du dendrogramme (Figure 40) montre que les accessions étudiées se répartissent en deux groupes distincts G1 et G2. Le groupe G1 se divise en 2 sous groupes (SG 1.1 et SG 1.2), le premier sous groupe contient les deux génotypes T131 et *Jemalong* qui semblent similaires pour ce locus (expliqué par un PIC=0,12 très faible) proches aux accessions Tru 1(DZA), Tru 3.1 (DZA), Tru 8 (TUN) et Tru 9 (JOR), alors que le deuxième sous groupe contient les deux accessions Tru 2.1 et Tru 3.3 avec un coefficient de similarité de (0,667) d'après la matrice de similarité représenté par le tableau 16 dont les coefficients de similarités varient entre (0,33 et 1,00). Les coefficients les plus faibles (0,33) sont obtenus par exemple avec la combinaison de Tru 2.1 avec toutes les accessions représenté sur le tableau 16 et la figure 40 sauf avec Tru 3.2 (pourcentage de similarité = 66,7%). Le deuxième groupe G2 homogène comporte les accessions (Tru 2.2 (DZA), Tru 3.2 (DZA), Tru 4 (DZA), Tru 5 (SYR), Tru 6 (LBN) et Tru 7 (MAR) qui sont similaires entre eux.

- MTIC 124 :

Le dendrogramme (Fig 42) montre que les accessions étudiées se répartissent en deux groupes distincts G1 et G2. La matrice de similarité représenté par le tableau 17, montre que les coefficients de similarités varient entre (0,33 et 1,00). Les coefficients les plus faibles sont obtenus par exemple avec la combinaison de T131.2 avec Tru 2.1 (coefficient de 0,33) et avec Tru 2.3 (coefficient nul). Concernant les deux écotypes contrastés au stress salin, on remarque que le génotype tolérant T131 est polymorphe et situé dans G1 et G2, tandis que *Jemalong* sensible se situe seulement dans le groupe G1 et qui est à son tour proche surtout aux accessions à majorité d'origine algérienne (DZA) : Tru 1, Tru 2, Tru 3, Tru 4, Tru 5 (SYR), Tru 6 (LBN) et Tru 9 (JOR). Le groupe G1 est plus homogène, alors que le deuxième groupe G2 est très diversifié, se divise en deux sous groupes SG2.1(diversifié) et SG2.2 (homogène), le premier sous groupe se divise en deux autres sous groupes SG 2.1.1 et SG 2.2.2. On remarque que l'écotype T131 se présente en deux génotypes, l'un se trouve dans le groupe G1 avec *Jemalong* et sont donc similaires pour ce locus (même génotype), alors que le deuxième génotype (T131.1) se trouve dans le sous groupe : SG 1.12 avec quatre écotypes (DZA): Tru 2.3, Tru 3.4, Tru 4.2, et Tru 5.1 (SYR), Tru 8.2 (TUN) et Tru 9.3 (JOR).

- MTIC 077 :

Le dendrogramme (Figure 44) montre aussi que les accessions étudiées se répartissent en deux groupes distincts G1 et G2. La matrice de similarité représentée par le Tableau 18, montre que les coefficients de similarités varient entre (0,33 et 1,00). Les coefficients les plus faibles sont obtenus par exemple avec la combinaison de T 131 et *Jemalong* avec les écotypes Tru 3.3 et Tru 4.3 pour une similarité de 33% et avec Tru 7.2 pour une similarité nulle (0%). Le groupe G2 homogène avec la présence de T131 et *Jemalong* qui représentent un même génotype pour le locus (MTIC077), ils sont proches aux accessions algériennes Tru 2.2, Tru 3.2, Tru 4.2, Tru 5 (SYR), Tru 6 (LBN), Tru 7.1(MAR) et Tru 8.2 (TUN). Le premier groupe G1, semble très diversifié avec deux sous groupes SG 1.1 et SG 1.2, ce dernier est homogène et présente les 4 écotypes (Tru 2.3 (DZA), Tru 3.1 (DZA), Tru 8.1(TUN) et Tru 9 (JOR)).

- MTIC 335 :

Le dendrogramme (Figure 46) montre que les accessions analysées se répartissent en deux groupes variés distincts G1 et G2. La matrice de similarité représentée par le Tableau 19, montre que les coefficients de similarités varient entre (0,25 et 1,00). Les coefficients les plus faibles sont obtenus par exemple avec la combinaison de T131 avec Tru 1.1 (coef = 0) et avec Tru 3.4 (0,25)

Le G2 présente plus de diversification que le groupe G1. On remarque que l'écotype jugé tolérant T131, présente un seul génotype pour ce locus et se trouve dans le sous groupe SG 2.2 proche aux écotypes (Tru 4.2 (DZA), Tru 5.2 (SYR) et Tru 6.2 (LBN). Cependant, l'écotype *Jemalong* jugé sensible au stress salin par rapport au T 131, présente deux génotypes, l'un situé dans le SG 1.1 (*Jemalong*.1) proche aux écotypes (Tru 1.1 DZA, Tru 2.2 DZA, Tru 4.3 DZA, Tru 7 MAR, Tru 8 TUN et Tru 9 JOR), alors que le deuxième génotype (*Jemalong*.2) se trouve dans sous groupe (SG 2.1.1.1) étroitement proche et similaire à Tru 2.1 DZA.

3.2. Analyse globale de classification basée sur les quatre marqueurs EST SSR étudiés

La matrice de similarité représentée par le Tableau 20, montre que les coefficients de similarités varient entre (0,33 et 1,00). Les coefficients les plus faibles sont obtenus avec la combinaison du génotype Tru 2.6 avec les génotypes (Tru 1.1, Tru 1.2, Tru 1.4, Tru 2.2 et Tru 2.3), qui sont tous des accessions algériennes (DZA), avec un coefficient de similarité de (0,25). A titre d'exemple, les génotypes T131.2 et Tru 1.1 ont un coefficient de similarité, qui est nul. Le dendrogramme représenté par la (Figure 47), basé sur l'analyse globale des 4 loci EST-SSR étudiées, montre que les écotypes étudiés se répartissent en deux groupes : G1 (avec seulement deux sous groupes), moins diversifié et le groupe G2, très diversifié (avec plusieurs sous groupes). On remarque que l'écotype T 131 se présente en trois génotypes différents et Jemalong en quatre génotypes distincts. Les deux génotypes Jemalong.1 et T131.1 sont similaires et se trouvent dans le sous groupe (SG1.1), même résultats obtenus pour Jemalong.2 et T131.3, situés dans le sous groupe (SG 1.2). L'individu T131.2 se trouvant dans le sous groupe (SG 2.2.2) se présente comme un génotype différent par rapport à Jemalong.3 (SG 2.1.2) et Jemalong.4 (SG 2.2.1.1.4), ces derniers distincts par rapport au génotype T131.2 qui est jugé comme un génotype tolérant au stress salin, ce dernier est proche et similaire aux écotypes (Tru 2.4 DZA, Tru 3.5 DZA, Tru 5.2 SYR, Tru 8.3 TUN, Tru 9.3 JOR).

Discussion

D'après les résultats obtenus sur le polymorphisme de chaque marqueur EST-SSR utilisé sur les différents écotypes étudiés de *M. truncatula* et à la lecture du Tableau 14, on remarque que quel que soit le marqueur utilisé, les accessions Tru 2 (DZA) et Tru 3 (DZA) présentent toujours le plus de polymorphisme (bandes polymorphes).

D'après l'analyse globale de classification basée sur l'ensemble des EST-SSR, on trouve toujours que les accessions Tru 2 (DZA) , Tru 3 (DZA) et Tru 4 (DZA) expriment plus d'allèles: 8, 10 et 7 respectivement (Tableau 14). Ces écotypes qui présentent plus de polymorphisme allélique et qui ont une même origine géographique (DZA), peuvent être exploités pour l'étude de la variabilité génétique. Ils sont proches et similaires à d'autres accessions d'origine différente comme ceux du Liban (LBN) et de la Syrie (SYR). Notant que le marqueur EST-SSR (MTIC124) est polymorphe. Les résultats obtenus sur la recherche de similitudes de séquences protéiques et nucléiques via les bases de données « Unigene et Uniprot » a montré que ce locus code pour l'inhibiteur de la cystéine protéinase exprimée principalement dans les racines et impliquée dans la tolérance au stress salin (Amouri et Hadjadj, 2016). Ceci ouvre un autre volet d'étude sur l'analyse du transcriptome au niveau racinaire.

En général, les résultats ont montré un taux moyen de polymorphisme modéré (32,58 % avec un PIC = 0,33). Le dendrogramme global, établi à partir de la matrice de similarité des marqueurs EST - SSR, a montré une phylogénie qui correspond à une différenciation des écotypes selon la distribution géographique. Ces résultats indiquent que la distribution géographique joue un rôle majeur dans le regroupement (clustering) des écotypes avec des similarités et des différences qui dépendent de l'adaptation, la pression sélective et les conditions environnementales. Une étude phénotypique préliminaire sur la croissance racinaire de l'ensemble des écotypes étudiés, a montré que Tru 131, est l'écotype le plus tolérant et avec un meilleur développement racinaire (Amouri, 2015)

En conclusion, ces résultats donnent une vision générale sur la diversité génétique au niveau moléculaire chez les différentes accessions de *Medicago truncatula*. Ceci montre que les marqueurs EST-SSR utilisés dans notre travail sont appropriés pour distinguer le polymorphisme moléculaire entre les écotypes selon leur pedigree. Ainsi, l'analyse moléculaire a donné une meilleure observation des regroupements génétiques entre les onze écotypes de *Medicago truncatula* et, qu'en général les accessions d'origine algérienne sont plus proches (forte similarité) aux populations syriennes et jordaniennes (Tru 1, Tru 2, Tru 3, Tru 4) avec Tru 5 (SYR) et T131 DZA avec Tru 8 (TUN) et Tru 9 (JOR)).

Le regroupement utilisant les données EST-SSR, suggère que cette méthode d'analyse pourrait être utile pour l'évaluation génétique qui est très pratique pour l'amélioration de cette légumineuse, mais une analyse morphologique approfondie sur le comportement de ces écotypes, est nécessaire pour trouver des associations entre marqueurs EST-SSR / phénotype correspondant pour la tolérance au stress salin.

Tab 13 : Caractéristiques et résultats obtenus sur le polymorphisme des marqueurs microsatellites EST-SSR utilisés pour l'analyse génétique des 11 écotypes de *M. truncatula*.

Locus EST (SSR primer)	LG	Forward (F) and reverse (R) primers (5' → 3')	Repeat motif	Annealing temperature for PCR (°C)	Taille des allèles (Allele size) (pb)	Nombre d'allèles (Number of alleles)	H _i	PIC	GenBank EST name	Références
MTIC 044	3	F : CGCGCCTTCTAGTTCTCTC R : GGGGTCTCTCTTTCTTGGA	[ACC]7	55	100-200	4	0,13	0,12	MtBC10F10F1 MtBC Medicago truncatula cDNA clone MtBC10F10 T3, mRNA sequence	Journet <i>and al</i> ,2001.
MTIC 124	3	F : TGTCACGAGTGTGGAATTTT R : TGGGTTGTCAATAATGCTCA	[TG]7	55	100-300	4	0,47	0,36	MtBC32B02R1 MtBC <i>Medicago truncatula</i> cDNA clone MtBC32B02 T7, mRNA sequence	<i>Medicago truncatula</i> ESTs from endomycorrhizal roots
MTIC 077	3	F: TCTTCATCGCTTTCTTCTATTTT A R : GCCGTATGGTGTGTTGATG	[TC]10	55	100-300	6	0,48	0,36	MtBA36F01F1 MtBA Medicago truncatula cDNA clone MtBA36F01 T3, mRNA sequence	Journet et al. 2000 <i>Medicago truncatula</i> ESTs from nitrogen- starved roots (Unpublished)
MTIC 335	7	F: CCACACAAAACACGCACTCT R : GGTAGGATTGCCACGACTGT	[CTT]5	55	100-200	10	0,37	0,49	MtBA51C05F1 MtBA Medicago truncatula cDNA clone MtBA51C05 T3, mRNA sequence	
Moyenne (Mean)						6	0,36	0,33		

LG: groupe de liaison (chromosome). PIC: polymorphic information content. H_i : Indice de diversité génétique (Genetic diversity index). Hutelement informatif (highly informative) : (PIC > 0.50), modérément (moderately informative) : (0.25 < PIC < 0.50) and peu informative (slightly informative) : (PIC < 0.25), non informative : (PIC = 0).

Tab 14 : Résultats obtenus sur le polymorphisme des bandes amplifiées pour chaque marqueur EST-SSR utilisés chez les différentes accessions de *M. truncatula*.

Locus (EST SSR primers)	Accessions	Nombre d'individus ayant donner une amplification	Nombre de bandes polymorphe / accession	Polymorphisme / accession	Nombre total de bandes / locus	Nombre de bandes polymorphes / locus	Polymorphisme
MTIC 044	Tru1	6	1	16,66 %	78	14	18 %
	Tru 2	8	2	25 %			
	Tru 3	8	3	37,5%			
	Tru 4	8	1	12,5 %			
	Tru 5	5	1	20 %			
	Tru 6	6	1	16,66 %			
	Tru 7	3	1	33,33 %			
	Tru 8	7	1	14,28 %			
	Tru 9	7	1	14,28 %			
	<i>Jemalong</i> (S)	10	1	10 %			
	T.131 (T)	10	1	10 %			
MTIC 124	Tru1	7	1	14,28 %	72	23	32 %
	Tru 2	8	4	50 %			
	Tru 3	7	4	57,14 %			
	Tru 4	7	2	28,57 %			
	Tru 5	4	2	50 %			
	Tru 6	6	1	16,66 %			
	Tru 7	1	0	0 %			
	Tru 8	7	2	28,57 %			
	Tru 9	5	3	60 %			
	<i>Jemalong</i> (S)	10	1	10 %			
	T.131 (T)	10	2	20 %			
MTIC 077	Tru1	5	1	20 %	56	20	35,71 %
	Tru 2	7	3	42,85%			
	Tru 3	7	4	57,14%			
	Tru 4	6	3	50 %			
	Tru 5	3	1	33,33 %			
	Tru 6	4	1	25 %			
	Tru 7	3	2	66,66 %			

	Tru 8	5	2	40 %			
	Tru 9	6	1	16,66 %			
	<i>Jemalong (S)</i>	6	1	16,66 %			
	T.131 (T)	4	1	25 %			
MTIC 335	Tru1	3	2	66,66 %	56	25	44,64 %
	Tru 2	5	3	60 %			
	Tru 3	6	5	83,33			
	Tru 4	6	3	50 %			
	Tru 5	6	2	33,33 %			
	Tru 6	5	2	40 %			
	Tru 7	1	0	0 %			
	Tru 8	5	1	20 %			
	Tru 9	6	1	16,66 %			
	<i>Jemalong (S)</i>	8	4	50 %			
	T.131 (T)	5	1	20 %			
Moyenne (Mean)					65,5	20,5	32,58 %

L'ensemble des EST-SSR (MTIC 044, MTIC 124, MTIC 077 et MTIC 335)	Accessions	Nombre de d'allèles différents obtenus
	Tru1	4
Tru 2	8	
Tru 3	10	
Tru 4	7	
Tru 5	5	
Tru 6	3	
Tru 7	3	
Tru 8	5	
Tru 9	4	
<i>Jemalong (S)</i>	4	
T.131 (T)	3	

Tab 15 : Corrélation entre les différents paramètres étudiés sur l'ensemble des amorces (loci EST-SSR)

	NR	NA	Hi	PIC	NTB	Poly %
NR	1	-0,46	0,34	-0,24	- 0 ,14	-0,22
NA		1	0,20	0,76	-0,80	0,84
Hi			1	0,75	-0,62	0,70
PIC				1	-0 ,81	0,99 *
NTB					1	-0,88
Poly %						1

NR : Nombre de répétitions du motif SSR , **NA** : Nombre d'allèles, **Hi** : diversité génétique, **PIC** : potentiel en information du polymorphisme, **NTB** : nombre totale de bandes, **Poly %** : taux de bandes polymorphes. Corrélation significatives marquées à *: p< 0,005.

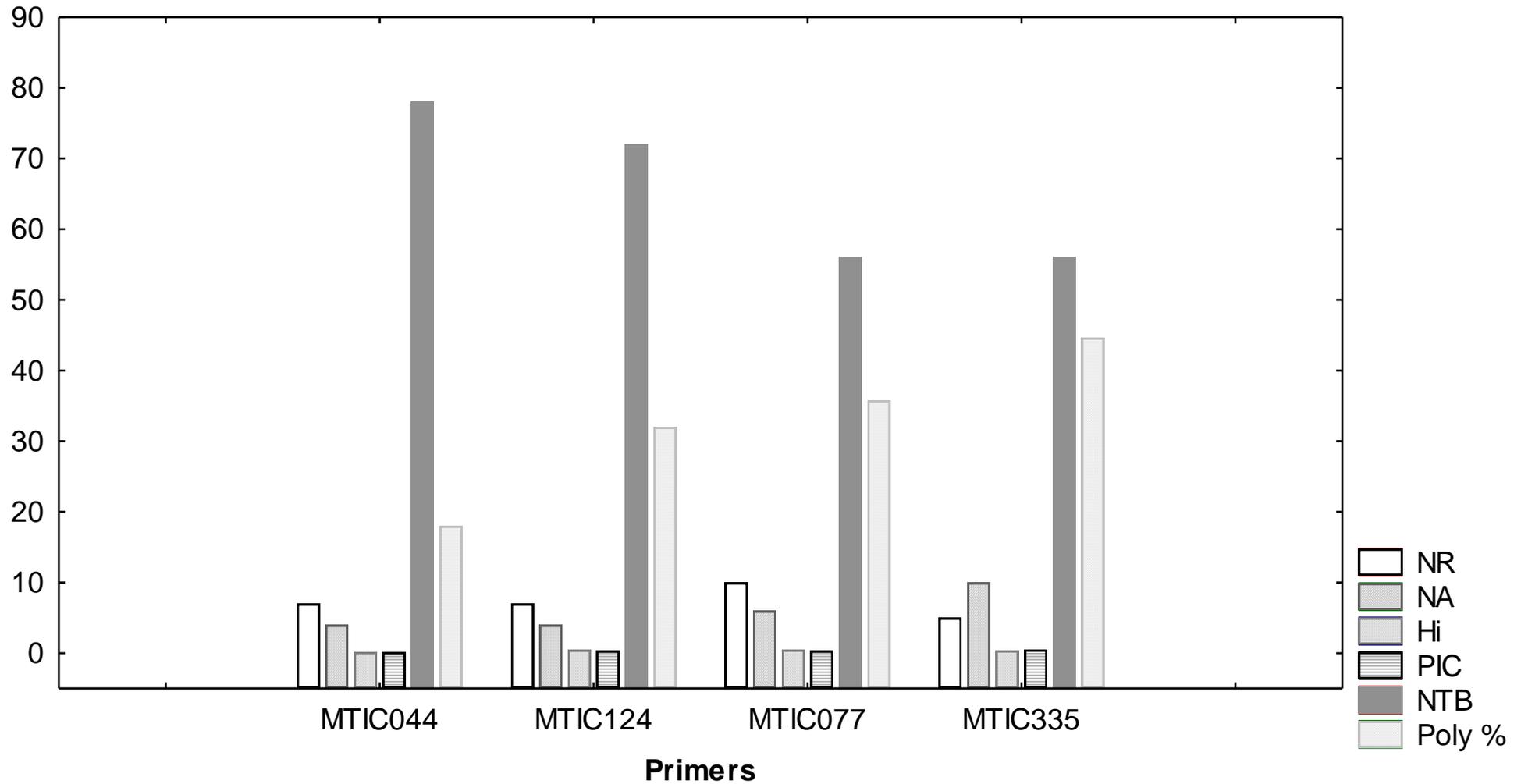


Fig 38 . Représentation générale des paramètres étudiés pour chaque amorce (primer) / locus EST-SSR.

NR : Nombre de répétitions(motifs) , **NA** : Nombre d'allèles, **Hi** : diversité génétique, **PIC** : potentiel en information du polymorphisme, **NTB** : nombre totale de bandes, **Poly %** : polymorphisme (bandes polymorphes)

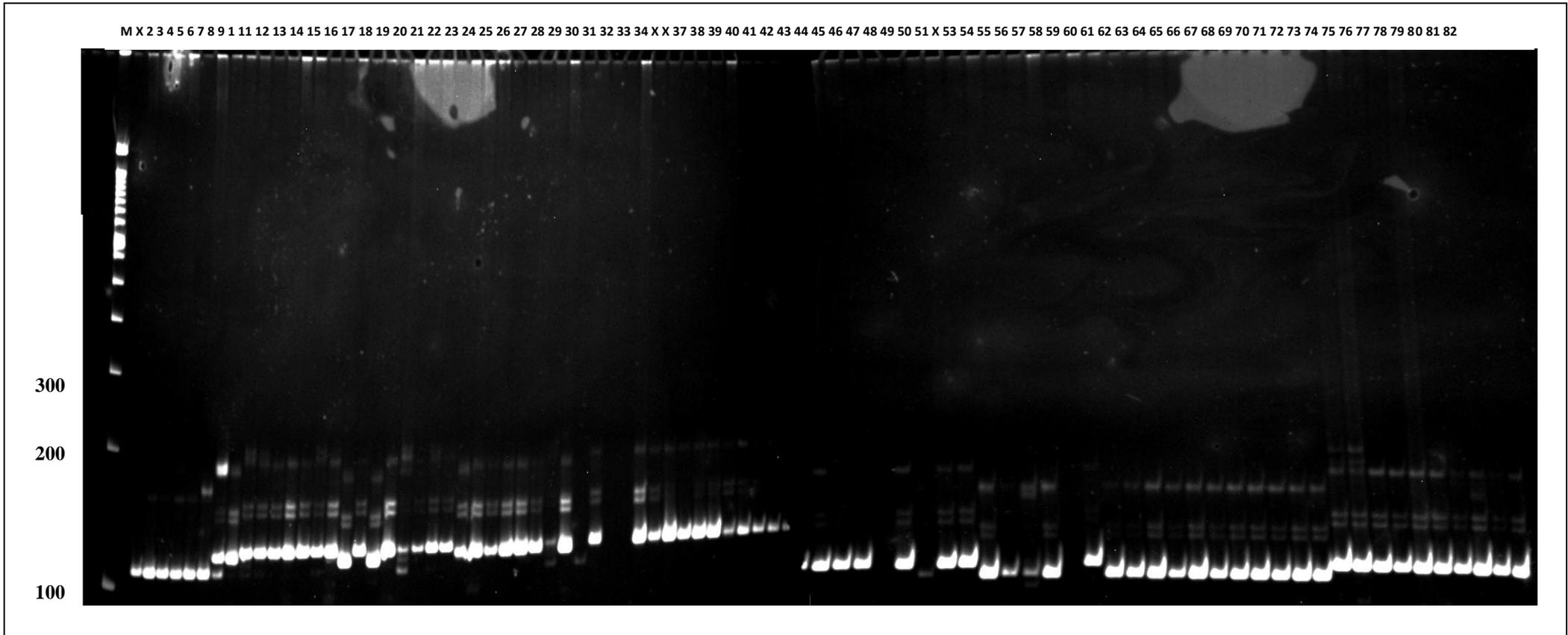


Fig 39 : Profils des marqueurs **EST-SSR** des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l’amorce **MTIC 044**.

Tru 1[2...7]; **Tru 2** [8...15]; **Tru 3** [16...23]; **Tru 4** [23...31]; **Tru 5** [32...38]; **Tru 6** [39...44]; **Tru 7** [45 ...47]; **Tru 8** [48...51, 54, 55 et 61]; **Tru 9** [53, 56 ...60 et 62];

Jemalong [63...72] et **T131** [73...82],

M : marqueur de poids moléculaire. **X** : pas d’ADN ou pas d’amplification.

Tab 16 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (**MTIC044**) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*.

	Tru 1(DZA)	Tru 2.1 (DZA)	Tru 2.2 (DZA)	Tru 3.1(DZA)	Tru 3.2(DZA)	Tru 3.3(DZA)	Tru 4 (DZA)	Tru 5 (SYR)	Tru 6 (LBN)	Tru 7 (MAR)	Tru 8 (TUN)	Tru 9 (JOR)	Jemalong (S)	T131 (T) DZA
<u>Tru1(DZA)</u>	1	0.333	0.000	1.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<u>Tru 2.1(DZA)</u>		1	0.333	0.333	0.333	0.667	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333
<u>Tru 2.2(DZA)</u>			1	0.000	1.000	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<u>Tru 3.1(DZA)</u>				1	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<u>Tru 3.2(DZA)</u>					1	0.500	1.000	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<u>Tru 3.3(DZA)</u>						1	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500
<u>Tru 4 (DZA)</u>							1	1.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<u>Tru 5 (SYR)</u>								1	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<u>Tru 6 (LBN)</u>									1	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000
<u>Tru 7 (MAR)</u>										1	0.000	0.000	0.000	0.000
<u>Tru 8 (TUN)</u>											1	1.000	1.000	1.000
<u>Tru 9 (JOR)</u>												1	1.000	1.000
<u>Jemalong (S)</u>													1	1.000
<u>T131(T) DZA</u>														1

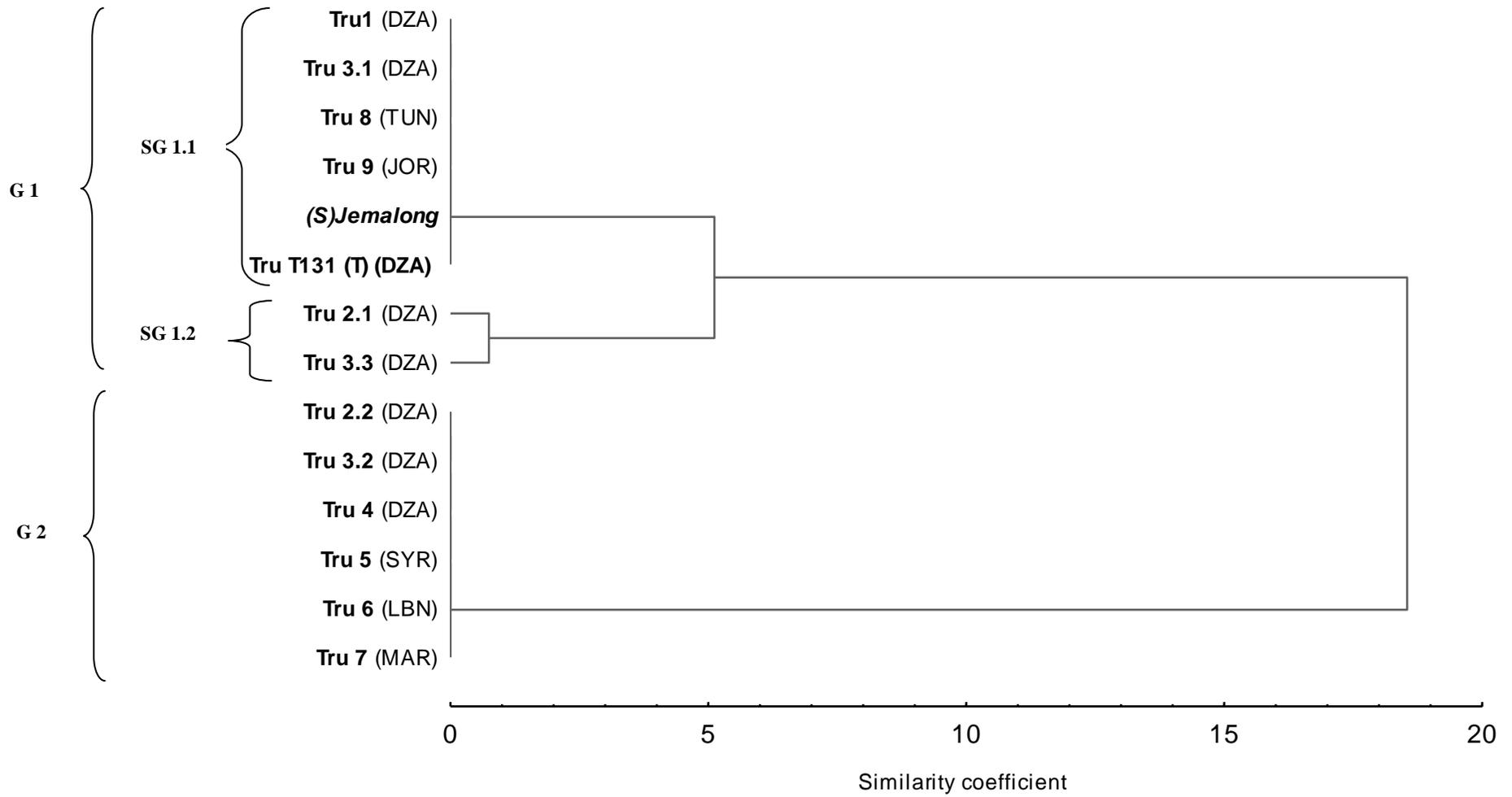


Fig 40 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 044)

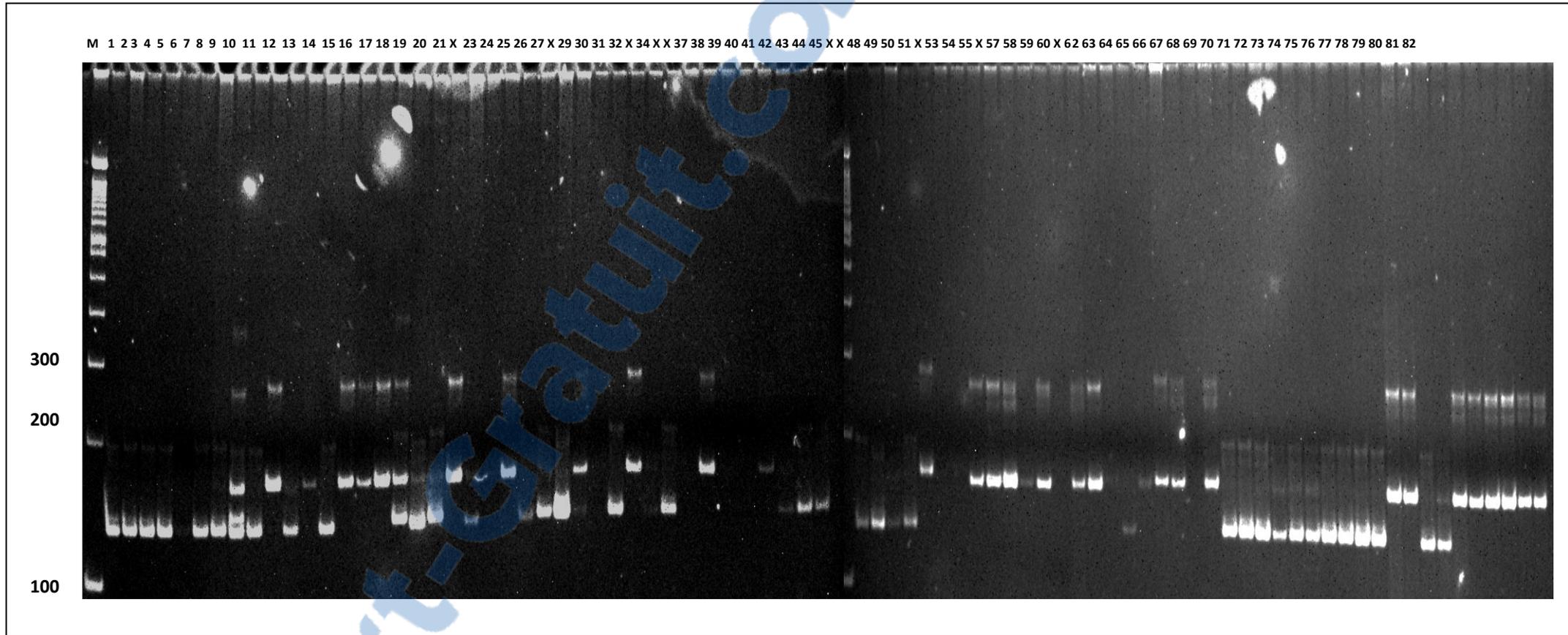


Fig 41 : Profils des marqueurs **EST-SSR** des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l'amorce **MTIC 124**. **Tru 1**[1...7]; **Tru 2** [8...15]; **Tru 3** [16...22]; **Tru 4** [24...31]; **Tru 5** [32...38]; **Tru 6** [39...44]; **Tru 7** [45...xx]; **Tru 8** [48...52, 45 et 55]; **Tru 9** [57... 60 et 62]; **Jemalong** [63...72] et **T131** [73...82],
M : marqueur de poids moléculaire. **X** : pas d'ADN ou pas d'amplification.

Tab 17 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (**MTIC 124**) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*

	Tru1	Tru2.1	Tru2.2	Tru2.3	Tru2.4	Tru3.1	Tru3.2	Tru3.3	Tru3.4	Tru4.1	Tru4.2	Tru5.1	Tru5.2	Tru 6	Tru7	Tru8.1	Tru8.2	Tru9.1	Tru9.2	Tru9.3	Jemalong	T131.1	T131.2
Tru1	1	0.333	1.000	0.000	0.000	0.333	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru2.1		1	0.333	0.667	0.333	1.000	0.333	0.333	0.667	0.333	0.667	0.667	0.333	0.333	0.333	0.333	0.667	0.333	0.333	0.667	0.333	0.667	0.333
Tru2.2			1	0.000	0.000	0.333	1.000	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru2.3				1	0.500	0.667	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000	0.000	0.500	1.000	0.000	1.000	0.000
Tru2.4					1	0.333	0.000	0.000	0.500	0.000	0.500	0.500	0.000	0.000	1.000	1.000	0.500	0.000	1.000	0.500	0.000	0.500	0.000
Tru3.1						1	0.333	0.333	0.667	0.333	0.667	0.667	0.333	0.333	0.333	0.333	0.667	0.333	0.333	0.667	0.333	0.667	0.333
Tru3.2							1	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru3.3								1	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru3.4									1	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000	0.000	0.500	1.000	0.000	1.000	0.000
Tru4.1										1	0.000	0.000	1.000	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru4.2											1	1.000	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000	0.000	0.500	1.000	0.000	1.000	0.000
Tru5.1												1	0.000	0.000	0.500	0.500	1.000	0.000	0.500	1.000	0.000	1.000	0.000
Tru5.2													1	1.000	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru 6														1	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru7															1	1.000	0.500	0.000	1.000	0.500	0.000	0.500	0.000
Tru8.1																1	0.500	0.000	1.000	0.500	0.000	0.500	0.000
Tru8.2																	1	0.000	0.500	1.000	0.000	1.000	0.000
Tru9.1																		1	0.000	0.000	1.000	0.000	1.000
Tru9.2																			1	0.500	0.000	0.500	0.000
Tru9.3																				1	0.000	1.000	0.000
Jemalong																					1	0.000	1.000
T131.1																						1	0.000
T131.2																							1

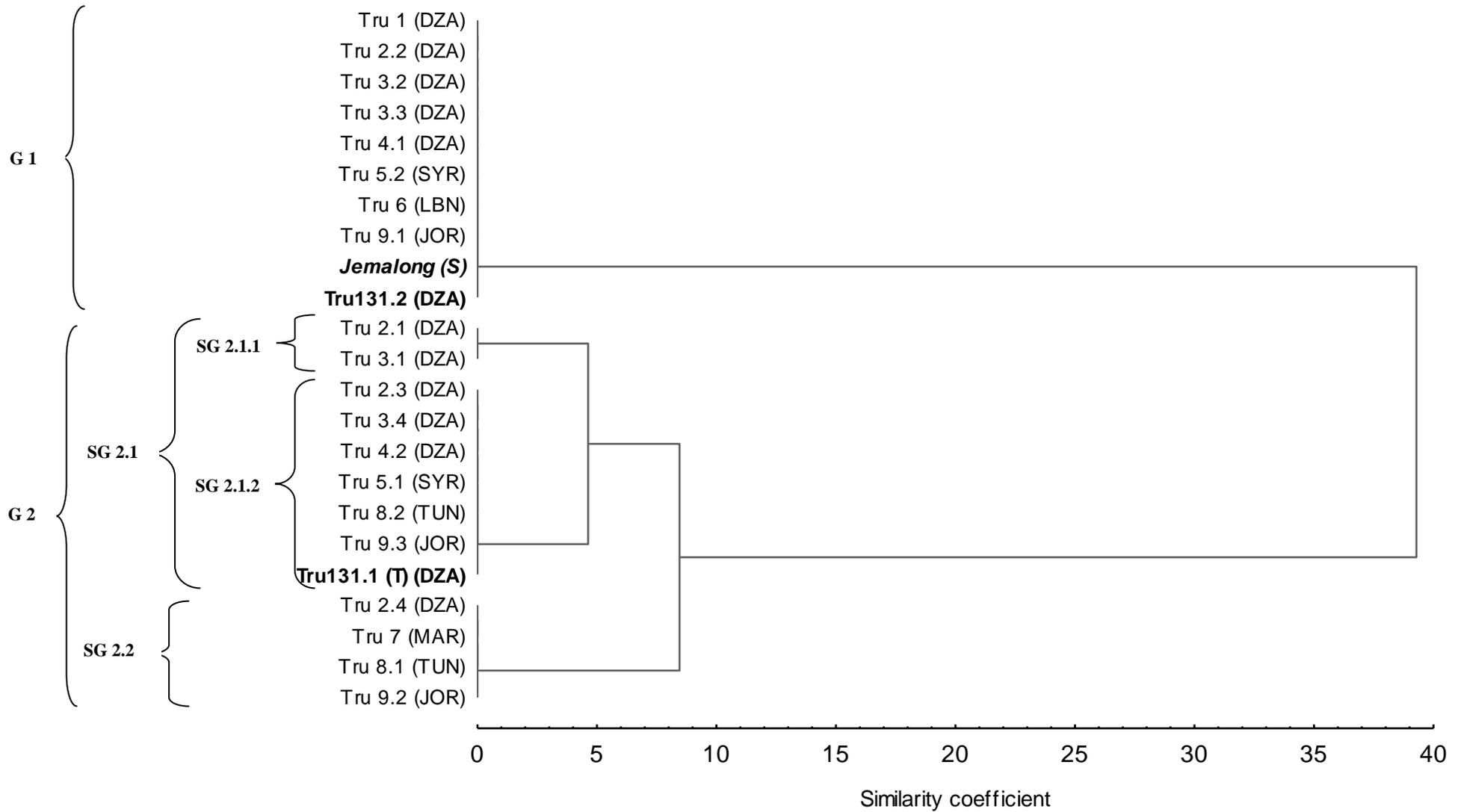


Fig 42 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 124)

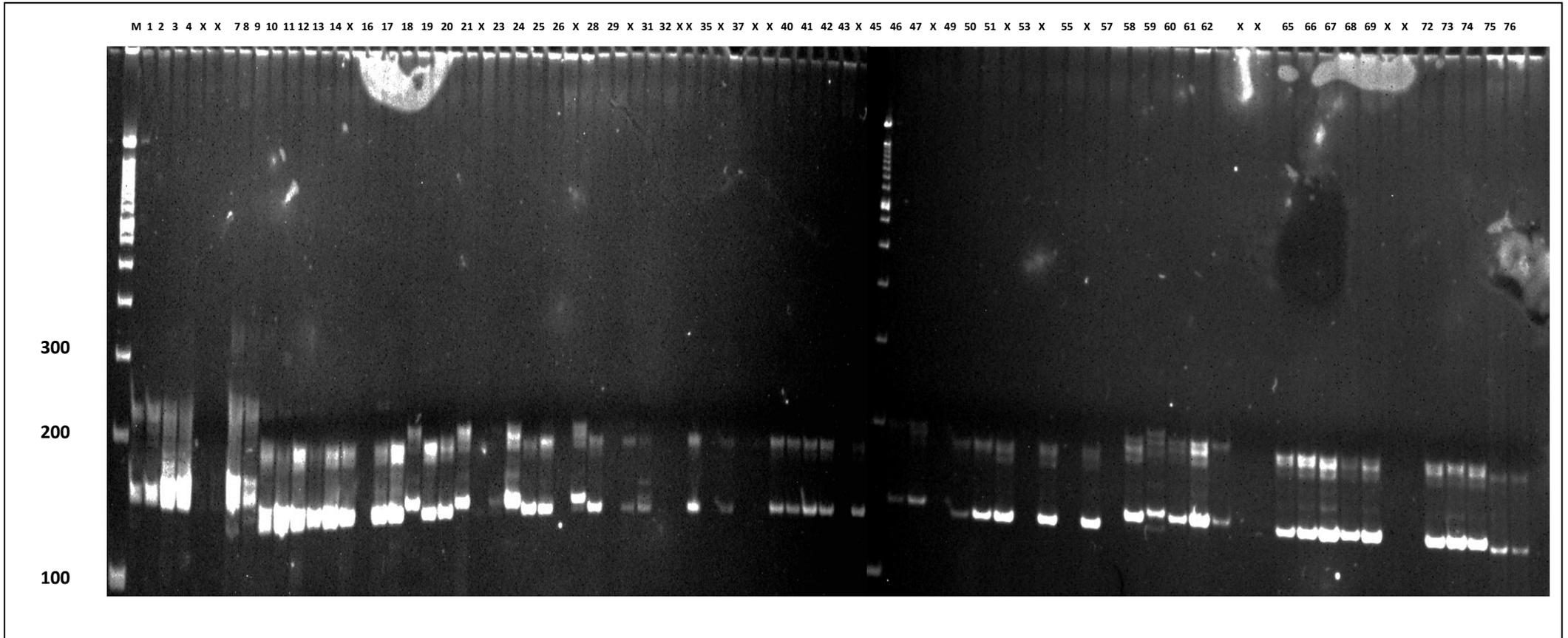


Fig 43 : Profiles des marqueurs **EST-SSR** des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l’amorce **MTIC 077**. **Tru 1**[1...4]; **Tru 2** [8...14]; **Tru 3** [16...23]; **Tru 4** [24...31]; **Tru 5** [32,35et 37]; **Tru 6** [40...43]; **Tru 7** [45 ...47]; **Tru 8** [49...51, 55 et 61]; **Tru 9** [57...60 et 62]; **Jemalong** [65...69 et 72] et **T131** [73...76],
M : marqueur de poids moléculaire. **X** : pas d’ADN ou pas d’amplification.

Tab 18 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (**MTIC 077**) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*

	Tru1	Tru2.1	Tru2.2	Tru2.3	Tru3.1	Tru3.2	Tru3.3	Tru3.4	Tru4.1	Tru4.2	Tru4.3	Tru5	Tru6	Tru7.1	Tru7.2	Tru8.1	Tru8.2	Tru9	<i>Jemalong</i>	T131
Tru1	1	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.333	0.333	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tru2.1		1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.333	0.333	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tru2.2			1	0.500	0.500	1.000	0.333	0.667	0.667	1.000	0.333	1.000	1.000	1.000	0.000	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000
Tru2.3				1	1.000	0.500	0.500	0.333	0.333	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.000	1.000	0.500	1.000	0.500	0.500
Tru3.1					1	0.500	0.500	0.333	0.333	0.500	0.000	0.500	0.500	0.500	0.000	1.000	0.500	1.000	0.500	0.500
Tru3.2						1	0.333	0.667	0.667	1.000	0.333	1.000	1.000	1.000	0.000	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000
Tru3.3							1	0.667	0.667	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.500	0.500	0.333	0.500	0.333	0.333
Tru3.4								1	1.000	0.667	0.667	0.667	0.667	0.667	0.333	0.333	0.667	0.333	0.667	0.667
Tru4.1									1	0.667	0.667	0.667	0.667	0.667	0.333	0.333	0.667	0.333	0.667	0.667
Tru4.2										1	0.333	1.000	1.000	1.000	0.000	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000
Tru4.3											1	0.333	0.333	0.333	0.500	0.000	0.333	0.000	0.333	0.333
Tru5												1	1.000	1.000	0.000	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000
Tru6													1	1.000	0.000	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000
Tru7.1														1	0.000	0.500	1.000	0.500	1.000	1.000
Tru7.2															1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Tru8.1																1	0.500	1.000	0.500	0.500
Tru8.2																	1	0.500	1.000	1.000
Tru9																		1	0.500	0.500
<i>Jemalong</i>																			1	1.000
T131																				1

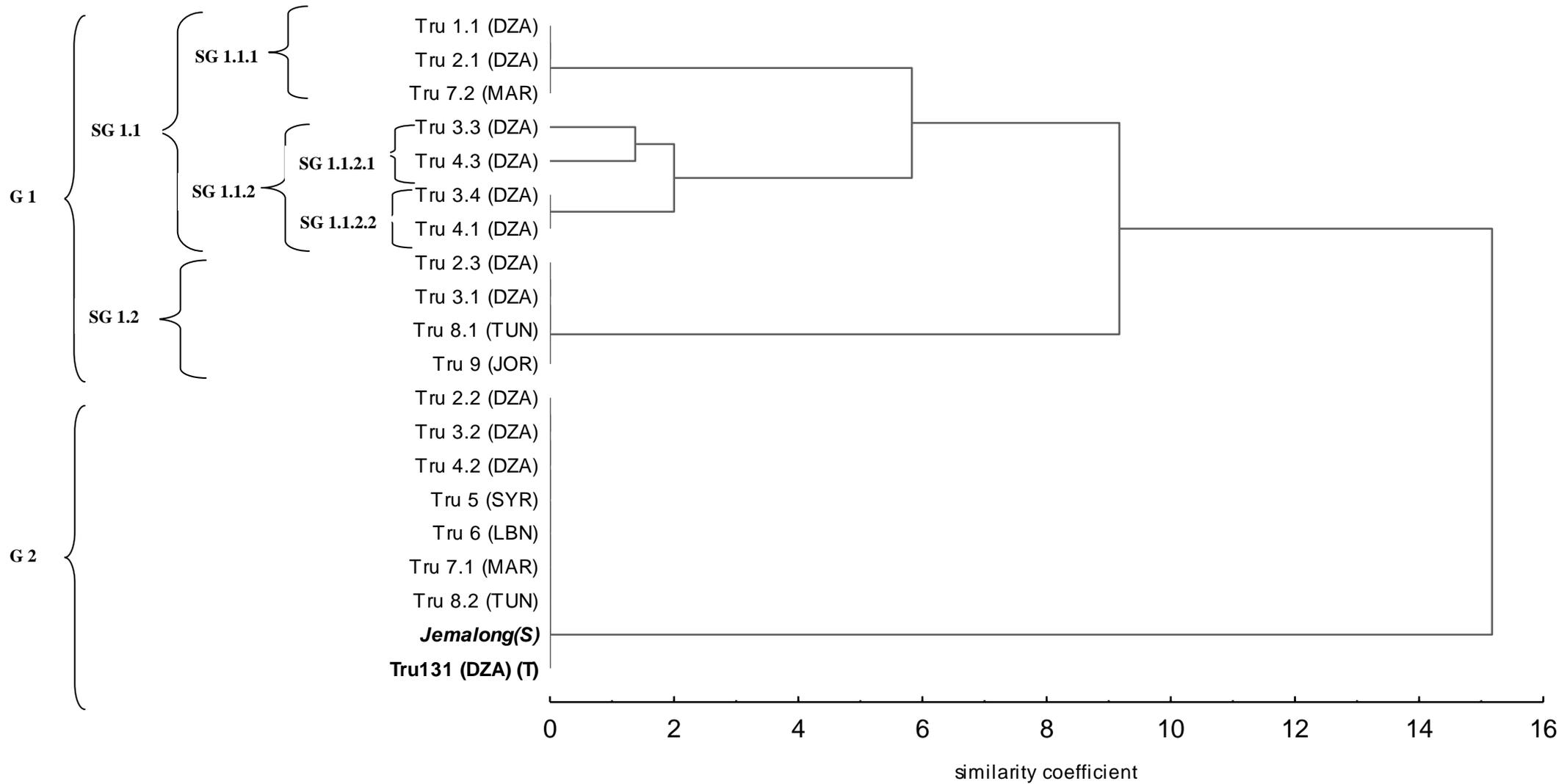


Fig 44 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 077)

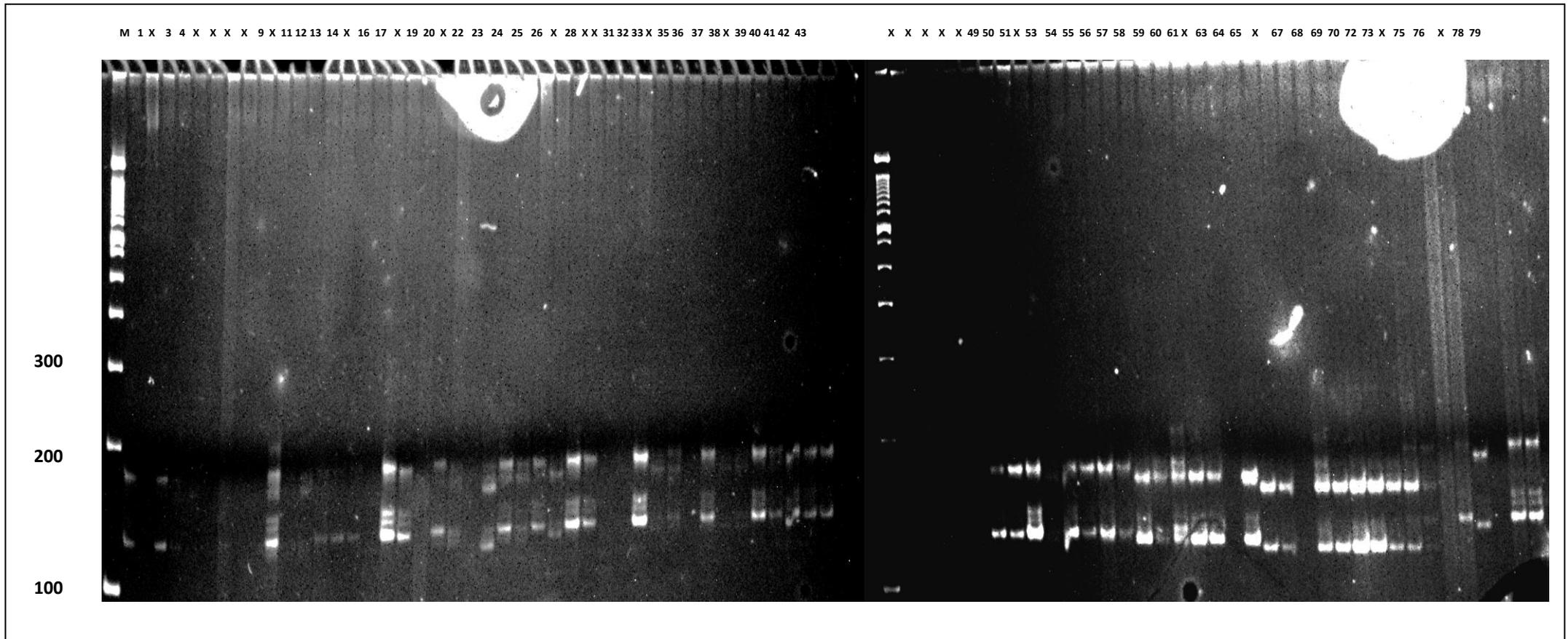


Fig 45 : Profils des marqueurs **EST-SSR** des différents écotypes de *M. truncatula* générés par l'amorce **MTIC 335**. **Tru 1**[1...7]; **Tru 2** [8...15]; **Tru 3** [16...23]; **Tru 4** [24...31]; **Tru 5** [32...38]; **Tru 6** [39...44]; **Tru 7** [49 ...]; **Tru 8** [50..52,54 ,55 et 61]; **Tru 9** [53, 56...60]; *Jemalong* [63...72] et **T131** [73...79],
M : marqueur de poids moléculaire. **X** : pas d'ADN ou pas d'amplification.

Tab 19 : Matrice de similarité génétique pour le locus EST-SSR (MTIC 335) basé sur le coefficient de Jaccard entre les différentes accessions de *Medicago truncatula*

	Tru1.1	Tru1.2	Tru2.1	Tru2.2	Tru2.3	Tru3.1	Tru3.2	Tru3.3	Tru3.4	Tru3.5	Tru4.1	Tru4.2	Tru4.3	Tru5.1	Tru5.2	Tru6.1	Tru6.2	Tru7	Tru8	Tru9	Jemalong.1	Jemalong.2	Tru131
Tru1.1		1 0.500	0.500	1.000	0.500	0.250	0.333	0.500	0.667	0.250	0.250	0.000	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.500	0.000
Tru1.2	0.500		1 0.250	0.500	1.000	0.333	0.500	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.250	0.000
Tru2.1	0.500	0.250		1 0.500	0.250	0.750	0.500	0.250	0.750	0.750	0.750	0.500	0.500	0.500	0.500	0.250	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500	1.000	0.500
Tru2.2	1.000	0.500	0.500		1 0.500	0.250	0.333	0.500	0.667	0.250	0.250	0.000	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.500	0.000
Tru2.3	0.500	1.000	0.250	0.500		1 0.333	0.500	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.250	0.000
Tru3.1	0.250	0.333	0.750	0.250	0.333		1 0.667	0.333	0.500	0.500	0.500	0.667	0.250	0.250	0.667	0.333	0.667	0.250	0.250	0.250	0.250	0.750	0.667
Tru3.2	0.333	0.500	0.500	0.333	0.500	0.667		1 0.500	0.667	0.250	0.250	0.333	0.333	0.000	0.333	0.000	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.500	0.333
Tru3.3	0.500	1.000	0.250	0.500	1.000	0.333	0.500		1 0.333	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.500	0.500	0.500	0.250	0.000
Tru3.4	0.667	0.333	0.750	0.667	0.333	0.500	0.667	0.333		1 0.500	0.500	0.250	0.667	0.250	0.250	0.000	0.250	0.667	0.667	0.667	0.667	0.750	0.250
Tru3.5	0.250	0.000	0.750	0.250	0.000	0.500	0.250	0.000	0.500		1 1.000	0.667	0.250	0.667	0.667	0.333	0.667	0.250	0.250	0.250	0.250	0.750	0.667
Tru4.1	0.250	0.000	0.750	0.250	0.000	0.500	0.250	0.000	0.500	1.000		1 0.667	0.250	0.667	0.667	0.333	0.667	0.250	0.250	0.250	0.250	0.750	0.667
Tru4.2	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.667	0.333	0.000	0.250	0.667	0.667		1 0.000	0.333	1.000	0.500	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	1.000
Tru4.3	1.000	0.500	0.500	1.000	0.500	0.250	0.333	0.500	0.667	0.250	0.250	0.000		1 0.333	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.500	0.000
Tru5.1	0.333	0.000	0.500	0.333	0.000	0.250	0.000	0.000	0.250	0.667	0.667	0.333	0.333		1 0.333	0.500	0.333	0.333	0.333	0.333	0.333	0.500	0.333
Tru5.2	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.667	0.333	0.000	0.250	0.667	0.667	1.000	0.000	0.333		1 0.500	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	1.000
Tru6.1	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.333	0.000	0.000	0.000	0.333	0.333	0.500	0.000	0.500	0.500		1 0.500	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.500
Tru6.2	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.667	0.333	0.000	0.250	0.667	0.667	1.000	0.000	0.333	1.000	0.500		1 0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	1.000
Tru7	1.000	0.500	0.500	1.000	0.500	0.250	0.333	0.500	0.667	0.250	0.250	0.000	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000		1 1.000	1.000	1.000	0.500	0.000
Tru8	1.000	0.500	0.500	1.000	0.500	0.250	0.333	0.500	0.667	0.250	0.250	0.000	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000	1.000		1 1.000	1.000	0.500	0.000
Tru9	1.000	0.500	0.500	1.000	0.500	0.250	0.333	0.500	0.667	0.250	0.250	0.000	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000		1 1.000	0.500	0.000
Jemalong.1	1.000	0.500	0.500	1.000	0.500	0.250	0.333	0.500	0.667	0.250	0.250	0.000	1.000	0.333	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.000		1 0.500	0.000
Jemalong.2	0.500	0.250	1.000	0.500	0.250	0.750	0.500	0.250	0.750	0.750	0.750	0.500	0.500	0.500	0.500	0.250	0.500	0.500	0.500	0.500	0.500		1 0.500
Tru131	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.667	0.333	0.000	0.250	0.667	0.667	1.000	0.000	0.333	1.000	0.500	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	

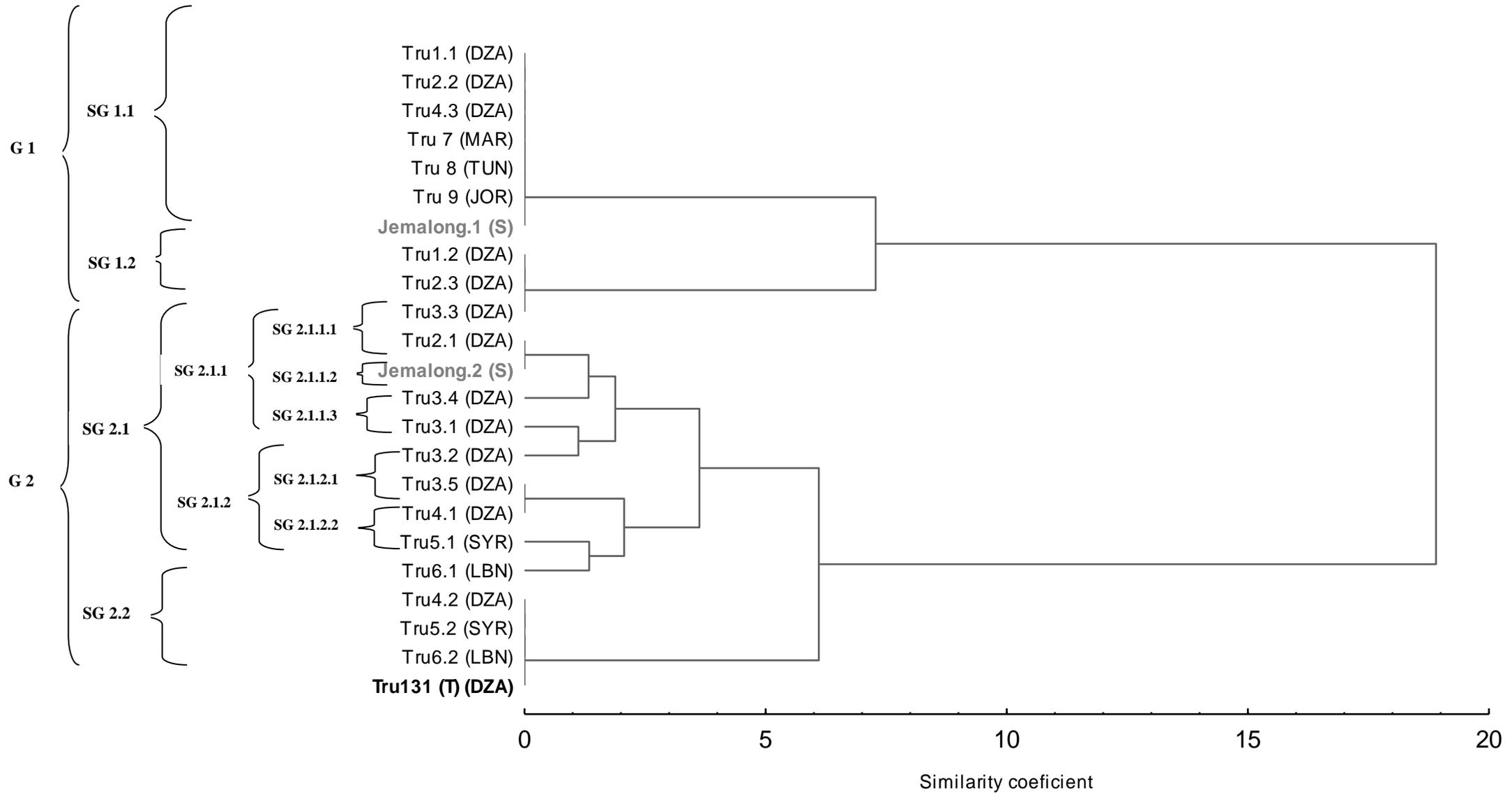
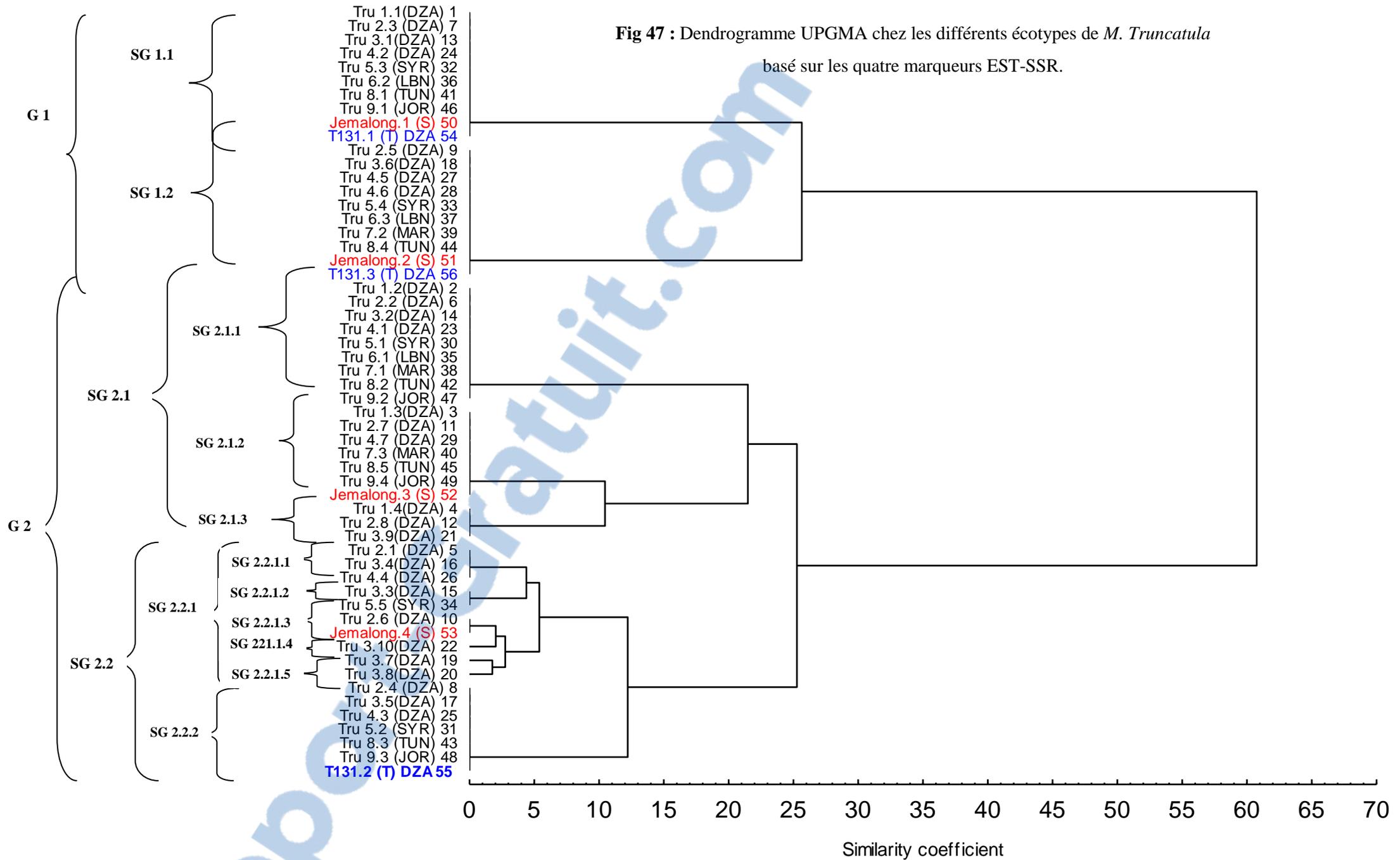


Fig 46 : Dendrogramme UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur le marqueur EST-SSR (MTIC 335)

Fig 47 : Dendrogramme UPGMA chez les différents écotypes de *M. Truncatula* basé sur les quatre marqueurs EST-SSR.



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'étude de la salinité sur la croissance des jeunes plants chez quatre génotypes différents de *M. truncatula*, a permis de sélectionner les génotypes tolérants et sensibles basé sur la résistance racinaire par rapport à la tige et afin d'utiliser des génotypes contrastés pour l'étude biochimique et moléculaire. Les résultats ont montré que le génotype T131 est tolérant, avec une quantité élevée en protéines de réserves par rapport à Jemalong (sensible) qui est le génotype de référence. Cette étude a montré aussi l'influence de des graines âgées du génotype (Tru 673) sur le développement de la racine.

L'analyse des résultats par la technique SDS-PAGE des protéines de réserves des graines des quatre génotypes étudiés chez *Medicago truncatula*, a révélée une variation qualitative modérée entre les génotypes avec des bandes spécifiques des génotypes tolérants comme Tru 131 et des variations quantitatives basé sur l'intensité des bandes protéiques.

L'étude de la variation des capacités germinatives des graines chez les deux génotypes contrastés au stress salin (T131 et Jemalong) ont permis de bien discriminer les génotypes quant à leur tolérance ou sensibilité au sel au cours de la germination. Le génotype Tru 131, a présenté une meilleure capacité en conditions de stress salin et une teneur élevée en protéines synthétisés par rapport à Jemalong. De ce fait, il est intéressant d'étudier les mécanismes biochimiques et moléculaires qui expliquent la tolérance au stress salin au cours de la germination.

L'étude et l'analyse de la partie racinaire chez ces deux génotypes contrastés a montré que le génotype tolérant T131 exprime une meilleure croissance racinaire, une activité gayacol peroxydase (GPX) élevée et un contenu protéique moins élevé par rapport à Jemalong. La gayacol peroxydase est une enzyme qui a un rôle protecteur contre les molécules (ROS) accumulées lors d'un stress oxydatif. En outre, l'analyse des antioxydants dans le cas d'une concentration élevée en sel, montre une augmentation des quantités d'ascorbate et de glutathion chez le génotype tolérant (T131) au niveau racinaire.

Afin de positionner 9 nouvelles accessions appartenant à l'espèce modèle *Medicago truncatula* par rapport aux deux génotypes contrastés au stress salin (Tru 131 et Jemalong), une analyse moléculaire en utilisant des marqueurs de gènes exprimés EST-SSR a été effectuée. Les résultats ont montré une diversité génétique modérée chez les différentes accessions de *Medicago truncatula*. Ceci, indique que la distribution géographique joue un rôle majeur dans le regroupement des accessions selon les conditions environnementales. Ces résultats démontrent que les marqueurs de gènes exprimés EST-SSR utilisés dans notre travail sont appropriés pour distinguer les écotypes selon leur pedigree. En général les accessions d'origine algérienne sont plus proches aux populations syriennes et jordaniennes.

Le clustering utilisant les données EST-SSR, suggère que cette méthode d'analyse pourrait être utile pour l'évaluation génétique qui est très pratique pour l'amélioration de cette légumineuse. L'analyse morphologique et agronomique sur le comportement de ces écotypes vis-à-vis de la salinité est nécessaire pour trouver des associations marqueurs EST-SSR phénotype pour la tolérance au stress salin.

Durant notre travail expérimentale, nous avons rencontré quelques problèmes :

Le manque de produits chimiques, coupure fréquente de courant électrique et d'eau, manque d'appareillage comme la centrifugeuse réfrigérée, contamination des plantes par les champignons au niveau de la serre et problème de disponibilité de la semence.

Malgré cela, nous espérons continuer cette recherche.

En effet,

L'étude du transcriptome au niveau racinaire ouvre une perspective dans la compréhension et l'analyse de l'expression différentielle des gènes impliqués dans ce type de stress.

En fait, à partir du transcriptome, on peut remonter aux gènes via les cDNA (ADN complémentaire) qui contiennent seulement les gènes exprimés dans la racine à un stade de développement précis et dans un environnement bien défini, au cours du stress salin.

Le séquençage des extrémités des cDNA, appelées EST représentant les étiquettes de gènes exprimés, peut nous fournir des informations précises sur les gènes qui s'expriment par le biais du séquençage de ces extrémités.

L'outil bioinformatique est un atout pour la recherche de similitude de ces séquence qui permet de prédire la fonction des gènes exprimés sous un stress spécifique, en utilisant les bases de données moléculaires disponible dans le Web (NCBI et EMBL-EBI).

Références bibliographiques

A

Abdelguerfi, A. (1978). Contribution à l'étude écologique des luzernes annuelles en Algérie. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister, p : 1-116.

Abdellaoui R; Cheikh M'hamed, H. and Ben Naceur, M (2007). Morpho-physiological and molecular characterization of some Tunisia barley ecotypes. *A. Journal of Plant Sciences* 6; 2: 261-268.

Abernethy RH, Thiel DS, Petersen NS, Helm K (1989) Thermotolerance Is Developmentally Dependent in Germinating Wheat Seed. *Plant Physiol* 89: 569-576

Abideen MZ, Gopikumar K, Jamaludheen V (1993). Effect of seed character and its nutrient content on vigour of seedlings in *Pongamia pinnata* and *Tamarindas indica*. *My Forest*. 29: 225-230.

Abirached-Darmency M, Abdel-gawwad MR, Conejero G, Verdeil JL, Thompson R (2005) In situ expression of two storage protein genes in relation to histodifferentiation at mid-embryogenesis in *Medicago truncatula* and *Pisum sativum* seeds. *J Exp Bot* 56: 2019-2028

Adam, D. (2000). Now for the hard ones. *Nature* 408, 792–793.

Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne J. D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Merrill, C. R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R. F., et al. (1991). Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and the human genome project. *Science* 252, 1651-1656.

Adda A., Sahnoune M., Kaid-Harch M. et Merah O (2005). Impact of water deficit intensity on durum wheat seminal roots. *C. R. Biologies*, 328: 918-927.

Agastian, P., S.J. Kingsley & M. Vivekanandan -2000- Effect of salinity on photosynthesis and biochemical characteristics in mulberry genotypes. *Photosynthetica* 38 : 287–290.

Al-Doss, A., and S.E. Smith. 1998. Registration of AZ-97MEC and AZ-97MEC-ST very non-dormant alfalfa germplasm pools with increased shoot weight and differential response to saline irrigation. *Crop Sci*. 38:568.

Alekseeva MW, Kobarskaya NB (1979) Comparative investigations of proteins from aleurone grain of embryonic axis and cotyledon of pea and soybean. *Fisiologia rastenii* 25

Alekseeva MW, Phoung Lien TT, Charalambous N, Jikotovskaya V (1989) Specificity of subunit composition of storage proteins in embryonic axes and cotyledons of pea seeds. *Fisiologia rastenii* 36

Amane M. I. V., Vieira C., Novais R. F., Araujo G. A. A. (1999) Nitrogen and molybdenum fertilization of the common bean crop in the zona da mata region, Minas Gerais state, Brazil. *Revista brasileira de ciência do solo*. Vol. 23, no3, pp. 643-650

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

Amouri A.A. 2015. Effect of Salinity Stress on Seedling Development of Different Ecotypes of the Model Legume *Medicago truncatula*. *Asian Journal of Crop Science*, 7: 154-159.

Amouri AA, Fyad Lameche FZ, Yahia N. 2014. Early seedling development of *Medicago truncatula* genotypes under salt stress in relationship with seed dry weight and storage protein content. *African Journal of Biotechnology*. *Academic Journals* 13 (2):322-331

Amouri AA, Fyad-Lamèche FZ (2012). Comparative analysis of salinity tolerance of the male gametophyte and the sporophyte in *Medicago* at the germination stage. *Acta botanica Malacitana*. 37: 93-102.

Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*. 36 (1): 181-186.

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

Annerose DJM. Critères physiologiques pour l'amélioration de l'adaptation à la sécheresse de l'arachide. *Oléagineux* 1988 ; 43 : 217-21.

Arora A, R Sairam and G Srivastava (2002). "Oxidative stress and antioxidative system in plants." *Current Science* 82(10): 1227-1238

Asada K (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defence Systems in Plants*. C. H. Foyer and P. M. Mullineaux. Boca Raton, CRC Press: 77-104.

Asada K (2006). "Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions." *Plant Physiology* 141(2): 391-396.

Asada K (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639

Ashraf M, Harris PJC (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci*. 166: 3-16.

Ashraf, M. & P.J.C. Harris -2004- Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16

B

- Badawi, G.H, Y. Yamauchi, E. Shimada, R. Sasaki, N. Kawano and K. Tanaka. 2004. Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Sci.*, 66: 919-28.
- Baier M and K-J Dietz (1997). "The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants." *The Plant Journal* 12(1): 179-190.
- Bajji M, Kinet JM, Stanley L. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance in durum wheat. *Plant Growth Regul* 2002 ; 36 : 61-70.
- Baker F. Conclusions. In : Baker FWG, ed. *Drought Resistance in Cereals*. Paris, France : ICSU Press, 1989 : 213-20.
- Baker JC, Steele C, Dure L HI (1988) Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol* 11:277-291
- Barker DG, Gianinazzi-Pearson V (2001). *Medicago truncatula* ENOD11: A novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 14: 737–748.
- Bartels D, Schneider K, Terstappen G, Piatkowski D, Salamini F (1990) Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181: 27-34
- Bartosz G (1997). "Oxidative stress in plants." *Acta Physiologiae Plantarum* 19(1): 47-64.
- Belkhodja M. Bidai Y. (2004). Réponse de la germination des graines d'*Atriplex halimus* L. sous stress salin. *Sécheresse*, N°4, vol.15, 331-335.
- Bellari C, Tani A (1993). Influence of time of collection on the viability of seeds of *Alnus cordata*. *Ann. Acad. Ital. Sci. For.* 42: 259-285.
- Ben Miled, D., M. Boussaid., A. Abdelkefil & A. Cherif -1986- Tolérance au sel d'espèces annuelles du genre *Medicago* au cours de la germination. Séminaire international sur les végétaux en milieu aride, 8 au 10 septembre, Jerba., Tunisie.
- Benson, R. C., Yuhr, L and Kaufmann, R.; 2003. Assessing the Risk of Karst Subsidence and Collapse. 9th Multidisciplinary Conference on Sinkholes and the Engineering and Environmental Impacts of Karst. Geo-Institute of ASCE, Huntsville, Alabama, September 6-10.
- Bewley JD (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066
- Bewley JD, Black M (1994) *Seeds : Physiology of development and germination*. Plenum Press, New-York

- Biala, K., Peeters, A., Muys, B., Hermy, M., Brouckaert, V., García, V., Van der Veken, B. and Valckx J. 2005. Biodiversity indicators as a tool to assess sustainability levels of agroecosystems, with a special consideration of grassland areas. *Options Méditerranéennes, Series A*, No. 67, 439-443.
- Bláha L, Pazderů K (2013). Influence of the Root and Seed Traits on Tolerance to Abiotic Stress. *Agricultural Chemistry*. Edited by Margarita Stoytcheva and Roumen Zlatev. Published by InTech. 5. 1-89.
- Blum A, Ebercom A. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci* 1981 ; 21 : 43-7.
- Blum A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. *Plant Growth Regul* 1996 ; 20 : 135-48.
- Blum A. Plant breeding for stress environments. Boca Raton, USA : CRC Press Ed, 1988.
- Bosque-Perez NA, Olojede SO, Buddenhagen IW (1998). Effect of Maize Streak Virus disease on the growth and yield of maize as influenced by varietal resistance levels and plant stage at time of challenge. *Euphytica*. 101: 307–317.
- Boudet J, Buitink J, Hoekstra FA, Rogniaux H, Larré C, Satour P & Leprince O (2006) Comparative analysis of the heat stable proteome of radicles of *Medicago truncatula* seeds during germination identifies late embryogenesis abundant proteins associated with desiccation tolerance. *Plant Physiol* 140:1418–1436.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-54.
- Braye E. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 1997 ; 2 : 48-54.
- Bray, P. G., Janneh, O., Raynes, K. J., Mungthin, M., Ginsburg, H. and Ward, S. A. (1999). Cellular uptake of chloroquine is dependent on binding to ferriprotoporphyrin IX and is independent of NHE activity in *Plasmodium falciparum*. *J. Cell Biol.* 145, 363-376
- Parida A.K., Das A.B. (2005) Salt tolerance and salinity effect on plants: review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol.60, pp. 324-349.
- Brunel Muguet, S. -2008- Caractérisation écophysiological de différents génotypes de *Medicago truncatula* au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe. Thèse de doctorat en Sciences agronomiques. Université d'Angers (France), 105 p.
- Bruschi P, Vendramin GG, Bussotti F, Grossoni P (2003) Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Ann Bot* 91: 707–716
- Budak H, Pedraza F, Cregan PB, Baenziger PS and Dweikat I. 2003. Development and utilization of SSRs to estimate the degree of genetic relationships in a collection of pearl millet germplasm. *Crop Science* 43:2284–2290.

Buiteveld J., van Veller M.G.P., Hiemstra S.J., ten Brink B. & Tekelenburg T., 2009. An exploration of monitoring and modelling agrobiodiversity: From indicator development towards modelling biodiversity in agricultural systems on the sub-specific level. CGN/DLO Foundation, Wageningen, The Netherlands. Accès: <http://edepot.wur.nl/51240> [22.10.2013]

C

Capela D, Barloy-Hubler F, Gouzy J, Bothe G, Ampe F, Batut J, Boistard P, Becker A, Boutry M, Cadieu E, Dreano S, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Kahn D, Kiss E, Lelaure V, Masuy D, Pohl T, Portetelle D, Puhler A, Purnelle B, Ramsperger U, Renard C, Thebault P, Vandebol M, Weidner S, Galibert F (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9877-9882

Casey R., Domoney C and Nellis., 1986. Legume storage protein and their genes. *Oxford surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. Edited by B.J. Miflin .3 : 1-95.

Castillo, 1996. Genotypic variability in maize cultivars (*Zea mays* L.) for resistance to drought and salinity at the seedling stage. *J. Plant Physiol.*, 148: 741-744.

Chalck PM (1998) Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. *Aust. J. Res* 49: 303-316

Chaudhary S, Crossland L (1996) Identification of tissue-specific, dehydration-responsive elements in the Trg-31 promoter. *Plant Mol Biol* 30: 1247-1257

Chen Z and DR Gallie (2004). "The Ascorbic Acid Redox State Controls Guard Cell Signaling and Stomatal Movement." *Plant Cell* 16(5): 1143-1162.

Chourey, K., S. Ramani & S.K. Apte -2003- Accumulation of LEA proteins in salt (NaCl) stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cv Bura Rata and their degradation during recovery from salinity stress. *Journal of Plant Physiology* 160: 1165-1174.

Christoffels A., van Gelder A., Greyling G., Miller R., Hide T., Hide W. STACK: sequence tag alignment and consensus knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2001;29:234-238

Christova PK, Christov NK, Imai R (2006). A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Microdochium nivale*. *Planta*. 223: 1207-1218. DOI:10.1007/s00425-005-0169-9

Clavel D, Drame NK, Roy-Macauley H, Braconnier S, Laffray D. Analysis of early variations in responses to drought of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars for using as breeding traits. *Environ Exp Bot* 2005 ; (sous presse).

Clavel D, Sarr B, Marone E, Ortiz R. Potential agronomic and physiological traits of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end-of-cycle drought conditions. *Agronomie* 2004 ; 24 : 1-8.

Clemens S (2006a). "Evolution and function of phytochelatin synthases." *Journal of Plant Physiology* 163(3): 319-332.

Clemens S (2006b). "Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants." *Biochimie* 88(11): 1707-1719.

Cook DR (1999) *Medicago truncatula*--a model in the making! *Curr Opin Plant Biol* 2: 301-4

Costa França MG, Pham Thi AT, Pimentel C, Pereyra Rossiello RO, Zuily-Fodil Y, Laffaray D. Differences in growth and water relation among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induces drought stress. *Environ Exp Bot* 2000 ; 43 : 227-337.

Crawford DJ, Ruiz E, Stuessy TF, Tepe E, Quevequep A, Gonzales F, Jensen RJ, Anderson GJ, Bernardello G, Baeza CM, Swenson U, Silva M. 2001. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *American J. Botany* 88(12): 2195-2203.

Crochemore ML, Huygeh C, Julier B (1998). Structuration of alfalfa genetic diversity using agronomic and morphological characteristics. Relationship with RAPD markers. *Agronomy* 18: 79-94.

Croston GE, Kerrigan LA, Lira LM, Marshak DR, Kadonaga JT. Sequence-specific antirepression of histone H1-mediated inhibition of basal RNA polymerase II transcription. *Science*. 1991;251:643-649

Cruz de Carvalho MH, D'arcy-Lameta A, Roy-Macauley H, et al. Aspartic proteinase in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.): enzymatic activity, gene expression and relation to drought susceptibility. *FEBS Lett* 2001 ; 492 : 342-6.

Cushman J.C., Meyer G., Michalowski C.B., Schmitt J.M. & Bohnert H.J. (1989) Salt stress leads to the differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell* 1,715-725.

D

Damerval C, Hebert Y, Vienne D. 1987. Is the polymorphism of protein amounts related to phenotypic variability? A comparison of twodimensional electrophoresis data with morphological traits in maize. *Theor. Appl. Genet* 74: 194-202.

Davey M.W., Dekempeneer E. & Keulemans J. (2003) Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione. *Analytical Biochemistry* 316, 74-81.

de Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM (1989). Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol* 111:607-619.

Decroocq V, Fave MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *Theor Appl Genet* 106: 912-922

Deleu C, Coustaut M, Niogret M, Larher F. Three new osmotic stress-regulated cDNAs identified by differential display polymerase chain reaction in rapeseed leaf discs. *Plant Cell Environ.* 1999;22:979–988.

Deutsch JC (1997). "Ascorbic Acid and Dehydroascorbic Acid Interconversion without Net Oxidation or Reduction." *Analytical Biochemistry* 247(1): 58-62.

Deutsch JC (2000). "Dehydroascorbic acid." *Journal of Chromatography A* 881(1-2): 299-307.

Diaz-Vivancos P, M Rubio, V Mesonero, PM Periago, A Ros Barcelo, P Martinez-Gomez and JA Hernandez (2006). "The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection." *Journal of Experimental Botany* 57(14): 3813-3824.

Dickson MH (1980). Genetic aspects of seed quality. *Hortic Sci.* 15: 771-774.

Abderrezak Djabeur, Meriem Kaid-Harche and Douadi Khelifi (2008). Proteins polymorphism of some populations of *Lygeum spartum* L. in Algeria. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 3 (1): 337-341.

Djemel N, Guedon D, Lechevalier A, Salon C, Miquel M, Prosperi JM, Rochat C, Boutin JP (2005). Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol Biochem.* 43:557–566.

Djemel N, Guedon D, Lechevalier A, Salon C, Miquel M, Prosperi JM, Rochat C, Boutin JP. 2005. Development and composition of the seeds of nine genotypes of the *Medicago truncatula* species complex. *Plant Physiol. Biochem* 43:557-566.

Dornbos DL, Mullen RE (1991). Influence of stress during soybean seed fill on seed weight, germination, and seedling growth rate. *Canadian Journal of Plant Science.* 71(2) : 373-383.

Doyle JJ, Luckow MA (2003) The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol* 131: 900-910

Duncan DB (1955). Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics.* 11:1-42.

Dure L, 3rd, Greenway SC, Galau GA (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20: 4162-4168

E

EL Faleh, M.; (1998). Evaluation de 423 écotypes d'orge collectés en Tunisie (Centre et Sud). Utilisation en amélioration variétale pour la sélection d'idiotypes adaptés à différentes régions bioclimatiques. Thèse de Doctorat de Biologie. Fac., Sci., Tunis., Tunisie, 300 p. *Bot* 59:150–159

EL Maarouf H, Zuily-Fodil Y, Gareil M, D'Arcy-Lameta A, Pham Thi AT. Enzymatic activity and gene expression under water stress of phospholipase D in two cultivars of *Vigna unguiculata* L. Walp differing in their drought tolerance. *Plant Mol Biol* 1999 ; 39 : 1257-65.

Erskine W, Ashkar FE (1993). Rainfall and temperature effects on lentil (*Lens culinaris* Medik) seed yield in Mediterranean environments. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*. 121: 347-354. *Euphytica*, 106: 261-270

F

Farissi M., Ghoulam C., Bouizgaren A. (2014) : “Effet de la salinité sur la production et la qualité fourragère de populations de luzerne dans la région de Marrakech (Maroc)”, *Fourrages*, 219, 271-275

Farissi.M et al.,2014 : La symbiose Légumineuses-rhizobia sous conditions de salinité : Aspect Agro-physiologique et biochimique de la tolérance. *International Journal of Innovation and Scientific Research* ISSN 2351-8014 Vol. 11 No., pp. 96-104

Ferrari-Iliou R, EL Maarouf H, Pham Thi AT, D’arcy Lameta A, Gareil M, Zuily-Fodil Y(1996). Cloning and sequencing of a cDNA encoding a Cowpea ascorbate peroxidase and gene expression under drought. *CR Soc Biol* 1996 ; 190 : 666.

Ferreira-Silva S.r.L., Voigt E.L., Silva E.N., Maia J.M., Fontenele A.d.V. & Silveira J.A.G. (2011) High temperature positively modulates oxidative protection in salt-stressed cashew plants. *Environmental and Experimental Botany*, 74, 162-170.

Field, D. and Wills, C. (1996). Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proc. Biol. Sci.* 263, 209-215.

Fisher R. Optimizing the use of the water and nitrogen through breeding of crops. *Plant Soil* 1981 ; 58 : 249-78.

Flajoulot S, Ronfort J, Baudouin P, Huguet T, Huyghe C and Julier B (2005) Genetic diversity among alfalfa (*Medicago sativa*) cultivars coming from a breeding program, using SSR markers. *Theor Appl Genet* 111: 1420-1429.

Flowers, T.J. and Yeo, A.R. (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiol.* 22, 875-884

Fotopoulos V, Ziogas V, Tanou G, Molassiotis A. 2010. Involvement of AsA/DHA and GSH/GSSG ratios in gene and protein expression and in the activation of defence mechanisms under abiotic stress conditions. In: Anjum NA, Chan M-T, Umar S , eds, *Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants*. Netherlands:Springer. pp 265–302.

Fotopoulos, V., De Tullio, M.C., Barnes, J. and Kanellis, A.K. (2008) Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *J. Exp. Bot.* 59, 729–737.

Foury A (1954) Les légumineuses fourragères au Maroc In: (eds) *Les Cahiers de la Recherche Agronomique*. Rabat. pp 289-656

Foyer CH and G Noctor (2000). "Tansley Review No. 112. Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling." *New Phytologist* 146(3): 359-388.

Foyer CH and G Noctor (2003). "Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria." *Physiologia Plantarum* 119: 355-364.

Foyer CH and G Noctor (2005a). "Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context." *Plant, Cell and Environment* 28: 1056-1071.

Foyer CH and G Noctor (2005b). "Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses." *Plant Cell* 17(7): 1866-1875.

Foyer CH, FL Theodoulou and S Delrot (2001). "The functions of inter- and intracellular glutathione transport systems in plants." *Trends in Plant Science* 6(10): 486-492.

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866–1875

França MB, Panek AD, Eleutherio ECA (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 146: 621-631.

Frankham, R., 2003. Genetics and conservation biology. *C. R. Biol.* 326, S22–S29. Ghazoul, J., 2005. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biol. Rev.* 80, 413–443

Frugoli J, Harris J (2001) *Medicago truncatula* on the move! *Plant Cell* 13: 458-63

Fukai S, Cooper M. Development of drought-resistant cultivars using physio-morphological traits in rice. *Field Crops Res* 1995 ; 40 : 67-86.

Fukai S, Pantuwan G, Jongdee B, Cooper M. Screening for drought resistance in rainfed lowland rice. *Field Crops Res* 1999 ; 64 : 61-74.

Fyad Lameche FZ, Bellatar G, Bouabdallah S, Yahia N. 1996. Between and within species variation in annual *Medicago* species. In : Genier G (ed.), Prosperi JM (ed.). *The Genus Medicago in the Mediterranean region: Current situation and prospects in research*, CIHEAM, Zaragoza. 161-169

Fyad Lameche FZ. 1998. Variabilite des proteines de reserves de grains de population d'especes annuelles de *Medicago*. *Acta Bot. Galica* 145 (3) :199-217.

G

GAFF D. Protoplasmic tolerance in extreme water stress. In : Turner NC, Kramer PJ, eds. *Adaptation of Plants to Water and High Temperature*. New York, USA. 1980 : 207-30.

Galau GA, Hugues DW, Dure L (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (LEA) mRNAs. *Plant Mol Biol* 7

Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D (2001). Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiol.* 126: 835-848.

Gamas P, Niebel FDC, Lescure N, Cullimore JV (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 233–242

Gandonou CB, Gnancadja LS, Abrini J, Skali Senhaji N. 2011. Salinity tolerance of some sugarcane (*Saccharum* sp.) cultivars in hydroponic medium. *Sugar Cane International* (in press).

Genier G.,P. Guy, Prosperi J. M.,1992. Les luzernes. INA. Gallais et H. bannerot : Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection. INRA Edition, 323-338.

Gepts P (2004) Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breed Rev* 24: 1–44

Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF, Young ND (2005) Legumes as a Model Plant Family. *Genomics for Food and Feed Report of the Cross-Legume Advances through Genomics Conference. Plant Physiology* 137: 1228–1235

Ghafoor A, Gulbaaz FN, Afzal M, Ashraf M, Arshad M. 2003. Inter-relationship between SDS-PAGE markers and agronomic traits in Chickpea (*Cicer Arietinum*). *Pak. J. Bot* 35: 613-624.

Ghassemi-Golezani K (1992). Effects of seed quality on cereal yields. University of Reading, UK. PhD Thesis. pp.1-264.

Marta Gietler, Małgorzata Nykiel, Barbara Maria Zagdańska . 2015. Changes in the reduction state of ascorbate and glutathione, protein oxidation and hydrolysis leading to the development of dehydration intolerance in *Triticum aestivum* L. seedlings. *Plant Growth Regulation* : 1- 11. DOI: 10.1007/s10725-015-0133-z

Gimenes Gilles, C. -2009- Étude cellulaire et moléculaire de la germination chez *Medicago truncatula*. Thèse de doctorat en Biologie Cellulaire et Moléculaire Végétale. Université d'Angers (France), 174 p.

Graham, PH. & Vance, CP. (2003), Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*, Vol. 131, No. 3, pp. 872–877, ISSN: 0032-0889

Grill E, S Löffler, E-L Winnacker and MH Zenk (1989). "Phytochelatins, the Heavy-Metal-Binding Peptides of Plants, are Synthesized from Glutathione by a Specific gamma – glutamylcysteine Dipeptidyl Transpeptidase (Phytochelatase)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(18): 6838-6842.

Grobei, M.A., E. Qeli., E. Brunner., H. Rehrauer., R. Zhang., B. Roschitzki., K. Basler., C.H Ahrens & U. Grossniklaus -2009- Deterministic protein inference for shotgun proteomics data provides new insights into Arabidopsis pollen development and function. *Genome Research* 19:1786-1800.

Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Sing R, Kumar N, Balyan HS (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Genet Genomics* 270: 315–323

Gyuris J, E Golemis, H Chertkov and R Brent (1993). "Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2." *Cell* 75(4): 791-803.

H

Haig, S.M. 1998. Molecular contributions to conservation. *Ecol.* 79: 413-425.

Hair JF, Anderson Jr, Tatham RE, Black WC (1998). *Multivariate Data Analysis*, (5th Edition). Upper Saddle River, New Jersey(NJ): Prentice Hall. cell cycle, partners in crime?" *Plant Physiology and Biochemistry* 40(6-8): 537-548.

Halliwell B, Whiteman M (2004) Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 142: 231–255

Hammer K. & Diederichsen A., 2009. Evolution, status and perspectives for landraces in Europe. In: *European landraces: On-farm conservation management and use* (Eds. M. Veteläinen, V. Negri & N. Maxted) biodiversity International, Italy, Rome, 23–44.

Hamrick JL, Godt MJW, Murawski DA, Loveless MD. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implication for conservation biology. In: Falk DA. and Holsinger KE (Eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press, New York, USA. 75-86

Han B, Kermode AR. 1996. Dehydrin-like proteins in castor bean seeds and seedlings are differentially produced in response to ABA and water-deficit-related stresses. *Journal of Experimental Botany* 47, 933-9.

Hancock J.F., Grumet R. and Hokanson S.C. 1996. The opportunity for escape of engineered genes from transgenic crops. *Hortscience* 31, 1080–1085

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A. and Pardo, J.M. (2000a) The dawn of plant salt to tolerance genetics. *Trends in Plant Sci.* 5, 317-319. Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K. and Bohnert, H.J. (2000b) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 463-499.

Hayashi, H., Murata, N., 1998. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. In: Sato, K, Murata, N. (Ed.), *Stress Response of Photosynthetic Organisms: Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*. Elsevier, Amsterdam, pp. 133–148.

Heller. R., Esnaut. R., Lance.C., 1993. *Physiologie végétale : 2- Développement*, 5ème Eddition .Masson : pp 146-147.

Herschbach C and H Rennenberg (1991). "Influence of Glutathione (GSH) on Sulphate Influx, Xylem Loading and Exudation in Excised Tobacco Roots." *Journal of Experimental Botany* 42(8): 1021-1029.

Heywood VH. & Dulloo ME., 2005. In situ conservation of wild plant species: a critical global review of best practices. *IPGRI Technical Bulletin* 11. IPGRI, Rome, Italy

Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy, and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity, and relationships in a *Malus × domestica* Borkh. core subset collection. *Theor. Appl. Genet.* 97:671–683.

Horemans N, C H. Foyer, G Potters and H Asard (2000). "Ascorbate function and associated transport systems in plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 38(7-8): 531-540

Horemans N, C H. Foyer, G Potters and H Asard (2000). "Ascorbate function and associated transport systems in plants." *Plant Physiology and Biochemistry* 38(7-8): 531-540.

I

INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration in plants. *Annu Rev Plant Physiol* 1996 ; 47 : 377-403.

Ingram J, Bartels D (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 377-403.

Ingram, J. & D. Bartels -1996- The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Revue Plant Molecular Biology* 47: 377–403.

Inze D and MV Montagu (2001). *Oxidative Stress in Plants*, CRC

Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchez-Diaz M. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiol. Plant.*, 84: 55-60.

J

Jacob T, Ritchie S, Aaaman S, Gilroy S. Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 9 : 12192-7.

Jarne, P., and P. J. L. Lagoda. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends Ecol. Evol.* 11:424–429.

Journet EP, El Gachtouli N, Vernoud V, de Billy F, Pichon M, Dedieu A, Arnould C, Morandi D,

K

Kalemba EM, Pukacka S (2007). Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection. *Biollett.* 44 (1): 3-16.

Kalinova J, Moudry J. 2006. Content and quality of protein in proso Millet *Panicum miliaceum* L. varieties. *Plants foods for human nutrition* 61 (1) : 43-47.

Kashi Y, King D, Soller M (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trends Genet* 13: 74-78.

- Kermode AR (1990) Regulatory mechanism involved in the transition from seed development to germination. *SRV Crit Rev Plant Sci* 80: 280-288
- Khalifaoui JLB. Genetic adaptation to drought of cultivated species and consequences on plant breeding. *Bull Soc Bot Fr* 1990 ; 137 : 125-37.
- Khan MA Gul B, Weber DJ (2002). Seed germination in relation to salinity and temperature in *Sarcobatus vermiculatus*. *Biologia Plantarum*. 45: 133–135.
- Khan MA, Gulzar S (2003). Germination Responses of *Sporobolus Ioclados*: A Saline Desert Grass. *J. Arid Environ*. 53: 387-394.
- Khan, M.H., S.K. Panda, 2008. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. *Acta Physiol Plant*, 30, 91-89.
- Khemiri.H, Belguith.h, Jridi.T, Ben El Arbi et Ben Hamida.J., 2004. Caractérisation biochimique d'une amylase active au cours du processus germinatif des graines de colza (*Brassica napus* L). Congrès International de biochimie. Marrakech, Maroc, 3-6 Mai 2004. pp : 146-149.
- Kimura, M. 1968. Genetic variability maintained in a finite population due to mutational production of neutral and nearly neutral isoalleles. *Genet. Res.* 11: 247–269.
- Kimura, M. 1983. *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Klueva NY, Zhang J, Nguyen HT. Molecular strategies for managing environmental stress. In : Copra VL, Singh RB, Varma PJ, eds. *Crop Productivity and Sustainability : Shaping the Future*, roceeding of 2nd International Crop Science Congress. New Delhi, Inde : Oxford IBH, 1998 : 501-24.
- Klueva, N.Y., Maestri, E., Marmioli, N. and Nguyen, H.T. 2001. Mechanisms of thermotolerance in crops. In: A.S. Basra (Ed.) *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*, Food Products Press, Binghamton, NY, pp. 177–217.
- Knight H. Calcium signaling during abiotic stresses in plants. *Crit Rev Cytol* 2000 ; 195 : 269-325.
- Kölliker R, Stadelmann FJ, Reidy B, Nösberger J (1999). Genetic variability of forage grass cultivars: A comparison of *Festuca pratensis* Huds., *Lolium perenne* L. and *Dactylis glomerata* L.
- Koocheki AR, Yazdanebas A, Nikkhah HR (2006). Effects of terminal drought on grain yield and some morphological traits in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Iran J Agric Sci*. 8: 14-29.
- Kramer P. Drought, stress, and the origin of adaptations. In : Turner NC, Kramer PJ, eds. *Adaptations of Plants to Water and High Temperature Stress*. New York : Academic Press, 1980 : 7-20.

Kreps, J.A, Y.J. WU., H.S. CHANG., T. ZHU., X. WANG & J.F. HARPER -2002- Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiology* 130: 2129-2141

Kumar, V., V. Shriram., T.D. Nikam., N. Jawali & M.G. Shitole -2009- Antioxidant enzyme activities and protein profiling under salt stress in indica rice genotypes differing in salt tolerance. *Archives of Agronomy and Soil Science* 55(4): 379-394.

L

Ladizinsky G, Hymowitz T. 1979. Seed protein electrophoresis in taxonomic and evolutionary studies. *Theor. App. Genet* 54: 145-151.

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

Landberg T and M Greger (2002). "Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*." *Journal of Plant Physiology* 159(1): 69-75.

Lanfermeijer FC, Koerselman-Kooij JW, Borstlap AC (1990) Changing kinetics of valine uptake by immature pea cotyledons during development: an unsaturable pathway is supplemented by a saturable system. *Planta* 181: 576-582

Lappartient AG and B Touraine (1996). "Demand-Driven Control of Root ATP Sulfurylase Activity and SO₄²⁻ Uptake in Intact Canola (The Role of Phloem-Translocated Glutathione)." *Plant Physiology* 111(1): 147-157.

Last L., Widmer F., Fjellstad W., Stoyanova S. & Kölliker R., 2013. Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe. *BMC Genetics* 14, 102.

Lauriano JA, lidon FC, Campos PS, CA C, Do Ceu Matos M. Drought effect on cell membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica* 2000 ; 32 : 7-12.

Laval-Martin.D et Mazliak.P., 1995. *Physiologie végétale I : Nutrition et métabolisme. Collection Methodes* : 510-526.

Lee JM, Li J, Johnson DA, Stein TD, Kraft AD, Calkins MJ, Jakel RJ, Johnson JA. Nrf2, a multi-organ protector? *Faseb J.* 2005;19:1061–1066.

Lefort-Buson M, Rodolphe F, charcosset A ; de nouvelles perspectives pour l'analyse génétique des caractères quantitatifs. *Biofutur (paris)*, n°92, 1990, p 42-47

Leprince O, Hendry GAF, Mckersie BD. 1993. The mechanism of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3, 231–246.

Lesins K, Lesins I (1979) Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxonomic study., Junk, The Hague, Netherlands.,

- Levitt J. Responses of plants to environmental stresses. In : Water, radiation, salt and others stresses, Vol I. New York, USA. 1980 : 395-434.
- Lévy, J., Bres, C., Geurts, R. et al. (2004) A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science*, 303, 1361–1364.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., et al. (1000 Genome Project Data Processing Subgroup). 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* (Oxford, England) 25: 2078–2079
- Li Z-Y, Chen S-Y (2001) Isolation, characterization and chromosomal location of a novel zinc-finger protein gene that is down-regulated by salt stress. *Theor Appl Genet* 102: 363-368
- Lima AL, DaMatta FM, Pinheiro HA, Totola MR, Loureiro ME (2002) Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environ. Exp. Bot.* 47:239-247.
- Link J, Graeff S, Batchelor WD, Claupein W (2006) Evaluating the economic and environmental impact of environmental compensation payment policy under uniform and variable-rate nitrogen management. *Agricultural Systems* 91: 135-153
- Liu X, Kasuga M, Sakuma Y, et al. Two transcription factors DREB1 and DREB2, with EREB/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low- temperature-responsive gene expression, respectively. *Arabidopsis Plant Cell* 1998 ; 10 : 1391-406.
- Liu, J., Ishitani, M., Halfter, U., Kim, C.-S. and Zhu, J.-K. (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3730-3734.
- Lopez, F.B.; Johansen, C.; Chauhan, Y.S. Effect of timing of drought stress on phenology, yield and yield components of a short-duration pigeon pea. *Journal of Agronomy & Crop Science*, v.177, p.311-320, 1996
- Loudet O, Saliba-Colombani V, Camilleri C, Calenge F, Gaudon V, Koprivova A, North KA, Kopriva S, Daniel-Vedele F (2007) Natural variation for sulfate content in *Arabidopsis* is highly controlled by APR2. *Nature Genetics* 39: 896-900
- Low PS and JR Merida (1996). "The oxidative burst in plant defense: Function and signal transduction." *Physiologia Plantarum* 96(3): 533-542.
- Ludlow MM, Muchow R. A critical evaluation of traits for improving crop yields in water limited environments. *Adv Agron* 1990 ; 43 : 107-53.

M

- Maas EV, Grattan SR (1999). Crop yields affected by salinity. Agricultural Drainage, Agronomy Monograph No. 38. Soil Science Society of America, Madison, WI. pp. 55-108.
- Maccaferri M, Sanguineti MC, Donini P, Tuberosa R. 2003 Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theor Appl Genet* 107: 783–797.
- Madhusudhan KV, Giridarakumar S, Ranganaykulu GS, Reddy PC, Sudhakar C. Effect of water stress on some physiological responses in two groundnut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with contrasting drought tolerance. *J Plant Biology* 2002 ; 29 : 199-202.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269, 554–558
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994). A two component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242–245.
- Magneschi L, Perata P (2009) Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. *Ann Bot (Lond)* 103: 181-196
- Maiti, R. K., L. E. D. Amaya, S. I. Cardona, A. M. O. Dimas, M. De La Rosa Ibarra and H. D.
- Malik MFA, Qureshi AS, Ashraf M, Khan MR, Javed A. 2009. Evaluation of genetic diversity in soybean (*Glycine max*). lines using seed protein. Electrophoresis. *Australian Journal of Crop Science* 3:107-112.
- Manifesto, M.M., A.R. Schlatter, H.E. Hopp, E.Y. Suarez and J. Dubcovsky, 1999. bread wheat (*triticum aestivum*) fingerprinting using microsatellites. Proceedings of the Plant and Animal Genome VI, Conference, Jan. 17-21, Town and Country Hotel, San Diego, California.
- Marcotte, W.R., Jr., Russell, S.H., and Quatrano, R.S. (1989). Abscisic acid response sequences from the Em gene of wheat. *Plant Cell* 1, 969-976.
- Marrs KA (1996). "The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants " *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47(1): 127-158.
- Matos AR, D'Arcy-Lameta A, França M, et al. A novel patatin-like gene stimulated by drought stress encodes a galactolipid hydrolase. *FEBS let* 2001 ; 491 : 188-92.
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8271–8276
- May M, T Vernoux, C Leaver, M Van Montagu and D Inze (1998). "Review article. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development." *Journal of Experimental Botany* 49(321): 649-667.
- Mehlhorn H, M Lelandais, HG Korth and CH Foyer (1996). "Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases." *FEBS Letters* 378(3): 203-206.
- Merril, C. R. (1990). Silver staining of proteins and DNA. *Nature* 343, 779-780.

- Mezni M, Albouchi A, Bizid E, Hamza M. 2010 : Minerals uptake, organic osmotica contents and water balance in alfalfa under salt stress. *J Phytol*; 01–12
- Mhadhbi, H., M. Jebara, A. Zitoun, F. Limam, and M. E. Aouani, 2008: Symbiotic effectiveness and response to mannitol mediated osmotic stress of various chickpea-rhizobia associations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1027–1035
- Mhadhbi, H., M. Jebara, F. Limam, and M. E. Aouani, 2004: Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chick pea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 717–722.
- Mhadhbi H., Fotopoulos V., Djebali N., Polidoros A. N. Aouani M. E., 2009. Behaviours of *Medicago truncatula*–*Sinorhizobium meliloti* Symbioses Under Osmotic Stress in Relation with the Symbiotic Partner Input: Effects on Nodule Functioning and Protection. *J. Agronomy & Crop Science*; 195, 225-231.
- Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F. & Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of Experimental Botany*, 61, 15, 4197-4220, ISSN 1460-2431
- Mhameed S., Sharon D., Kaufman D., Lahav E., Hillel J., Degani C., Lavi U. (1997) Genetic relationships within avocado (*Persea americana* Mill) cultivars and between *Persea* species.
- Michaud, R., Lehmen, W.F. and Rumbaugh, M.D. (1988) World distribution and historical development. In A.A. Hanson, D.K. Barnes, and R.R. Hill (eds) *Alfalfa and alfalfa improvement*, pp.25±91. American Society Agronomy, Madison, WI.
- Mika A, F Minibayeva, R Beckett and S Lüthje (2004). "Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species." *Phytochemistry Reviews* 3(1): 173-193.
- Miller GE, Chen E, Zhou ES. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull.* 2007;133:25–45
- Minati S, Johnson-Flanagan A (1998) Co-ordination of photosynthetic gene expression during low-temperature acclimation and development in *Brassica napus* cv. Jet Neuf leaves. *Plant Sci* 135: 171-181
- Mittler R (2002). "Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance." *Trends in Plant Science* 7(9): 405-410.
- Mittova V., Tal M., Volokita M., Guy M. (2002): Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. *Physiol. Plant.*, 115: 393–400
- Monneveux.D., 1997. La génétique face au problème de la tolérance des plantes cultivées à la sécheresse. *Espoir et difficultés. Cahiers : sécheresse*, vol.8, n°01, pp 29-37.
- Moran, M.S, Clarke, T.R, Kustas, WP, Wertz, MA and Amer, SA. (1994). Evaluation of hydrologic parameters in semiarid rangeland using remotely sensed spectral data, *Water Resour. Res.*, 30: 1287-1297.

Morgan J, Condon A. Water use, grain yield and osmoregulation in wheat. *Aust J Plant Physiol* 1986 ; 13 : 523-32.

Mundy, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Chua, N.-H. (1990). Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *reb* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87,1406-1410.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, 25(2), 239-250.

N

Najimi, B., El Jaafari, S., Jlibène, M. and Jacquemin, J.M. 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 7(1): 17–5.

Navas P, Villalba JM, Cordoba F.1994. Ascorbate function at the plasma membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* 1197,1–13.

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 70: 3321-3323.

Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Nat. Acad. Sci* 70: 3321-3323.

Nickel, R.S., and Cunningham, B.A. 1969. Improved peroxidase assay method using leuco 2, 3', 6 trichloroendophenol and application to comparative measurements of peroxidase catalysis. *Annals of Biochemistry* 27:292-299

Noctor G (2006). "Metabolic signalling in defence and stress: the central roles of soluble redox couples." *Plant, Cell and Environment* 29: 409-425.

Noctor G, Arisi ACM, Jouanin L, Kunert KJ, Rennenberg H, Foyer CH. Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *J Exp Bot.* 1998;49:623–647.

O

Ourry, A., T.H. Kim, and J. Boucaud. 1994. Nitrogen reserve mobilization during regrowth of *Medicago sativa* L. (Relationships between availability and regrowth yield). *Plant Physiol.* 105:831–837.

P

- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., Giraudat, J. (1994) Regulation of gene expression programs during Arabidopsis seed development: roles of the ABI locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell*, 6, 1567–82.
- Pareek A & S.L. Singla Grover A -1997- Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Annals of Botany* 80:629-639
- Pareek A, Singla SL, Grover A (1997). Short-term salinity and high temperature stress-associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oryza sativa* L. *Annals of Botany*. 80: 629-639
- PASSIOURA JB. Grain yield, harvest index and water use of wheat. *J Aust Agric Sci* 1977 ; 43 : 117-20.
- Passioura JB. The yield of crops in relation to drought. In : Boote KJ, et al., eds. *Physiology and Determination of Crop Yield*. Madison, WI, USA : Crop Science Society of America, 1994 : 343-59.
- Peakall, R., Gilmore, S., Keys, W., Morgante, M., Rafalski, A., 1998: Cross-species amplification of Soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: Implications for the transferability of SSRs in plants. *Mol. Boil. Evol.* 15, 1275–1287.
- Penmetsa R.V & D. Cook -1997- A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 275:527-530.
- Penmetsa RV, Cook D (1997). A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science*. 275: 527-530.
- Perret X, Staehelin C Broughton WJ (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 180–201.
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W.J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:, 180–201.
- Peter-Schmid M., Boller B. & Kölliker R., 2008. Habitat and management affect genetic structure of *Festuca pratensis* but not *Lolium multiflorum* ecotype populations. *Plant Breeding* 127 (5), 510–517
- Piatkowski D, Schneider K, Salamini F, Bartels D (1990) Characterization of Five Abscisic Acid-Responsive cDNA Clones Isolated from the Desiccation-Tolerant Plant *Cratogeomys plantagineum* and Their Relationship to Other Water-Stress Genes. *Plant Physiol* 94: 1682-1688
- Pignocchi C and CH Foyer (2003). "Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling." *Current Opinion in Plant Biology* 6(4): 379-389.

Pignocchi C and CH Foyer (2003). "Apoplastic ascorbate metabolism and its role in the regulation of cell signalling." *Current Opinion in Plant Biology* 6(4): 379-389.

Polidoros AN, Mylona PV, Pasentsis K, Scandalios JG, Tsaftaris AS (2005) The maize alternative oxidase 1a (Aox1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox Rep* 10: 71-78

Potters G, L De Gara, H Asard and N Horemans (2002). "Ascorbate and glutathione: guardians of the

Powell, W., Machray, G.C., and Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1: 215-222.

Prado, F.E., C. Boero., M. Gallardo & J.A. Gonzales -2000- Effect of NaCl on germination, growth and soluble sugar content in *Chenopodium quinoa* Willd. Seeds. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 41: 27-34.

Price GD, Yu J-W, von Caemmerer S, Evans JR, Chow WS, Anderson JM, Hurry V, Badger MR (1995) Chloroplast cytochrome b6/f and ATP synthase complexes in tobacco: transformation with antisense RNA against nuclear-encoded transcripts for the Rieske FeS and ATPd polypeptides. *Aust J Plant Physiol* 22:285-297.

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

R

Radi AA, Farghaly FA, Hamada AM (2013). Physiological and biochemical responses of salt-tolerant and salt-sensitive wheat and bean cultivars to salinity. *J. Biol. Earth Sci.* 3:B72-B88

Rahman MA, Zaher M, Mazid MA, Haque MZ, Mahata SC (1996). Replacement of costly fish meal by silkworm pupae in diet of mirror carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pakistan J. Sci. Ind. Res.* 39: 64-67.

Ramanjulu S, Bartels D (2002) Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ* 25: 141-151

Ramsay L, Macaulay M, degli Ivanissevich S, MacLean K, Cardle L, Fuller J, et al. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 2000;156:1997-2005.

Reyes JC, Muro-Pastor MI, Florencio FJ (2004). The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology.* 134: 1718-1732.

Rhee IK, van Rijn RM, Verpoorte R 2003. Qualitative determination of false-positive in the acetylcholinesterase assay using thin layer chromatography. *Phytochem Anal* 14: 127-131.

Rochat C, Boutin JP (1991) Metabolism of phloem-borne amino acids in maternal tissues of fruit of nodulated or nitrate fed pea plants (*Pisum sativum* L.). *Journal of Experimental Botany* 42: 207-214

Röder MS, Plaschke J, König SU, Börner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW (1995) Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet* 246:327–333

Rodrigues-Quijano M, Nieto-Taladriz MT, Gomez M, Carrillo JM. 2001. Quality influence of some HMW gluteini subunits X and Y type coded by Glu-D1 locus *pruc*. 6th Int 1 Wheat Con. 5-9 June, Budapest, Hungary, p 26.

Roy-Macauley H, Zuily-Fodil Y, Kidric M, Pham Thi AT, Viera DA Silva JB. Effect of water stress on proteolytic activities of cell compartments of *Phaseolus* and *Vigna* leaves from sensitive and resistant plants. *Physiol Plant* 1992 ; 85 : 90-6.

Romero- Aranda, R., Soria, T., Cuartero, J., (2001). 71 *International Journal of Research in Plant Science* 2013; 3(4): 68-71 *Plant Science.*, 60, 265-272

Russelle M (2001) Alfalfa. *Am Sci* 89: 252-259

S

Sabbah S., Raise M., and Tal M., 1995. Methylation of DNA in NaCl adapted cells of potato. *Plant Cell Rep.* 14: 467–470.

SAHSAH Y, CAMPOS P, GAREIL M, ZUILY-FODIL Y, PHAM THI AT. Enzymatic degradation of polar lipids in *Vigna unguiculata* leaves and influence of drought stress. *Physiol Plant* 1998 ; 104 : 557-86.

Sanhewe AJ, Ellis RH, Hong TD, Wheeler TR, Batts GR, Hadley P, Morison JIL (1996). The effect of temperature and CO₂ on seed quality development in wheat (*Triticum aestivum* L.) *Journal of Experimental Botany.* 47: 631-637.

Santoni V, Kieffer S, Desclaux D, Masson F, Rabilloud T. 2000. Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties. *Electrophoresis* 21, 3329–3344.

Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53: 1351–1365

Senior ML, JP Murphy, MM Goodman, and CW Stuber. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. *Crop Sci.* 38:1088–1098.

Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Mol Biol* 69: 463-472

Shalata A, Mittova V, Volokita M, Guy M, Tal M. 2001. Response of cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennelli* to salt-dependent oxidative stress: the root antioxidative system. *Physiologia Plantarum* 122, 487-494

Shepherd KW. 1968. Chromosomal control of endosperm protein in wheat and rye. Third inter. genet. Symp, London. 86-96.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular response to dehydration and low temperature: Differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2000 ; 3 : 217-23.

Shirokova, Y., Forkutsa, I., Sharafutdinova, N. 2000. Use of electrical conductivity instead of soluble salts for soil salinity monitoring in Central Asia. *Irrigation Drainage System*, 14: 199-205.

Sies H (1997). "Oxidative stress: oxidants and antioxidants." *Experimental Physiology* 82(2): 291-295.

Silbergeld E, M Waalkes and J Rice (2000). "Lead as a carcinogen: Experimental evidence and mechanisms of action." *American Journal of Industrial Medicine* 38(3): 316-323.

Singh P, Singh U, Eggum BO, Kumar KA, Andrews DJ (1987). Nutritional evaluation of high protein genotypes of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). *J. Sci. Food Agric.* 38: 41-48.

Singh P., U. Singh., B.O. Eggum., K.A. Kumar & D.J Andrews -1987- Nutritional evaluation of high protein genotypes of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 38:41-48.

Singh. N. K., Braker. C. A, Hasegawa. P. M, Handa. A. K, Brukel. S, Hermodsson. M. A, Pfankoch. E, Regnier. F. E, Bressan. R. A.,1987. Characterisation of osmotin. *Plant physiology.* 85 : 529-536.

Skriver K, Mundy J (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512

Smith JSC, EC Chin, H Shu, OS Smith, SJ Wall, ML Senior, SE Mitchell, S Kresovich and J Ziegler. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparisons with data from RFLPS and pedigree. *Theor. Appl. Genet.* 95: 163-173.

Snapp SS, Shenman C (1992). Effects of salinity on root growth and death dynamics of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Newphytol.* 121: 71-77.

Soeda Y, Konings MC, Vorst O, van Houwelingen AM, Stoopen GM, Maliepaard CA, Kodde J, Bino RJ, Groot SP, van der Geest AH (2005) Gene expression programs during Brassica oleracea seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol* 137: 354-368

Spaink HP (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 257-288.

Spaink, H.P -2000- Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *The Annual Review of Microbiology.* 54:257-288.

Spencer V. A., Davie J. R. 1999. Role of covalent modifications of histones in regulating gene expression. *Gene* 240: 112.

Stanton, M.L., 2003. Interacting guilds: moving beyond the pairwise perspective on mutualisms. *The American Naturalist* 162, 10-23.

Stockwell CA, Hendry AP, and Kinnison MT. 2003. Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends Ecol Evol* 18: 94–101

Subbarao GV, Johansen C, Slinkard AE, Nagewara Rao RC, Saxena NP, Chauhan YS. Strategies for improving drought resistance in grain legume. *Crit Rev Plant Sci* 1995 ; 14 : 469-523.

T

Taffouo, V.D., N.L. Djiotie, M. Kenne, N. Din, J.R. Priso, S. Dibong and A. Akoa, 2008. Effects on salt stress on physiological and agronomic characteristics of three tropical cucurbit species. *J. Applied Biosci.*, 10: 434-441.

Takezaki N & Nei M. (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144

Thomashow M. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Plant Mol Biol* 1999 ; 50 : 605-17.

Tolter D, Hinch DK, Macherel D (2010). A mitochondrial late embryogenesis abundant protein stabilizes model membranes in the dry state. *BBA Biomembranes*. 1798: 1926-33.

Toon PG, Haines RJ, Dieters MJ (1990). Relationship between seed weight, germination and seedling-height growth in *Pinus caribae*. Morele. var. *hondurensis* barre and Golfri. *Seed Sci. Technol.* 19 : 389-402.

Tsai CY (1979) Tissue-specific zein synthesis in maize kernel. *Biochem Genet* 17: 1109- 1119

Tseng M.J., Liu C.W., Yiu J.C. (2007): Enhanced tolerance to sulfur dioxide and salt stress of transgenic Chinese cabbage plants expressing both superoxide dismutase and catalase in chloroplasts. *Plant Physiol. Biochem.*, 45: 1–12.

Turcsanyi E, Lyons T, Plöchl M and Barnes J (2000). "Does ascorbate in the mesophyll cell walls form the first line of defence against ozone? Testing the concept using broad bean *Vicia faba* L." *Journal of Experimental Botany* 51: 901-910.

Turk.N, Gallardo.K, Job.C, Job.D., 2002. L'intérêt de l'analyse protéomique des graines d'*Arabidopsis thaliana* pour la compréhension du processus de germination. Congrès de la SFEAP, 16, 17,18 Octobre 2002, Lille. p : 6.

Turner NC, Jones MM. Turgor maintenance by osmotic adjustment : A review and evaluation. In : Turner NC, Kramer PJ, eds. *Adaptation of Plants to Water and High temperatures Stress*. New York, USA : Wiley, 1980 : 87-103.

Turner NC, Wright GC, Siddique KHM. Adaptation of grain legume to water-limited environments. *Adv Agron* 2001 ; 71 : 193-231.

Turner NC. Adaptation to water deficit: a changing perspective. *Aust J Plant Physiol* 1986 ; 13 : 175-90.

Turner NC. Drought resistance: A comparison of two frameworks. In : Saxena NP, et al., eds. Management of Agricultural Drought: Agronomic and Genetic Options. New Delhi, Inde : Oxford IBH, 2000 : 5-12.

Turner NC. Further progress in crop water relations. Adv Agron 1997 ; 58 : 293-338.

U

Udupa SM, Robertson, LD, Weigand F, Baum M, Kahl G (1999). Allelic Variation at (TAA) Microsatellite Loci in a World Collection of Chickpea (*Cicer arietinum* L) Germplasm. Molecular Genetics and Genomics. 261: 354-363.

Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell 11: 1743–1754

Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993) An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene products binds to the conserved MYB recognition sequence. Plant Cell 5: 1529-1539

V

Valero Galvan J, Valledor L, Navarro Cerrillo RM, Gil Pelegrin E, Jorriñ-Novo JV. 2011. Studies of variability in Holm oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota* [Desf.] Samp.) through acorn protein profile analysis. Journal of Proteomics 74(8): 1244-1255. DOI:10.1016/j.jprot.2011.05.003

Vandermeer J., Noordwijk M.van, Anderson J., Chin Ong, Perfecto I. 1998. Global change and multi-species agroecosystems. Concepts and issues. Agriculture, Ecosystems and Environment 67: 1-22

Vasquez-Tello A, ZUILY-FODIL Y, PHAM THI AT, VIEIRA DA SILVA JB. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological tests for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species. J Exp Bot 1990 ; 41 : 827-32.

Vigil EL, Fang TK (1995a) Comparative biochemical and morphological changes in imbibed cotton seed hypocotyls and radicles in situ and in vitro. Protein breakdown and elongation growth. Seed Science Research 5: 41-51

Vigil EL, Fang TK (1995b) Protease activities and elongation growth of excised cotton seed axes during the first 24 hours of imbibition. Seed Science Research 5: 201-207

W

Waldron C, Wegrich LM, Merlo PAO, Walsh TA. 1993. Characterization of genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. Plant Molecular Biology. 23: 801–12.

Wang W, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 2003 ; 218 : 1-14.

Ware D, Jaiswal P, Ni J, Pan X, Chang K, Clark K, Teytelman L, Schmidt S, Zhao W, Cartinhour S et al. (2002) Gramene: a resource for comparative grass genomics. *Nucleic Acids Res* 30: 103–105

Wei T, O'Connell MA. 1996. Structure and characterization of a putative drought-induced H1 histone gene. *Plant Molecular Biology* 30, 255–68.

Weir BS. 1996. Genetic data analysis II. 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA. Massachusetts, USA.

Werner JE, Finkelstein RR (1995). Arabidopsis mutants with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol Plant* 93(4):659-666.

Werner JE, Finkelstein RR (1995). Arabidopsis mutant with reduced response to NaCl and osmotic stress. *Physiol. Plant.* 93: 659–666.

Westman, A. L. and Kresovich, S. (1997). Use of molecular marker techniques for description of plant genetic variation. In: Callow, J.A., Ford-Lloyd, J.A. and Newbury, H.J (eds) *Biotechnology and Plant Genetic Resources: Conservation and Use*, pp. 9–48. CAB International, Oxford, UK.

Winicov II, Bastola DR (1999) Transgenic overexpression of the transcription factor alfin1 enhances expression of the endogenous MsPRP2 gene in alfalfa and improves salinity tolerance of the plants. *Plant Physiol* 120: 473-80

Wingate VPM, MA Lawton and CJ Lamb (1988). "Glutathione Causes a Massive and Selective Induction of Plant Defense Genes." *Plant Physiology* 87(1): 206-210.

Wojtaszek P (1997). "Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection." *Biochem Journal* 322(3): 681-692.

X

Xiong L, ZHU J. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 2002 ; 25 : 131-9.

Y

Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Development of drought-resistant and water stress-tolerant crops through biotechnology. In : JIRCAS, ed. *Proceedings of the 8th JIRCAS International Symposium, Water for Sustainable Agriculture in Developing Regions : More Crop for Every Scarce Drop*. Tsukuba, 27-28 November 2001. 2002 : 23-34.

Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low temperature or high salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264

Yeo, A.R. and T.J. Flowers. 1986. Salinity resistance in rice (*Oryza sativa* L.) and a pyramiding approach to breeding varieties for saline soils. In: Effect of drought on plant growth. Salts in soils. N. C. Turner and J. B. Passioura (Eds.). CSIRO. Melbourne. Australia, pp. 161-173.

Yeo, A.R., M.E. Yeo., S.A. Flowers and T.J. Flowers. 1990. Screening of rice (*Oryza sativa* L.) genotypes for physiological characters contributing to salinity resistance, and their relationship to overall performance. *Theoretical and Applied Genetics*. 79:377-384.

Yoshida R. Umezawa T. Mizoguchi T. Takahashi S. Takahashi F. Schinozaki K. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates ABA and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*. 2006;281:5310–5318.

Young JC, et al. (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112(1):41-50

Young ND, Udvardi MK (2009). Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Current Opinion in Plant Biology*. 12(2):193-201.

Z

Zabalza A, Gaston S, Sandalio LM, del Río LA, Royuela M (2006) Oxidative stress is not related to the mode of action of herbicides that inhibit acetolactate synthase. *Environ Exp*

Zahaf O, Blanchet S, et al (2012). Comparative transcriptomic analysis of salt adaptation in roots of contrasting *Medicago truncatula* genotypes. *Mol Plant*. 5 (5): 1068-81.

Zahran, H.H. 1997. Diversity, adaptation and activity of the bacterial flora in saline environments. *Biol. Fertil. Soil*, 25: 211-223

Zhang J, Nguyen HT, Blum A (1999) Genetic analysis of osmotic adjustment in crop plants. *J Exp Bot* 50: 292–302

Zhao F, Zhang H (2006) Salt and paraquat stress tolerance results from co-expression of the *Suaeda salsa* glutathione S -transferase and catalase in transgenic rice. *Plant Cell Tiss Org* 86: 349 –358

Zhu X, Gong H, Chen G, Wang S, Zhang C. Different solute levels in two spring wheat cultivars induced by progressive field water stress at different developmental stages. *J Arid Environ* 2005;62:1–14.

Zhu, J.-K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Sci*. 6, 66-71

ANNEXE 1

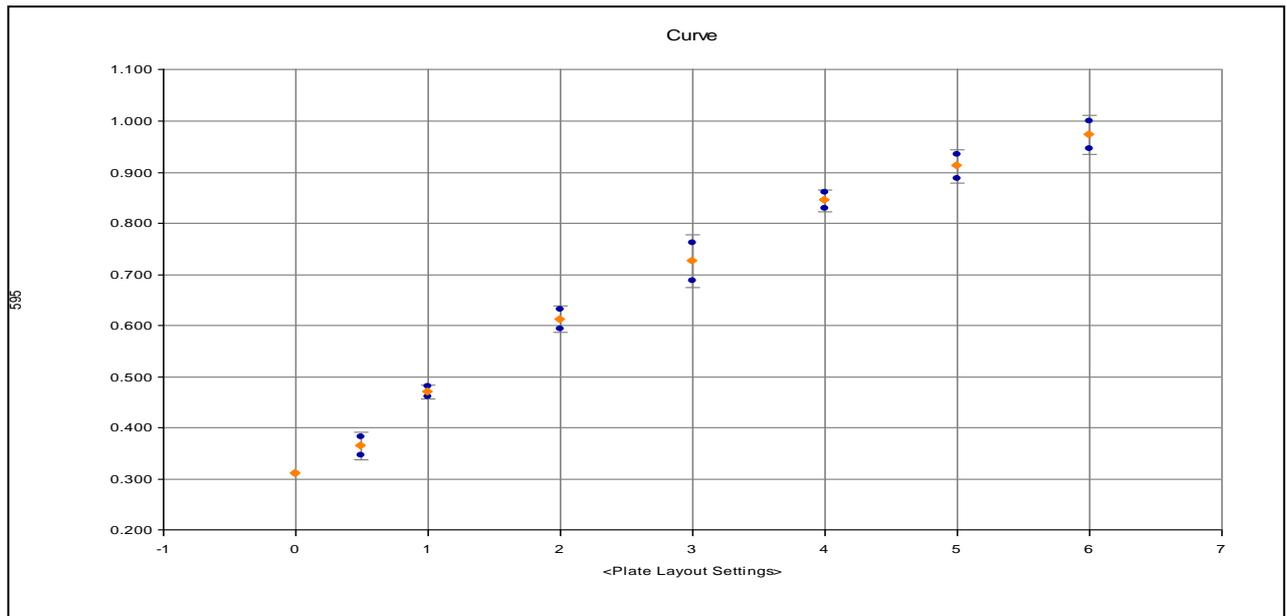


Fig 48 : Courbe d'étalon utilisée lors du dosage des protéines solubles

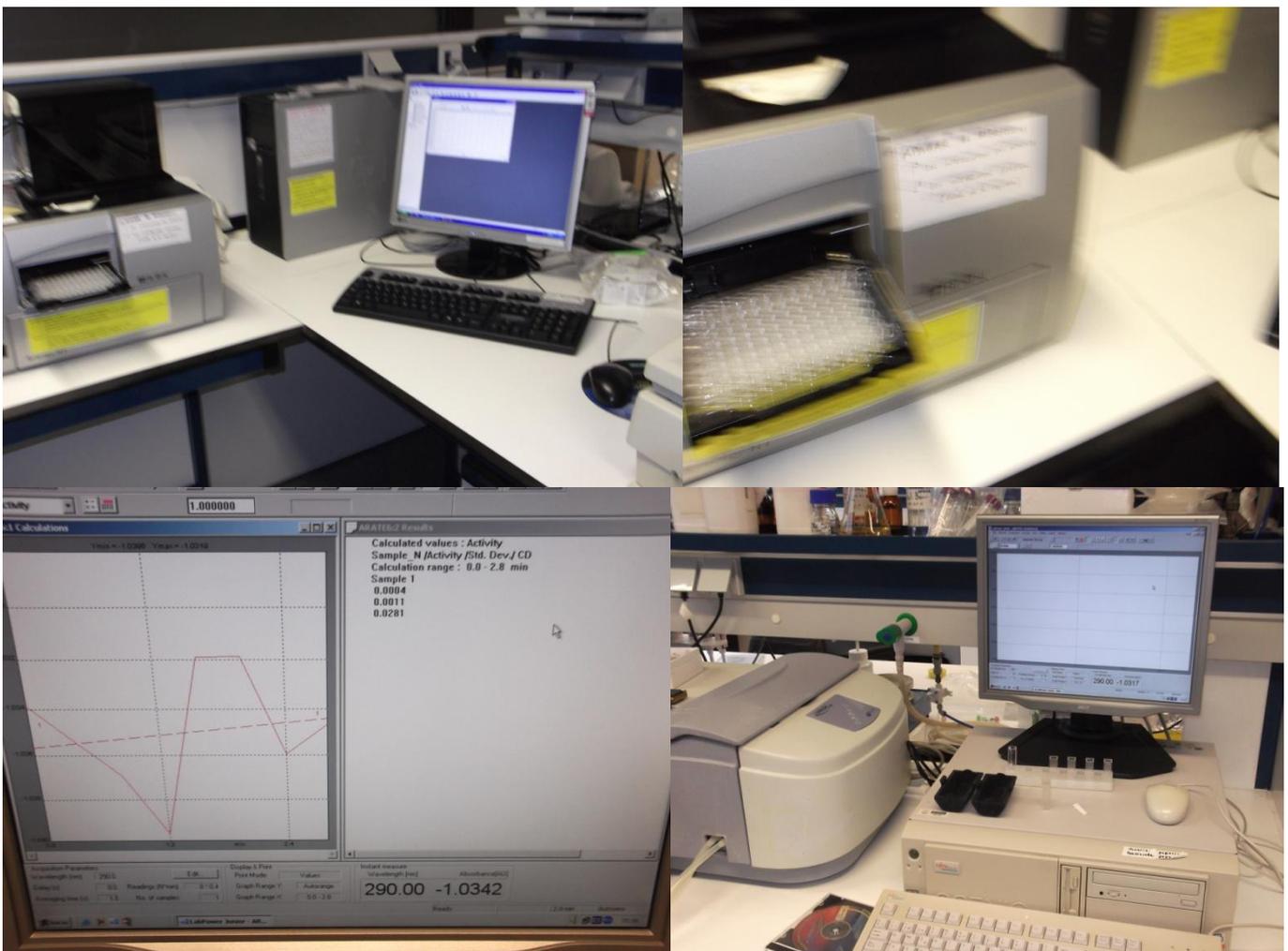


Fig 49 : Spectrophotomètre à UV visibles utilisé pour le dosage des protéines.

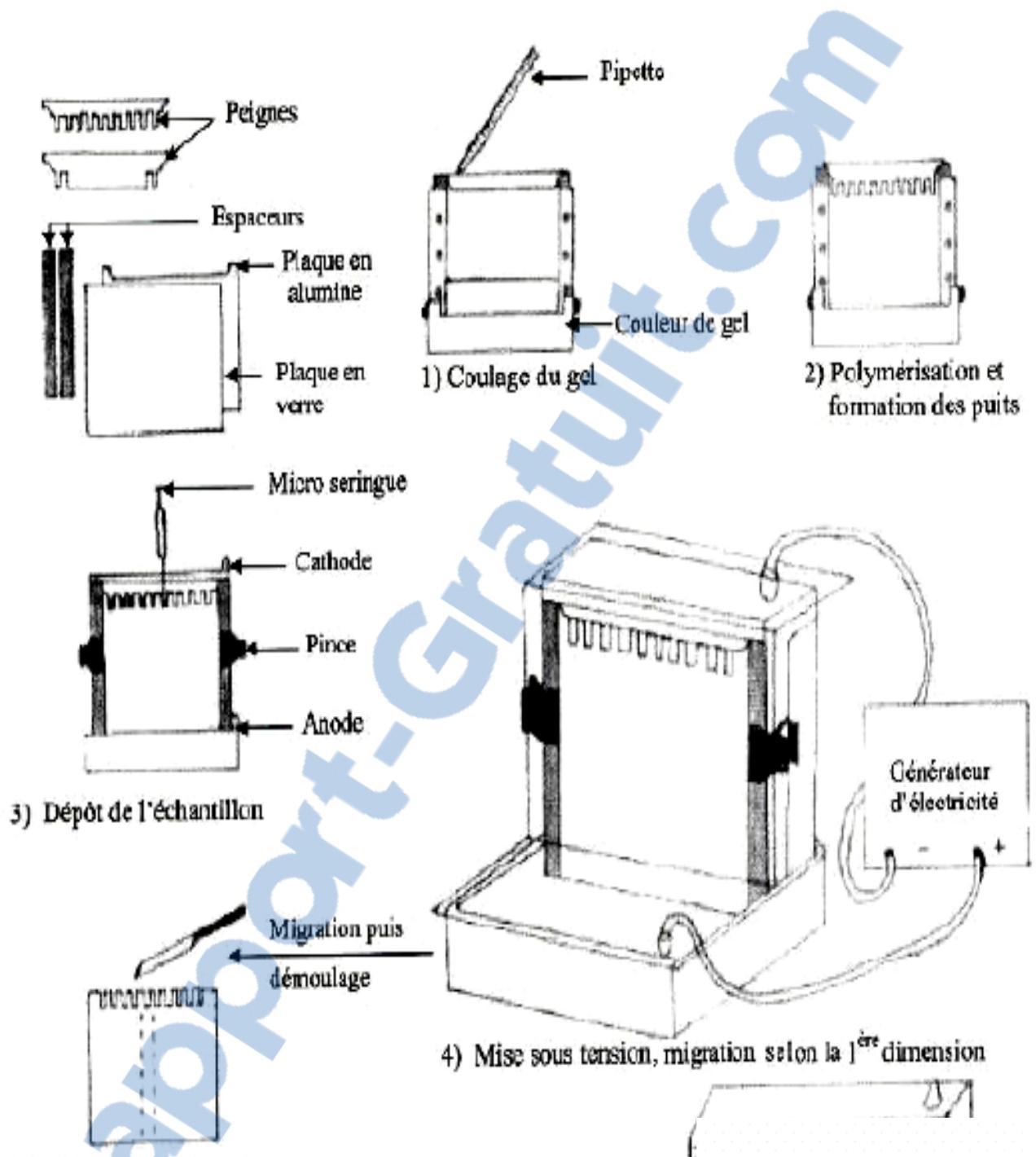


Fig 50 : Principales étapes de l'électrophorèse SDS-PAGE

Protocole d'extraction d'ADN

1. Chauffer le mortier et le pilon à 65 °C.
2. Chauffer la solution CTAB 2x jusqu'à 65 °C
3. Ecraser 20-30 mg de jeunes plants ou feuilles. Ensuite, ajouter 750 µl de la solution CTAB 2 x.
Continuer à broyer.
4. Ajouter encore 750 µl de la solution CTAB 2 x. Continuer à broyer.
5. Transférer le contenu dans un tube de 2 ml. Incubation à 65 °C durant 45 – 60 min. Adjuster le volume jusqu'à 1.5 ml par l'addition de la solution CTAB 2 x . Agiter en douceur , chaque 15-20 min.
6. Après incubation, ajouter 500 µl de chloroform:isoamyl alcohol . Agiter vigoureusement pendant 15 min.
7. Centrifuger à 13000 g durant 15 min (à température ambiante)
8. Prenez 1 ml de surnageant et le mettre dans un nouveau tube de 2 ml.
9. Ajouter 666 µl d'isopropanol et mélanger convenablement. Incubation à température ambiante durant 30 min. l'ADN précipite à cette étape.
10. Prélever l'ADN par centrifugation à 13000 g durant 10 min.
11. Récupérer le surnageant.
12. Laver le culot avec 1 ml d' éthanol à 70% durant minimum 5 min.
13. Centrifuger à 13000 g durant 5 min. récupérer le surnageant. Faites un autre lavage avec l' éthanol si le culot est de couleur foncé.
14. Sécher le culot d'ADN à température ambiante.
15. Dissoudre le culot d'ADN dans 100 µl du tampon TE 0.5 x durant une nuit à 4 °C.
16. Le lendemain, dissoudre le culot par de petites tapes.
17. Centrifuge r à 13000 g durant 5 min afin de collecter les débris.
18. Récupérer le surnageant et transférer vers un nouveau tube de 1.5 ml .
19. Etiqueter l'DNA avec un numéro et mentionner le tube comme "ADN Stock".

Test de qualité par l'électrophorèse en gel d'Agarose

1. Préparer les échantillons comme suit:

Component	Amount
DNA	5 μ l
Eau distillée stérile	5 μ l
Tampon de charge	3 μ l

2. Préparation du gel d'agarose

Prendre 0.6 g d'agarose, chauffer dans 60 ml de TBE 1X . Refroidir au dessous de 65 °C sous agitation.

3. Electrophorèse : Au début 60 V et après à 80V.

4. Coloration et visualisation sous UV.

Après électrophorèse, colorer le gel avec le BET (Bromure d'éthidium) durant 30 min, suivie d'un lavage avec de l'eau distillée durant 20 min. après prendre une photo en utilisant « Image Analyzer ».

Solution: 2 x CTAB buffer

Component	Concentration
Tris-HCl pH 8	100 mM
EDTA pH 8	20 mM
CTAB	2%
NaCL	1.4 M
B-mercaptoethanol*	0.2%
Sodium Sulphite*	0.2%
PVP*	0.5%

Tableau 21 : Résumé de résultats de 87 échantillons d'ADN à partir de jeunes plants de *M. truncatula*
« selon la figure 49 : Gel 1,2 et 3 »

Génotypes Numéro d'accession	Code	Position (Gel)	DNA	Génotypes Numéro d'accession	Code	Position (Gel)	DNA	Génotypes Numéro d'accession	Code	Position (Gel)	DNA
IG 53097 DZA	1.a	1	+	IG 53945 DZA	4.c	31	+	IG 53175 MAR	7.d	61	-
IG 53097 DZA	1.b	2	+	IG 53945 DZA	4.d	32	+	IG 53175 MAR	7.e	62	-
IG 53097 DZA	1.c	3	+	IG 53945 DZA	4.e	33	+	IG 53175 MAR	7.f	63	+/-
IG 530105 DZA	2.a	4	+	IG 53945 DZA	4.f	34	+	IG 53175 MAR	7.g	64	-
IG 530105 DZA	2.b	5	+	IG 53945 DZA	4.g	35	+	IG 53175 MAR	7.h	65	-
IG 530105 DZA	2.c	6	+	IG 53945 DZA	4.h	36	-	IG 53175 MAR	7.i	66	-
IG 53115 DZA	3.a	7	+	IG 53945 DZA	4.i	37	+	IG 53175 MAR	7.j	67	-
IG 53115 DZA	3.b	8	+	IG55917 SYR	5.a	38	+	IG 53939 TUN	8.a	68	+
IG 53115 DZA	3.c	9	+	IG55917 SYR	5.b	39	+/-	IG 53939 TUN	8.b	69	+
IG 53945 DZA	4.a	10	+	IG55917 SYR	5.c	40	+	IG 53939 TUN	8.c	70	+
IG 53945 DZA	4.b	11	+	IG55917 SYR	5.d	41	-	IG 53939 TUN	8.d	71	+
IG 53097 DZA	1.d	12	+/-	IG55917 SYR	5.e	42	+	IG 53939 TUN	8.e	72	+/-
IG 53097 DZA	1.e	13	-	IG55917 SYR	5.f	43	+	IG 53939 TUN	8.f	73	+
IG 53097 DZA	1.f	14	+	IG55917 SYR	5.g	44	+	IG 53939 TUN	8.g	74	+
IG 53097 DZA	1.g	15	+/-	IG55917 SYR	5.h	45*	+/-	IG 53939 TUN	8.h	75	+
IG 53097 DZA	1.h	16	+	IG55917 SYR	5.i	46	+/- -	IG 53939 TUN	8.i	76	+/- -
IG 530105 DZA	2.d	17	+/-	IG55917 SYR	5.j	47	+/- -	IG 53939 TUN	8.j	77	+/- -
IG 530105 DZA	2.e	18	-	IG 53965 LBN	6.a	48	+/- -	IG 53326 JOR	9.a	78	+
IG 530105 DZA	2.f	19*	+/-	IG 53965 LBN	6.b	49	+/-	IG 53326 JOR	9.b	79	+
IG 530105 DZA	2.g	20	+/-	IG 53965 LBN	6.c	50*	+	IG 53326 JOR	9.c	80	+/- -
IG 530105 DZA	2.h	21	+	IG 53965 LBN	6.d	51	+	IG 53326 JOR	9.d	81	+/-
IG 530105 DZA	2.i	22	+	IG 53965 LBN	6.e	52	+	IG 53326 JOR	9.e	82	+
IG 530105 DZA	2.j	23	+	IG 53965 LBN	6.f	53	+	IG 53326 JOR	9.f	83	+/-
IG 53115 DZA	3.d	24*	+/-	IG 53965 LBN	6.g	54	-	IG 53326 JOR	9.g	84	-
IG 53115 DZA	3.e	25	+/- -	IG 53965 LBN	6.h	55	-	IG 53326 JOR	9.h	85	-
IG 53115 DZA	3.f	26	+	IG 53965 LBN	6.i	56*	+	IG 53326 JOR	9.i	86	+
IG 53115 DZA	3.g	27	+	IG 53965 LBN	6.j	57	+/-	IG 53326 JOR	9.j	87	+
IG 53115 DZA	3.h	28	+	IG 53175 MAR	7.a	58	-	IG 53097 DZA	1.i	88	02 Ind missed
IG 53115 DZA	3.i	29	+	IG 53175 MAR	7.b	59	+/-	IG 53097 DZA	1.j	89	
IG 53115 DZA	3.j	30	+/- -	IG 53175 MAR	7.c	60	-	IG 53945 DZA	4.J	90	03 Ind missed

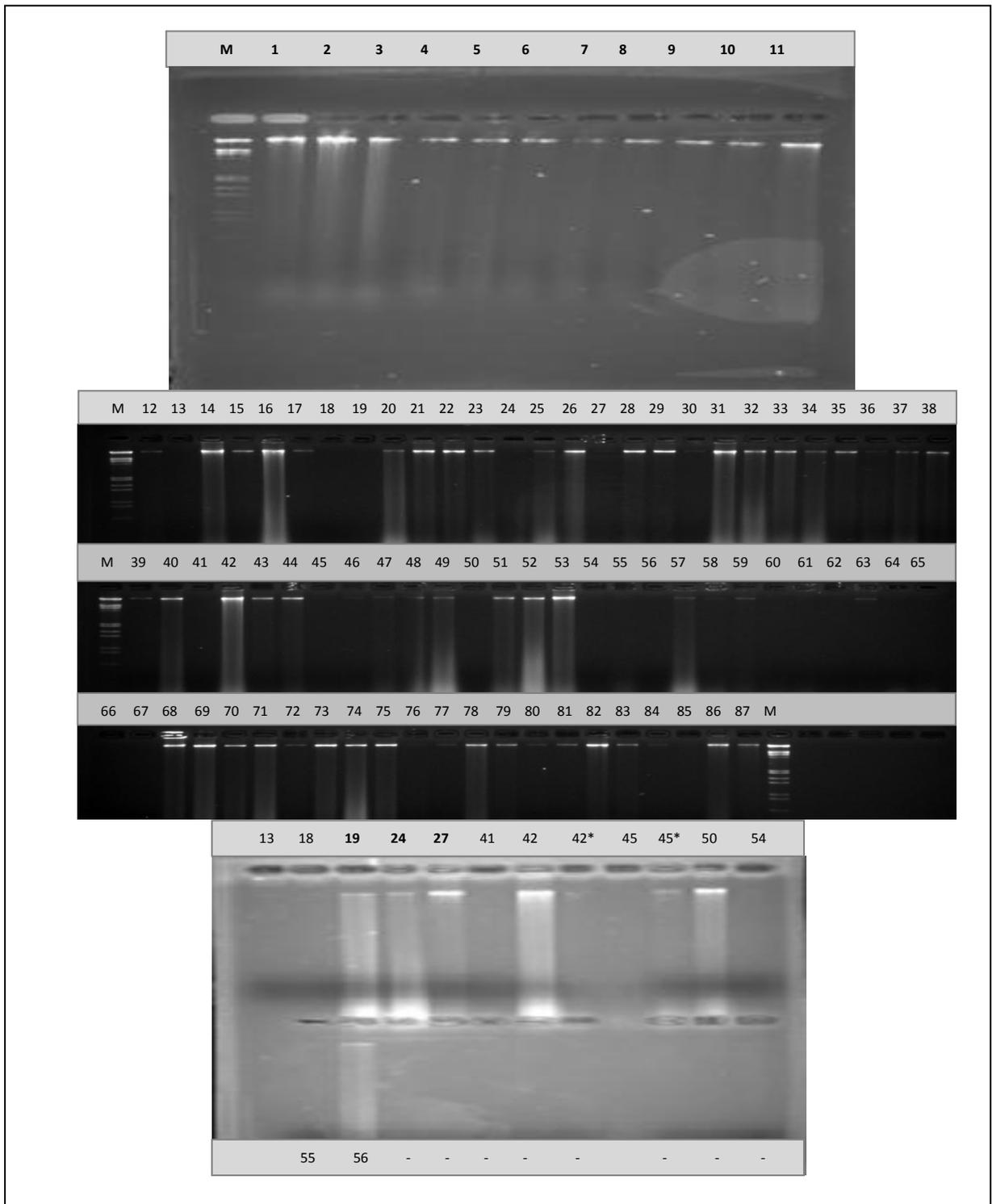


Figure 51 : Test de qualité d'ADN à partir de jeunes plants des différentes accessions de *Medicago truncatula*.

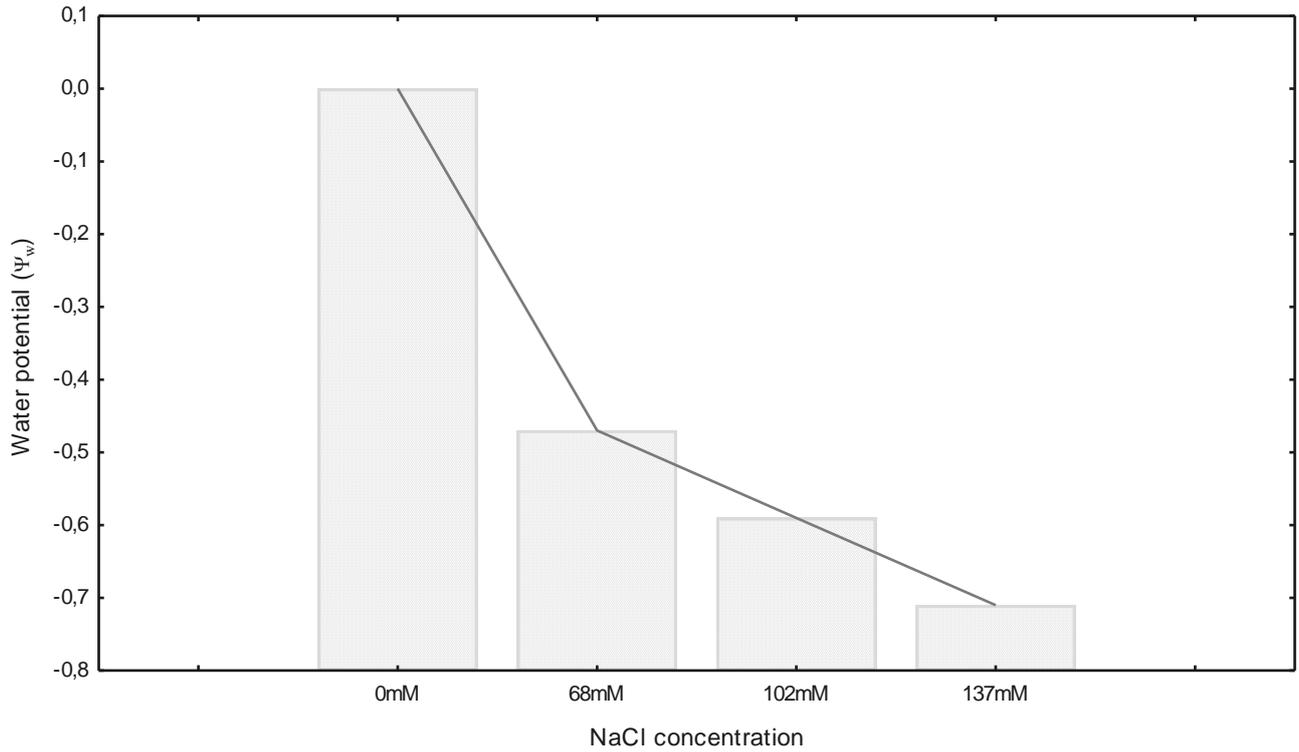


Fig 52 : Potentiel hydrique (Ψ_w) des différentes solutions d'NaCl employé pour imposer le stress hydrique sur les jeunes plants de *M. truncatula*

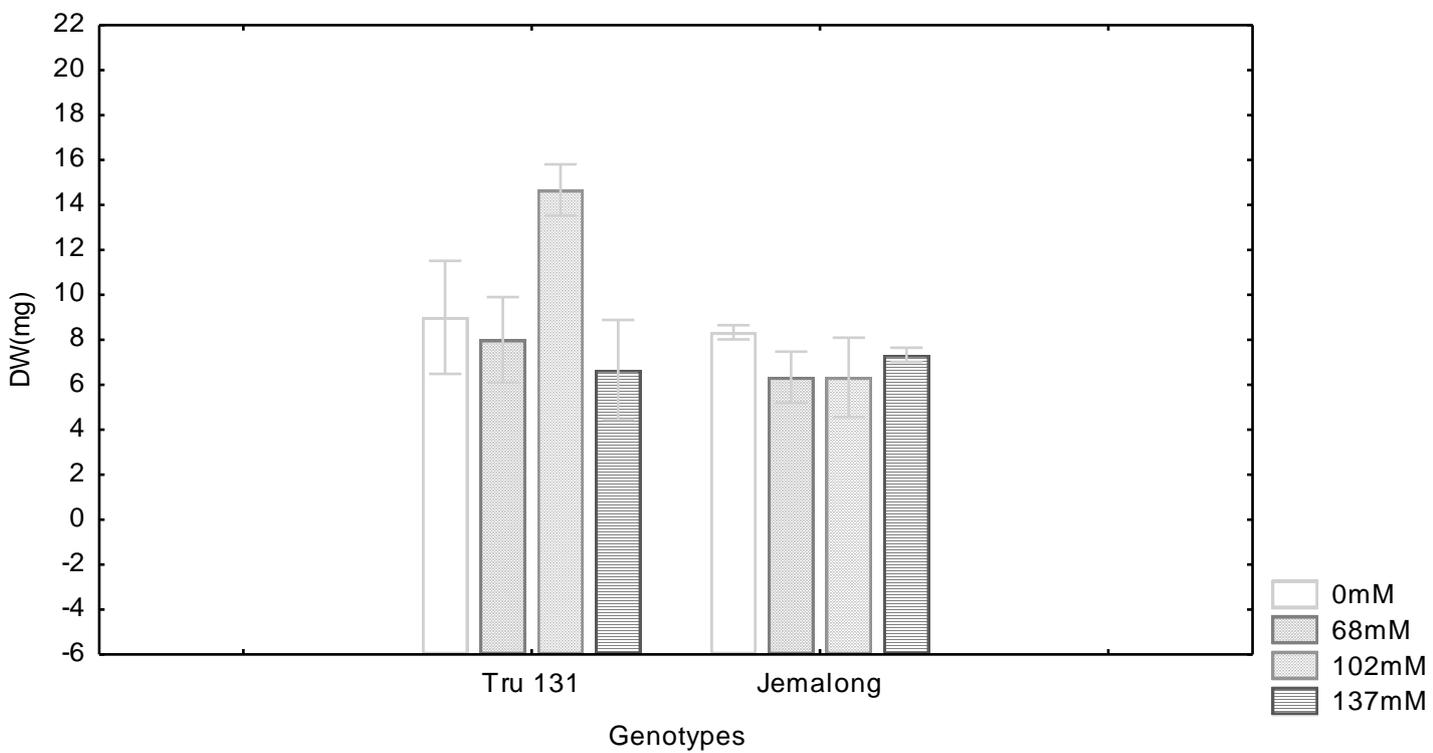


Fig 53 : Poids sec (matière sèche) des jeunes plants des deux génotypes de *M. truncatula* sous différents traitements de NaCl.

Tableau 22 : Concentrations de ASC, DHA, GSH, GSSG, (ASC+DHA) et (GSH+GSSG) Pools, ASC/ASC+DHA et GSH/GSH+GSSG Ratios au niveau racinaire chez les deux géotypes contrastés de *M. truncatula* sous différents traitements de NaCl.

Géotypes	NaCl mM	ASC mg/gDW	DHA mg/gDW	GSH mg/gDW	GSSG mg/gDW	ASC+DHA mg/gDW	GSH+GSSG mg/gDW	ASC/ ASC+DHA	GSH/ GSH+GSSG
T131 (T)	0	0±0	5,81±0,57	0,65±0,41	0,63±0,33	5,81±0,57	1,28±0,49	0±0	0,55±0,29
	68	1,35±1,35	5,22±1,10	1,12±0,85	1,90±0,87	6,56±0,65	3,03±0,63	0,18±0,18	0,36±0,22
	102	0±0	4,98±0,34	0,59±0,16	0,54±0,19	4,98±0,34	1,12±0,16	0±0	0,53±0,15
	137	0±0	5,31±2,90	1,99±0,12	1,67±0,89	7,96±2,02	2,99±1,20	0±0	0,40±0,24
Jemalong (S)	0	0,96±0,96	3,80±0,83	0±0	0±0	4,76±0,43	0,00±0,00	0,18±0,18	0±0
	68	0±0	4,42±2,24	0±0	0,30±0,30	6,63±0,61	0,30±0,30	0±0	0±0
	102	0±0	4,74±2,37	0±0	0,20±0,20	7,10±0,08	0,20±0,20	0±0	0±0
	137	0±0	3,85±1,96	0±0	0,16±0,16	5,78±0,65	0,16±0,16	0±0	0±0

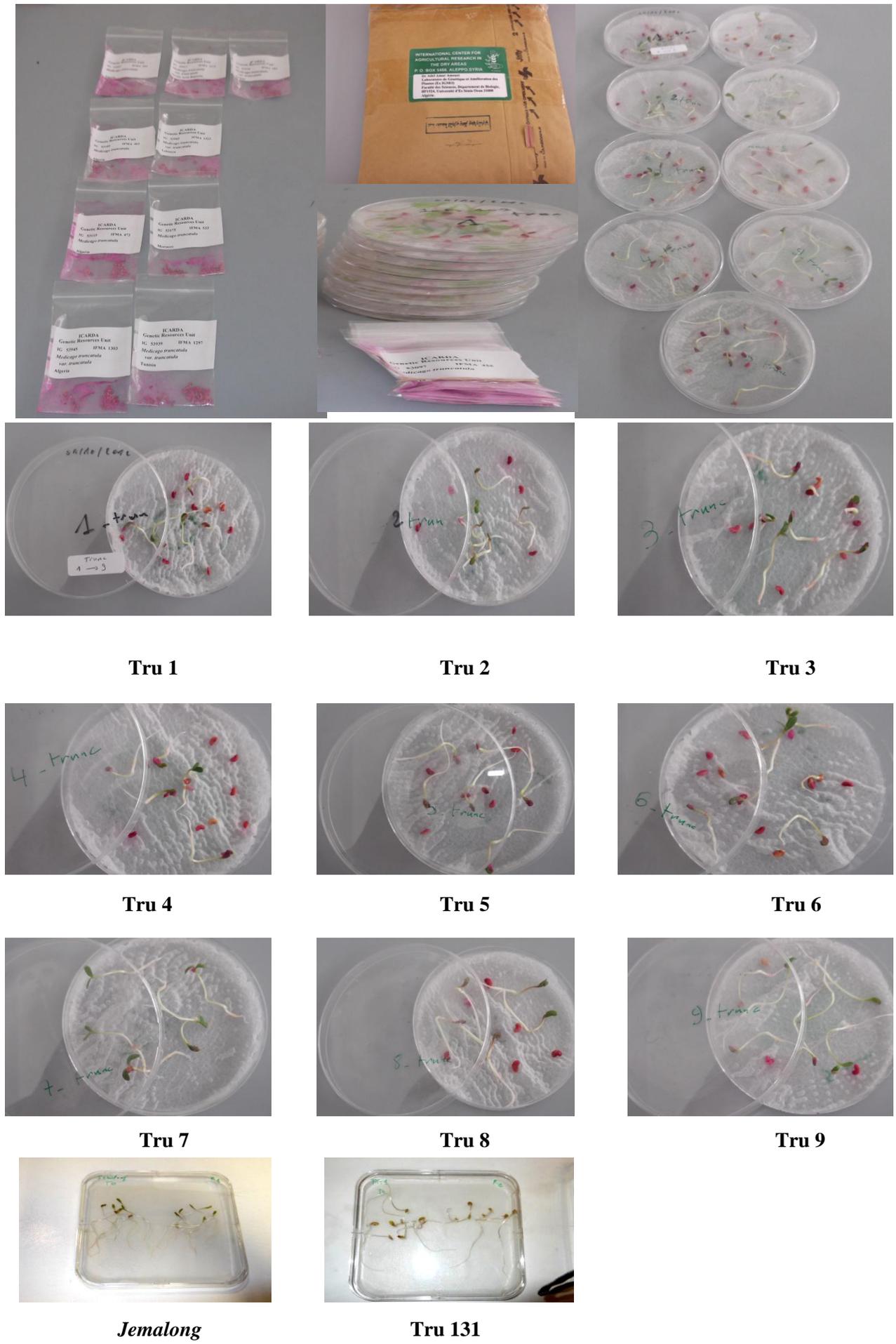


Figure 54 : Matériel végétal et germination des différentes graines de *Medicago truncatula* Gaertner



Figure 55 : Semis des différentes graines d'accessions de *Medicago truncatula* Gaertner

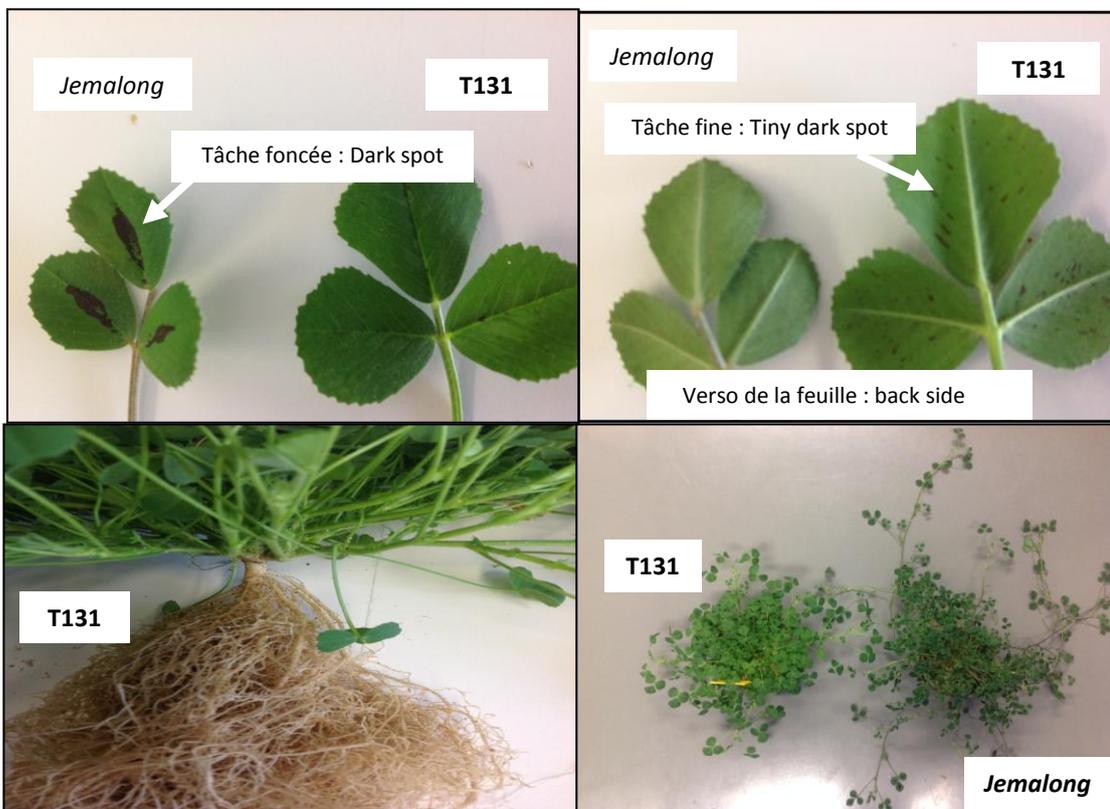


Figure 56 : Différences Agro-morphologiques entre T131 and *Jemalong*

Principe de l'électrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire se définit comme une technique de séparation électrophorétique effectuée dans un tube de diamètre interne $< 100 \mu\text{m}$, rempli d'un milieu électrolyte. Cette nouvelle technique permet la séparation rapide de molécule très variée, avec une grande résolution.

La séparation des molécules se fait par leur propre mobilité électrophorétique sur laquelle vient s'ajouter le flux électro-osmotique, plus ou moins important, engendré par le capillaire de silice qui attire les charges positives de l'électrolyte.

En effet, les molécules sont soumises à 2 flux :

➤ Le flux électrophorétique qui entraîne les cations vers la cathode et les anions vers l'anode : Dans une solution on a deux types de molécules : les neutres et les chargées. Les molécules neutres ne sont pas concernées par ce phénomène. En revanche, les molécules chargées lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique se déplacent à une vitesse caractéristique constante qui est fonction de leur taille et de leur charge.

➤ Le flux électro-osmotique : c'est un phénomène particulier au capillaire de silice, en effet les groupements Silanol sont très acides et donnent facilement Si-O^- , ce qui donne une charge interne négative. Dans le tampon on a des molécules chargées positivement, celles-ci vont venir s'adsorber à la paroi interne, et lorsqu'on impose un courant dans le capillaire « la gaine positive » va être entraînée vers la cathode. Cette migration crée un flux que l'on peut assimiler à un courant ou à « un tapis roulant ». Ce flux s'applique à toutes les molécules, qu'elles soient chargées ou non.

La somme de ces deux phénomènes va donner la vitesse caractéristique de la molécule étudiée. On a :

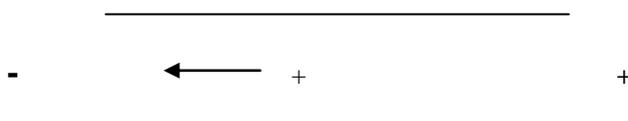
Vitesse de migration = Vitesse électrophorétique + Vitesse électro-osmotique.

La migration se fait dans un capillaire constitué de polymères de silicate d'un diamètre inférieur à $100 \mu\text{m}$. Il est rempli d'une solution tampon ; on injecte à l'anode et on détecte à la cathode. On applique une tension aux bornes du capillaire et le déplacement des espèces est régi par les deux phénomènes que sont l'électromigration et l'électro-osmose.

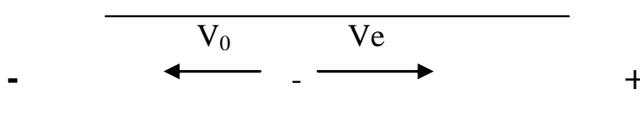
En règle générale, la migration se fait de l'anode à la cathode quel que soit le pH.

En effet soit V_e la vitesse électrophorétique du soluté et V_0 la vitesse du flux électro-osmotique.

A pH faible :



A pH fort



$V_0 > V_e$ donc la migration se fait de l'anode vers la cathode.

D'après ces 2 schémas on remarque bien que la migration du soluté se fasse de l'anode vers la cathode indépendamment du pH.

L'appareillage :

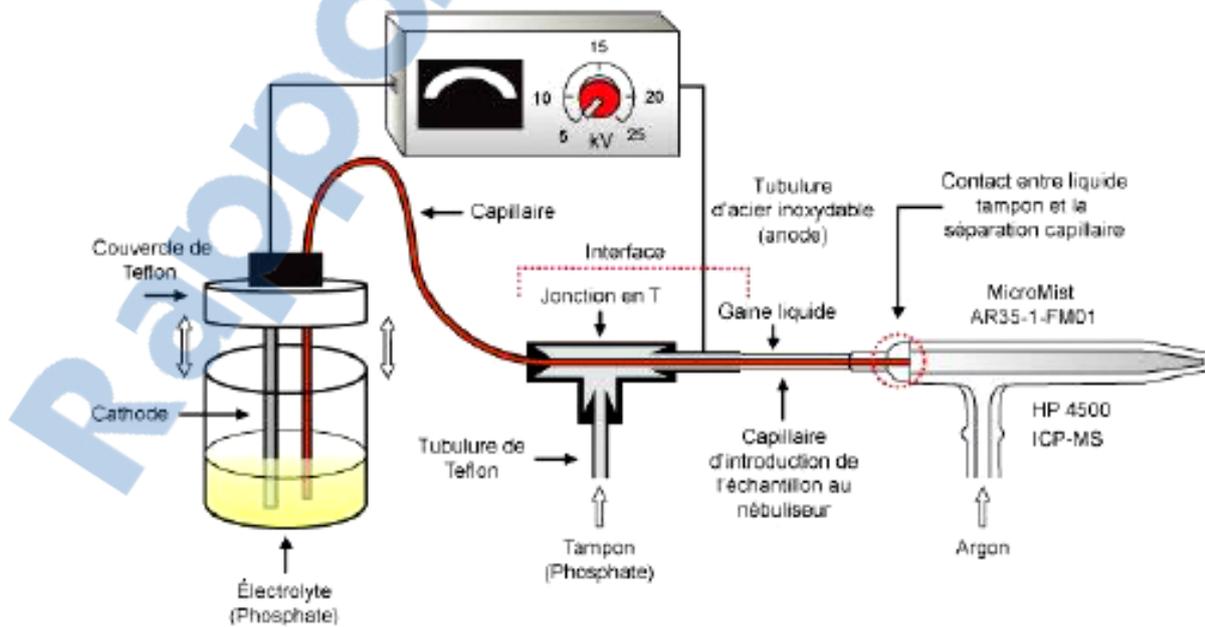
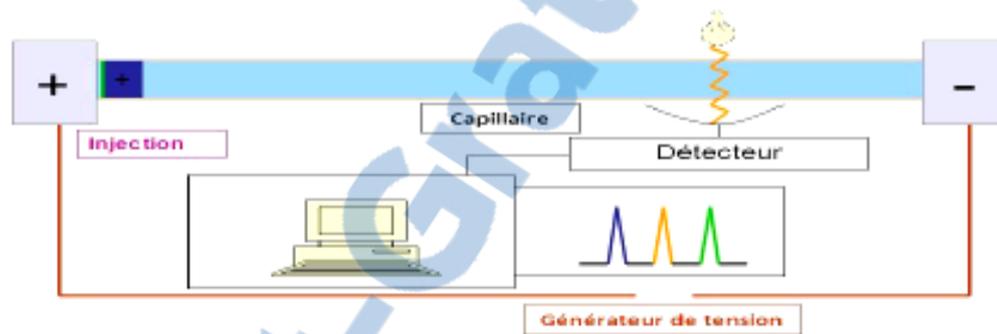
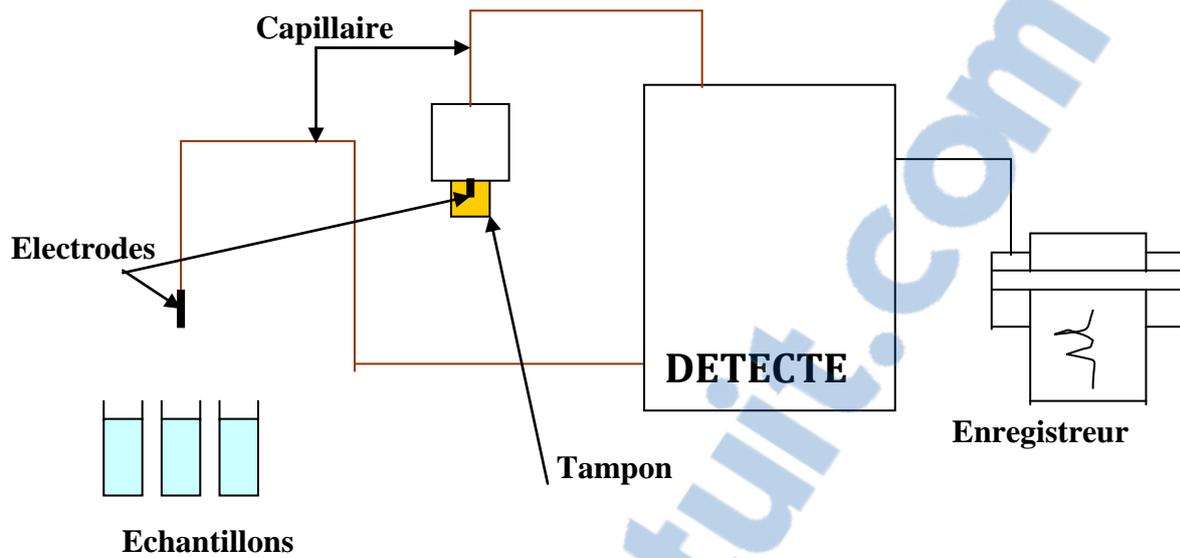


Fig 57 : Principe de l'électrophorèse capillaire

ANNEXE 2

Travaux personnels

1. Amouri Adel Amar, Fyad Lamèche Fatima Zohra and Yahia Noureddine. **2014. Early seedling development of *Medicago truncatula* genotypes under salt stress in relationship with seed dry weight and storage protein content.** *African Journal of Biotechnology*. 13 (2) : 322-331

2. Amouri A.A. **2015. Effect of Salinity Stress on Seedling Development of Different Ecotypes of the Model Legume *Medicago truncatula*.** *Asian Journal of Crop Science*, 7: 154-159.

3. Amouri Adel Amar et Hadjadj Aoul Seghir. **2016. Analyse moléculaire de deux génotypes de *Medicago truncatula* Gaertn. par le marqueur de séquence exprimée EST-SSR (MTIC 124) en réponse à la salinité.** *International Journal of Innovation and Applied Studies*. Vol. 17 No. 2 Jul. 2016, pp. 627-631

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
Chapitre 1 : Biologie de l'Adaptation à la salinité de <i>Medicago truncatula</i> Gaertner. : Revue bibliographique	4
1. Les légumineuses	4
1.1. L'azote dans la nutrition des plantes.....	6
1.2. Teneur en protéines.....	6
1.3. Les légumineuses dans les systèmes de culture.....	7
2. Le Modèle <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	8
2.1. Intérêt biologique.....	11
2.2. Intérêt agronomique.....	11
2.3. Intérêt pour la recherche en génétique fondamentale.....	11
2.4. Corrélation entre la diversité moléculaire et phénotypique.....	12
2.5. Biologie de la graine chez <i>Medicago truncatula</i>	13
2.5.1. Phase de maturation de la graine.....	15
2.5.2. Phase de germination de la graine.....	16
2.6. Mobilisation des réserves chez les plantes.....	18
3. Adaptation des Légumineuses au Stress Hydrique et Salin	19
3.1. Mécanismes de résistance et critères de sélection.....	19
3.1.1. L'esquive.....	20
3.1.2. L'évitement.....	20
3.1.2.1. La capacité d'extraction de l'eau par le système racinaire.....	20
3.1.2.2. La régulation stomatique.....	21
3.1.2.2. L'ajustement osmotique.....	21
3.2. La notion de tolérance au stress hydrique et stabilité des membranes cellulaires.....	22
3.3. Les mécanismes moléculaires de la réponse à la contrainte hydrique.....	23
3.3.1. Activation transcriptionnelle des gènes.....	24
3.3.2. Régulation au niveau de l'ADN génomique.....	28
3.3.3. Etude des Promoteurs de Gènes.....	29
3.4. Tolérance au sel des légumineuses.....	30
3.4.1. Problème de la salinité des sols.....	30
3.4.2. Effet de la salinité sur les plantes.....	31
3.4.3. Stratégies d'adaptations au stress salin.....	32
3.5. Les mécanismes antioxydants chez les plantes.....	33
3.5.1. Les oxydases alternatives (AOX).....	33
3.5.2. Les antioxydants.....	34
3.5.2.1. Définition.....	34
3.5.2.2. Les principaux systèmes non enzymatiques.....	34
3.5.2.1.1. L'ascorbate ou vitamine C.....	34
3.5.2.2. Le glutathion.....	35
3.5.2.3. Les principales enzymes antioxydantes.....	36
3.5.2.3.1. Les enzymes du cycle Asada-Halliwell-Foyer.....	36
3.5.2.3.2. Les peroxydases (POX).....	37
4. Variabilité Génétique des Plantes	39
4.1. L'Origine de la Diversité Génétique.....	39
4.1.1. La Diversité Génétique en Agriculture.....	40
4.1.2. Détermination de la diversité génétique.....	40
4.2. Notion de vulnérabilité et érosion génétiques.....	41
4.2.1. Indicateurs de la vulnérabilité et de l'érosion génétique.....	41
4.3. Approches de la diversité moléculaire.....	43
4.3.1. Marqueurs moléculaires pour l'étude de la diversité génétique.....	43
4.3.2. Les marqueurs Microsatellites.....	44
4.4. Analyse de la variabilité génétique.....	45
4.4.1. Méthodes de classification.....	45
4.4.1.1. Indices de similarités binaires symétriques.....	45
4.4.1.2. Indices de similarités binaires asymétriques.....	45
5. Aspect Génomique de <i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	46
5.1. Outils génétiques et génomiques disponibles.....	46
5.2. La génomique structurale et fonctionnelle.....	46
5.3. La génomique structurale.....	47
5.3.1. Le séquençage systématique.....	47
5.4. Séquençage d'étiquettes de séquences exprimées (EST).....	48
5.5. Intérêt de l'utilisation des ESTs.....	48
5.6. La génomique fonctionnelle.....	49
5.7. Le rôle régulateur des facteurs de transcription sous divers stress abiotiques.....	49

Chapitre 2 : Analyse de la Tolérance au Stress Salin de <i>Medicago truncatula</i> Gaertn. en relation avec le Poids et la Teneur en Protéines de Réserves des Graines.....	51
Matériels et méthodes	52
1. Matériel.....	52
2. Méthodes.....	52
2.1. Détermination des de la teneur en protéines de réserves des graines.....	53
2.2. Analyse statistique.....	53
Résultats et interprétation.....	55
1. Influence du stress sel sur les différents paramètres du développement des jeunes plants chez les différents génotypes <i>M.truncatula</i>	55
2. Analyse du poids et de la teneur en protéines de réserves des graines	59
3. Relation entre les différents paramètres du développement des jeunes plants sous stress salin avec le poids des graines et la teneur en protéines de réserves.....	59
Discussion	64
Conclusion.....	66
 Chapitre 3 : Analyse de la Diversité Génétique des Protéines de Réserves par Electrophorèse.....	 67
Matériels et méthodes.....	67
1. Matériel	67
2. Méthodes.....	67
2.1. Extraction des protéines de réserves et SDS-PAGE.....	67
2.2. Analyse des données	68
Résultats et interprétation.....	70
1. Analyse du polymorphisme des profils protéiques.....	70
2. Recherche de similarités par analyse des clusters.....	70
Discussion.....	74
Conclusion.....	75
 Chapitre 4 : Étude du Comportement de deux Génotypes contrastés de <i>Medicago truncatula</i> Gaertn. vis-à-vis du Stress Salin.....	 76
Matériels et méthodes.....	76
1. Matériel	76
2. Méthodes.....	76
2.1. Condition de germination et paramètres calculés.....	76
2.2. Détermination des de la teneur en protéines des jeunes plants sous stress salin.....	77
Résultats et interprétation.....	77
1. Etude de la variabilité de la tolérance au stress salin au niveau phénotypique et biochimique durant la germination.....	77
2. Cinétique de germination.....	78
Discussion.....	84
Conclusion.....	85

Chapitre 5 : Caractérisation Physiologique et Biochimique de la Racine de deux génotypes contrastés de <i>Medicago truncatula</i> Gaertn. sous Stress Salin	86
Matériel et méthodes.....	87
1. Matériel	87
2. Méthodes.....	87
2.1. Condition de croissance sous le traitement par NaCl	87
2.2. Mesure des différents paramètres biométriques (longueur et poids des racines).....	87
2.3. Calcul du potentiel hydrique de la Racine.....	87
2.4. Détermination de l'activité Guaiacol Peroxydase.....	87
2.5. Extraction et dosages des protéines solubles racinaires.....	88
2.6. Extraction et détermination de la masse moléculaire des antioxydants	88
2.7. Analyse statistique.....	88
Résultats et interprétation.....	94
1. Effet du stress salin sur la longueur, le poids et le potentiel hydrique de la racine.....	94
2. Effet du stress salin sur l'activité Guaiacol peroxydase (GPX)	94
3. Effet du stress salin sur le contenu racinaire en protéines.....	94
4. Effet du stress salin sur le contenu racinaire en Ascorbate et en Gluthatione	95
Discussion.....	101
Conclusion.....	103
 Chapitre 6 : Analyse de la Diversité Génétique de Différents Ecotypes de <i>Medicago truncatula</i> Gaertn. par Les Marqueurs Moléculaires	104
Matériel et méthodes.....	105
1. Matériel	105
2. Méthodes.....	105
2.1. Caractérisation moléculaire.....	105
2.1.1 Extraction d'ADN et amplification par PCR.....	105
2.1.2 Analyse de données	106
Résultats et interprétation.....	110
1. Analyse de diversité moléculaire révélées par les marqueurs EST-SSR.....	110
2. Corrélation entre les différents données moléculaires étudiés et les marqueurs (EST-SSR).....	110
3. Relations génétiques (Similarités / Dissimilarités) et classification des accessions par rapport au deux génotypes contrastés au stress salin.....	111
3.1 Analyse basée sur chaque EST -SSR (primer).....	111
3.2 Analyse globale de classification basée sur les quatre amorces d'EST- SSR étudiés.....	113
Discussion.....	113
Conclusion	114
 CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	136
ANNEXE 1 (Protocole de manipulation, mesures de paramètres physiologiques.....)	162
ANNEXE 2 : Liste des publications.....	175