

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Béjaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département Des Sciences Biologiques de l'Environnement
Spécialité Biodiversité et Sécurité Alimentaire

Mémoire de Fin de Cycle

En Vue de l'obtention du diplôme

Master

Thème

**Etude de la mitose, de la méiose et de la
cléistogamie chez *Medicago polymorpha*, *M.
minima*, *M. murex* et *M. lesinsii* (*Fabaceae*)**

Présenté Par :

Belkebla Fatima & Boucherba Nesrine

Soutenu le : 25/06/2023

Devant le jury composé de :

M. Benadjaoud Ali	MCA	Président
M Sahnoune Mohamed	Professeur	Promoteur
Mm Mesbah Melilia	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu le tout puissant, sans qui rien n'est possible, de nous avoir donné la force, le courage et la volonté de mener à bien notre projet de fin d'études.

Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à notre promoteur Pr. Sahnoune Mohamed pour son aide précieuse, ses conseils, ses encouragements et ses orientations ainsi que sa disponibilité tout au long de ce travail surtout pour avoir proposé ce sujet et de l'avoir pris en charge.

Nous présentons nos remerciements également à notre Co-promotrice Melle Benmouhoub Hassina pour son aide, son suivi, sa patience, sa rigueur et sa disponibilité durant nos préparations de ce mémoire.

Beaucoup de remerciements à Mlle Zemouri Tassadit et M^{me} Belkacem Farida pour leur soutien, leur disponibilité, leur aide et leurs encouragements, sans oublier les membres du laboratoire d'Ecologie et Environnement de nous avoir ouvert les portes et de nous avoir permis de faire notre stage pratique dans de bonnes conditions.

Nos sincères remerciements s'adressent aux membres du jury qui ont accepté de porter un regard critique sur ce projet de mémoire de fin d'étude, Mr Dr. Benadjaoud Ali (Président de Jury) et Melle Dr. Mesbah Melilia (Examinatrice).

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail de près ou de loin, notamment nos familles et nos amis. Espérons que ce modeste travail sera un guide pour les étudiants à venir.

Dédicace

À la mémoire de mon père,

Qui m'a toujours soutenue et encouragée durant mon parcours scolaire.
Que j'adore et dont les souvenirs resteront à jamais gravés dans mon cœur.
Que dieu le garde dans son vaste paradis.

À ma chère mère

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurais point vous remercier comme
il se doit.

Votre affection, votre bienveillance et votre présence à mes côtés sont
toujours ma source de force pour avancer et atteindre mes objectifs.
Que Dieu vous garde, vous protège et vous accorde une longue vie.

À mes chers frères et sœurs

Pour leur soutien, patience et encouragements tout au long de mon
parcours.

Djohra, Réda, Toufik, Safia, Lamine

À mes chères adorables nièces et neveux

Sources de joies et de bonheurs

Zahoua, Mohamed, Yasmine, Arabe, Younes, Adam

À toute ma famille et mes amis

À ma chère binôme

Notre partenariat était une très belle expérience pour moi. Ce modeste
travail est le fruit de notre patience, collaboration ambitieuse et
engagement commun envers l'excellence. Merci pour ta confiance, ton
travail acharné, ton amitié et ta personne adorable, positive.

Fatima

Dédicace

C'est avec un énorme plaisir que je dédie cet ouvrage à mes chers et adorables parents. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance. Ils n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir, de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs. Ils n'ont jamais dit non à mes exigences. Quoi que je fasse, je n'arrivai jamais à vous remercier comme il se doit. C'est grâce à vos encouragements, votre bienveillance et votre présence à mes cotés que j'ai réussi ce modeste parcours. J'ai de la chance de vous avoir comme parents. Que dieu vous garde pour moi et vous apporte une longue et joyeuse vie.

A ma tante chérie Ghania qui est une deuxième maman pour moi, que j'admire beaucoup. Tu es une personne exceptionnelle qui a joué un rôle unique et précieux dans ma vie. Tout au long de mon parcours, tu as été une présence constante, remplie de bienveillance et de soutien. Ta gentillesse et ta générosité sont des qualités qui te produisent si bien. Tu as toujours su trouver les mots justes pour me réconforter et m'encourager. Que Dieu te garde pour moi pour toujours.

A mon unique frère chéri. Tu es bien plus qu'un frère pour moi, tu es mon ami fidèle, mon confiant et mon complice de toujours. Et son épouse Fadila qui es plus qu'une sœur. Vous étiez toujours là pour moi prêts à m'écouter, merci pour vos encouragements, pour votre soutien moral et vos conseils précieux tout au long de mes études. Que Dieu vous protège et vous offre la chance et le bonheur.

A mon ange et adorable neveu Adem. Depuis le jour de ta naissance, tu as apporté une lumière éclatante à notre famille. Chaque regard que je pose sur toi fait naître en moi un sentiment d'émerveillement et de fierté. Tu es un trésor précieux, une petite étoile qui brille au milieu de nos vies.

A mon cher fiancé Billal qui n'a jamais cessé de m'encourager, qui est ma plus grande source d'inspiration, ta bienveillance et ton soutien inconditionnel me réconfortent, tu es mon pilier, mon confiant et mon meilleur ami, ta présence à mes côtés m'apporte une force, quoi que je fasse, je ne peux jamais te remercier assez, merci pour tout. Que ton chemin soit parsemé de bonheur, de réussite et d'épanouissement.

A ma famille, ma belle famille et mes amis qui m'ont toujours encouragée et soutenue.

A ma chère binôme Fatima, je tiens à te dédier ces mots pour exprimer ma gratitude et mon admiration envers toi. Notre partenariat a été une expérience inestimable, remplie de collaboration, de soutien mutuel et d'épanouissement. Je suis reconnaissante d'avoir eu la chance de travailler avec toi. Ton énergie positive, ta patience et ton dévouement. Notre binôme reste un souvenir précieux pour moi. Merci pour ta confiance, ton travail acharné et ton amitié. Notre collaboration a été une expérience inoubliable, et je suis impatiente de continuer à évoluer ensemble sur notre chemin professionnel.

Nesrine

Liste d'abréviations

CH :chasmogame

Cl :cléistogame

CMPs : cellules mères polliniques

Tables des matières

Remerciement

Dédicaces

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	01
I- Synthèse bibliographique.....	02
I-1- La famille des <i>Fabaceae</i>	02
I-2- Le genre <i>Medicago</i>	03
I-2-1- Distribution géographique	03
I-2-2- Morphologie du genre <i>Medicago</i>	04
I-2-3- Données cytogénétiques sur le genre <i>Medicago</i>	04
I-2-4- Les espèces du genre <i>Medicago</i> rencontrée en Algérie	06
I-2-5- Classification du genre <i>Medicago</i>	07
I-3- Données des espèces étudiées	07
I-3-1- <i>Medicago polymorpha</i>	07
I-3-1-1- Origine et distribution géographique de <i>Medicago polymorpha</i>	08
I-3-1-2- Morphologie	08
I-3-1-3- Intérêt de <i>Medicago polymorpha</i>	09
I-3-2- <i>Medicago murex</i>	10
I-3-3- <i>Medicago minima</i>	11
I-3-4- <i>Medicago lesinsii</i>	11
I-4- Cytogénétique végétale	12
I-4-1- La méiose chez les plantes	12
I-4-1-1- La division réductionnelle	12

I-4-1-2- La division équationnelle	14
I-4-2- Les anomalies de la méiose	15
I-5- La cléistogamie	18
I-5-1- Types de cleistogamie	19
I-5-1-1- La cléistogamie dimorphique	20
I-5-1-2- Cléistogamie complète	21
I-4-1-3- La cléistogamie induite	21
II- Matériel et Méthodes	22
II-1- Etude de la méiose	22
II-1-1- Matériel végétal utilisé et les stations d'études	22
II-1-2- Réalisation de l'herbier.	22
II-1-3- Préparation des solutions	24
II-1-4- Les principales étapes de l'analyse de la méiose	25
II-2- Etude de la mitose	26
II-2-1- Matériel végétal utilisé et les stations d'études	26
II-2-2- Préparation des solutions	26
II-2-3- Les étapes de préparation des lames microscopiques de la mitose	27
II-4- Etude de la fertilité pollinique	28
II-4-1- Préparation du colorant au bleu de coton	28
II-4-2- Technique de coloration et mesure des graines de pollen	29
II-4-3- Mesure de la taille et l'analyse statistique des grains de pollen	29
II-5- Etude de la cléistogamie	30
II-5-1- Les solutions utilisées	30
II-5-2- Technique de coloration du carpelle	30
III- Résultats	31
III-1-Dénombrements chromosomiques	31

III-1-2- Les étapes de la méiose observés chez <i>M. polymorpha</i> , <i>M. murex</i> , <i>M. minima</i> et <i>M. lesinsii</i>	32
III-1-3- Les anomalies méiotiques observées chez <i>M. polymorpha</i> , <i>M. murex</i> , <i>M. minima</i> , <i>M. lesinsii</i>	33
III-1-3- Analyse de la fertilité pollinique	33
III-1-4- Taille des grains de pollen	35
III-1-5- L'analyse de la cléistogmie	37
IV- Discussion	41
IV- Dénombrement chromosomique chez les espèces étudiier.....	41
IV-2- Les anomalies méiotiques observées chez les espèces étudiées.....	41
IV-3- La fertilité pollinique	42
IV-4- Taille des grains de pollen	42
IV-5- Cléistogamie.....	43
Conclusion.....	44
Références bibliographiques	46
Résumé	

Listes des figures

Figure	Titre	Page
1	Origine géographique du genre <i>Medicago</i> (Delalande <i>et al.</i> , 2007)	4
2	Morphologie de <i>Medicago polymorpha</i> (https://www.feedipedia.org/node/276)	9
3	Morphologie de <i>Medicago murex</i> (https://www.gbif.org/fr/species/2965209).	10
4	Morphologie de <i>Medicago minima</i> (https://fr.wikipedia.org/wiki/Medicago_minima).	11
5	Morphologie de <i>Medicago sphaerocarpos</i> = <i>Medicago lesinsii</i> . (https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/137648)	12
6	Les Différents stades de la méiose : A: leptotène. B : zygotène. C: pachytène. D: diplotène. E: diacynèse. F: métaphase I. G: anaphase I. H: métaphase II. I: anaphase II. J : télophase II (Deysson, 1976).	15
7	Nombre d'articles publiés dans 23 revues botaniques et écologiques dans un intervalle de 120 ans (1879-1999) qui citent soit la "cleistogamie". Les données ont été obtenues grâce au moteur de recherche en ligne JSTOR (http://www.jstor.org), qui dispose d'un mur mobile de 5 ans.	19
8	Exemples de voies qui aboutissent à la production de trois types différents de cleistogamie. Les bourgeons primordiaux d'origine et une période de changement environnemental (cases ombrées) survenant au cours de la séquence de développement sont représentés. Dans la cleistogamie dimorphique, le bourgeon primordial est déjà prédéterminé pour se développer en une fleur chasmogame (CH) ou cléistogame (CL). La production effective de l'un ou l'autre type de fleur (indiqué par des lignes) dépend de l'environnement. Dans le cas de la cléistogamie induite, il n'y a pas de trajectoire de développement fixe n'a pas de trajectoire de développement fixe, et chaque bourgeon se développera en une fleur CH à moins que l'environnement n'empêche son ouverture mécanique. Enfin, tous les bourgeons des espèces à cléistogamie complète se développent en fleurs CL.	20
9	Individus complets de <i>M. polymorpha</i> . a : Récolté au Campus universitaire Targua Ouzemour Bloc de recherche ; b : Récolté à Bouira.	23
10	Individus complets de <i>M. minima</i> . a : Récolté à Ahrik Ath Ali 'Ighzer Amokrane; b : Récolté à Boudjelil.	23
11	Individus complets de <i>M. murex</i> . a : Récolte à Cherfa (Ighzer Amokrane); b : Récolte à Thilemmathine (Ighzer Amokrane); c : Récolte à Aboudaou (Béjaïa).	24
12	Individus complet de <i>M. minima</i> récolte à Oued Zhour.	24
13	Graines germées dans des boîtes de pétri.	27
14	Dénombrements chromosomiques chez les espèces du genre <i>Medicago</i> étudiées. a : Métaphase mitotique chez <i>M. polymorpha</i> (Ain Aloui); b: Métaphase I en méiose chez <i>M. polymorpha</i> (Campus Targua Ouzemour); c: Métaphase I en méiose chez <i>M. murex</i> (Charfa); c: Métaphase I en méiose chez <i>M. minima</i> (Oued Zhour); e: Métaphase I en méiose chez <i>M. minima</i> (Boudjelil); f: Métaphase I en méiose chez <i>M. lesinsii</i> (Thilemmathine). Barre d'échelle est de 10 µm.	32

15	Les étapes de la méiose des cellules mères polliniques observées chez les espèces étudiées de <i>Medicago</i> . a : Métaphase I chez <i>M. polymorpha</i> (Bouira) ; b: Métaphase I chez <i>M. murex</i> (Charfa); c: Métaphase II chez <i>M. murex</i> (Charfa); d: Métaphase I chez <i>M. lesinsii</i> (Charfa) ; e: Anaphase I chez <i>M. minima</i> (Boudjellil); f: Anaphase II chez <i>M. minima</i> (Boudjellil); g: Tetrade chez <i>M. polymorpha</i> (Campus Targua Ouzemour); h: Tetrade <i>M. lesinsii</i> (Thilemmathine). Barre d'échelle est de 10 μ m.	33
16	cytomixies et triades observées chez les populations étudiées. a: cytomixie de deux cellules en prophase ; b: cytomixie de trois cellules en métaphase II; c: cytomixie de deux cellules en anaphase II; d: triade. Barre d'échelle est de 10 μ m.	33
17	Forme des grains de pollen des espèces étudiées. a: pollen fertile de <i>M. minima</i> (Oued Zhour); b: pollen fertile de <i>M. polymorpha</i> (Campus Targua Ouzemour); c: pollen fertile de <i>M. murex</i> (population Charfa); d: pollen fertile de <i>M. lesinsii</i> (Thilemmathine); e: pollen stérile de <i>M. minima</i> (Ahrik Ath Ali); f: pollen stérile de <i>M. polymorpha</i> (Campus Targua Ouzemour); g: pollen stérile de <i>M. murex</i> (Charfa); h: pollen stérile de <i>M. lesinsii</i> (Thilemmathine); i: pollen en début de germination de <i>M. minima</i> (Ahrik Ath Ali); j: pollen en début de germination de <i>M. polymorpha</i> (Campus Targa Ouzemour); k: pollen en début de germination de <i>M. murex</i> (Campus Targua Ouzemour); l: pollen en début de germination de e <i>M.lesinsii</i> (Md Said Ali Ouyidir).Barre d'échelle de 10 μ m.	34
18	ACP comparant les tailles des grains de pollen chez 4 espèces de <i>Medicago</i> Sect. <i>Leptospirae</i> . Axe 1 est défini par P (Axe polaire) et E (Axe équatorial) avec respectivement $R = -0,91$ et $R = -0,99$, Axe 2 est défini par P/E (rapport des deux axes) avec $R = -0,83$.	37
19	la présence de pollen germé sur les stigmates non déclenchés des fleurs chez les espèces étudiées. a: stigmate non déclenché mature (large) à pollen germé d'une fleur fermée chez <i>M. minima</i> (Oued Zhour) ; b: stigmate non déclenché mature d'une fleur à étendard ouvert chez <i>M. lesinsii</i> (Md Said Ali Ouyidir) ; c: stigmate non déclenché mature d'une fleur à étendard ouvert chez <i>M. polymorpha</i> (Campus Targua Ouzemour) ; d: stigmate non déclenché mature d'une fleur à étendard ouvert chez <i>M. murex</i> (Thilemmathine) . La barre d'échelle est de 300 μ m.	40
20	Etat du stigmate non déclenché et le nombre d'oules dans les fleurs analysées. a : stigmate non déclenché mature avec pollen germé à 5 ovules d'une fleur fermée chez <i>M. minima</i> (Oued Zhour) ; b: stigmate non déclenché jeune à 6 ovules d'une fleur à étendard ouvert chez <i>M. murex</i> (Cherfa) ; c: stigmate non déclenché mature avec pollen germé à 8 ovules d'une fleur à étendard ouvert chez <i>M. polymorpha</i> (Campus Targua Ouzemour) ; d: stigmate non déclenché jeune à 6 ovules d'une fleur à étendard ouvert chez <i>M. lesinsii</i> (Md Said Ali Ouyidir) . La barre d'échelle est de 500 μ m.	40

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Espèces spontanées du genre <i>Medicago</i> présentes en Algérie (Quézel et Santa, 1962).	06
2	Classification botanique du genre <i>Medicago</i> (Small et Jompe, 1989).	07
3	Date de récolte de quatre espèces de différentes populations.	22
4	Tableau de récolte de différentes espèces de différentes populations.	26
5	Dénombrements chromosomiques chez les populations des espèces étudiées.	31
6	Taux de fertilité polliniques (%) par fleurs et populations pour les quatre espèces de genre <i>Medicago</i> sect. <i>Leptospirae</i> étudiées	34
7	Comparaison des paramètres de taille des grains de pollen chez quelques populations de 4 espèces de <i>Medicago</i> Sect. <i>Leptospirae</i> . Les valeurs sont exprimées comme Moyenne \pm écart-type et Min-Max. P : Axe polaire ; E : Axe équatorial ; P/E : Rapport des deux axes. Les moyennes désignées par différentes lettres sont statistiquement différentes (Test LSD, $\alpha = 0,05$).	36
8	Comparaison des paramètres de taille des grains de pollen des 4 espèces de <i>Medicago</i> Sect. <i>Leptospirae</i> étudiées. Les valeurs sont exprimées comme Moyenne \pm écart-type et Min-Max. P : Axe polaire ; E : Axe équatorial ; P/E : Rapport des deux axes. Les moyennes désignées par différentes lettres sont statistiquement différentes (Test HSD pour effectifs inégaux, $\alpha = 0,05$).	36
9	Résultat de l'analyse de la cléistogamie chez les différentes populations des espèces de <i>Medicago</i> Sect. <i>Leptospirae</i> étudiées.	38

INTRODUCTION

Introduction

L'Algérie possède une flore extrêmement diversifiée, bénéficiant de sa position géographique et de sa variété de climats et de sols. Cette situation privilégiée permet à l'Algérie de cultiver et d'exploiter une multitude de plantes. Un grand nombre de ces espèces se développent naturellement et sont endémiques à la région. Certaines d'entre elles présentent une grande valeur agronomique, étant utilisées comme fourrage pour le bétail ou comme plantes alimentaires, tandis que d'autres ont des propriétés médicinales (Armani, 2006).

Le genre *Medicago* appartient à la famille des *Fabaceae*. Selon Ernest *et al.* (1998), le genre *Medicago* comporte 86 espèces dont des annuelles, des bisannuelles et des vivaces (herbacées ou arbustives).

Les espèces annuelles de ce genre sont à prédominance autogame et présentent de fortes barrières d'interfécondité spécifique. Ces barrières d'interfécondité ne sont pas toujours efficaces, il existe souvent des flux de gènes entre des taxons végétaux différents (Rieberg et Morefield, 1995 *in* Judd *et al.*, 2002).

Le genre *Medicago* compte 87 espèces (Small, 2011) dont 23 sont présentes en Algérie (Quézel et Santa, 1962) dont la plupart sont présentes dans la Vallée de la Soummam et le Golfe de Béjaïa. Ces espèces demeurent insuffisamment étudiées du point taxonomique en général et cytogénétique en particulier.

Ce travail vise à analyser la cytogénétique et la cléistogamie de différentes populations de quatre espèces: *M. polymorpha*, *M. minima*, *M. murex* et *M. lesinsii*, et cela par l'observation des mitoses et des méioses, les anomalies méiotiques, la fertilité pollinique, et la taille des grains de pollen. La cléistogamie sera aussi abordée pour tenter de comprendre dans quelle mesure elle serait la cause des barrières reproductives au sein de cet ensemble de taxons.

Notre mémoire comporte une introduction générale où est présenté l'état de la question et l'objectif principal du travail. Ensuite le premier chapitre est consacré à la revue bibliographique où on définit les espèces, leur morphologie, classification etc. Le deuxième chapitre ou matériel et méthodes présente l'échantillonnage du matériel végétal et les méthodes d'Analyse utilisées. Dans le troisième chapitre sont présentés les résultats et discussion. On termine par une conclusion générale suivie et des perspectives.

I- REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I- Synthèse bibliographique

I-1- La famille des Fabaceae

La famille des Fabaceae ou Leguminosae sont des plantes dicotylédones de l'ordre des Fabales, est la seconde famille la plus importante économiquement après les Graminées, et la troisième plus grande famille floristiquement parmi les angiospermes après les Orchidaceae et les Asteraceae (Azcan, 2001 Bayrakdar, 2010). C'est l'un des groupes de végétaux supérieurs les plus abondants et les plus diversifiés (Faria, 1984). Elle comprend environ 727 genres et 20000 espèces (Lewis *et al.*, 2005) qui sont classées en trois sous-familles ; *Caesalpinioideae* DC., *Mimosoideae* DC. et *Faboideae* DC. (APG IV, 2016 ; LPWG, 2017). Les espèces qui la composent sont réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical. les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (Guignard et Dupont 2005). Ces légumineuses tiennent une part très importante des travaux dans divers domaines tels que l'agronomie, la cytogénétique, l'entomologie, la phytopathologie, et la physiologie (Azcan et al., 2001).

La famille des légumineuses est hautement bénéfique pour l'humanité, que ce soit dans les domaines de l'alimentation, de l'industrie, de l'économie, de l'écologie ou de l'agronomie.

- Les graines des légumineuses sont des aliments de qualité exceptionnelle, étant une source principale de protéines et d'huiles végétales, en fonction de la variété de légumineuse considérée.

Les protéines peuvent représenter de 17 et 27 % du poids des graines soit deux à trois fois plus que les graines des céréales majeures (Graham et Vance, 2003; Simon, 2005; Fyad-Lameche, 2007).

- Dans l'industrie, les légumineuses représentent une source très importante de matière première pour la production de dérivés alimentaires tels que les huiles, les farines et les conserves... et pour la production des produits cosmétiques et pharmaceutiques (Lee *et al.*, 2007).
- L'utilisation des systèmes de rotation légumineusex-céréales permet de substantielles économies d'engrais azotés, d'épargner une grosse part de l'énergie fossile et conduit à une protection de l'environnement et au développement de l'agriculture équilibrés (Sahgal et Johri, 2003).

- Les légumineuses améliorent les pratiques agricoles et contribuent au maintien de la fertilité des sols par l'accumulation des concentrations importantes d'azote dans leurs tissus (Simon, 2005).
- Ecologiquement, les légumineuses sont responsables pour une partie substantielle de la conversion du flux global de l'azote atmosphérique en forme fixe tel que l'azote ammoniacal qui est à son tour converti en composés organiques assimilables (Wani *et al.*, 1995 ; Chalck, 1998).
- Elles jouent aussi des rôles très importants dans la lutte contre l'érosion, la désertification et la dégradation des sols (Thami et El Mzouri, 2000).

I-2- Le genre *Medicago*

Le genre *Medicago* L. (1754), Luzernes en Français, Iffis en Kabyle et Nefla en Arabe Algérien appartient à la famille des Fabaceae (Légumineuses). Possédant des racines pivotantes puissantes qui peuvent s'étendre jusqu'à plusieurs mètres de profondeur. Ses tiges portent des feuilles trifoliées à folioles finement dentées au sommet, La fécondation est allogame chez les espèces vivaces et autogame chez les espèces annuelles (Proserpi *et al.*, 1993).

Selon Fournier (1961), le terme "*Medicago*" vient du mot latin "*Medica*" ou «herbes de médic», il fut modifié par Dale Champs en 1587 et devient *Medicago*.

Le nom scientifique du genre *Medicago* n'est pas lié à ses propriétés médicinales, mais plutôt à l'origine signalée de la luzerne dans la région de Médie, qui s'étend du nord-ouest de l'Iran à l'Azerbaïdjan. Le nom anglais et espagnol "alfalfa" dérive du terme arabe "al-fac-façah", signifiant "le père des aliments", car la luzerne était utilisée comme fourrage pour les chevaux. Quant au nom vernaculaire (Luzerne), il est emprunté à l'occitan « luserna », qui désigne aussi une partie lumière ou le ver luisant, en raison de l'aspect brillant des graines de la plante.

I-2-1- Distribution géographique

Géographiquement, les espèces pérennes et annuelles du genre *Medicago* ne se distribuent pas de la même manière. Les espèces annuelles sont cantonnées particulièrement dans la région méditerranéenne (Figure 1). Par contre, les espèces pérennes sont à large distribution et se localisent plutôt à l'Est de la Méditerranée et principalement au Centre et à l'Ouest asiatique.

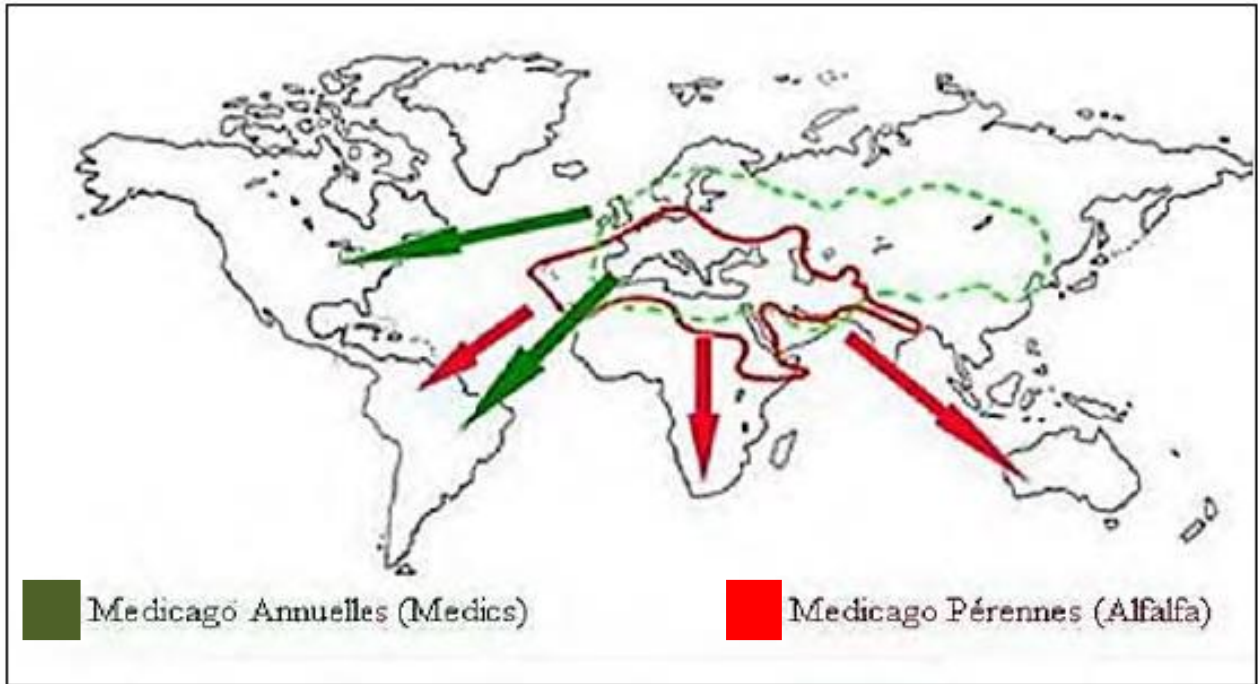


Figure 1 : Origine géographique du genre *Medicago* (Delalande *et al.*, 2007)

I-2-2- Morphologie du genre *Medicago*

Les plantes du genre *Medicago* sont annuelles ou pérennes, herbacées ou arbustives, les feuilles sont trifoliées pétiolées et non terminées par une vrille et leurs folioles sont dentées sur la partie distale, Deux stipules collées aux pétioles, une corolle papilionacée, caduque, constituée d'un étendard de deux ailes libres et d'une carène formée par deux pétales inférieurs soudés, androcée diadèlphe (9 + 1): neuf étamines soudées, formant la colonne staminale, plus une dixième étamine libre. Le calice est formé de cinq sépales soudés, les inflorescences pédonculées portent jusqu'à 30 fleurs libres, la gousse est soit courbée, soit tordue, soit roulée en hélice, épineuse ou non, indéhiscente ou presque, le port est généralement dressé mais peut être prostré (collé au sol), les tiges peuvent être poilues (Lesins et Lesins, 1979 ; Chakravatry, 1976 et Prospero *et al.*, 1995).

I-2-3- Données cytogénétiques sur le genre *Medicago*

Le genre *Medicago* a été largement étendu en cytogénétique, grâce principalement à des analyses caryologiques, dans le but de clarifier la position systématique et phylogénétique de certains taxons (Lesins et al., 1970). Cependant, malgré ces recherches, les données caryologiques demeurent insuffisante et les relations phylogénétiques entre les espèces persistantes. Pourtant ces études ont révélé l'existence d'au moins quatre nombres

chromosomiques dans le genre *Medicago* : $2n = 2x = 14, 16, 32$ et 48 , avec deux nombres de base $x = 7, x = 8$, et trois niveaux de ploïdie : diploïde, tétraploïde et hexaploïde (Bauchan et al., 1984 ; Mariani et al., 1996). Le nombre chromosomique le plus courant parmi les espèces annuelles du genre *Medicago* est $2n = 2x = 16$.

Malgré cela, certaines espèces diploïdes présentent un nombre chromosomique de $2n=14$, tandis que *M. murex* est l'unique espèce à posséder à la fois $2n = 14$ et $2n = 16$. Le nombre chromosomique $2n = 14$ est le résultat d'une réorganisation des chromosomes après la fusion de deux chromosomes, l'un d'entre eux étant dépourvu de centromère (Lesins et al., 1970).

Selon Lesins et Lesins (1979), trois espèces présentent un nombre chromosomique de $2n= 14$, à savoir *M. polymorpha*, *M. praecox* et *M. rididula*. Il est probable qu'elles dérivent de la même espèce que *M. murex*, car elles présentent un chromosome long exceptionnel résultant de la fusion de deux chromosomes. En revanche, *M. constricta*, une autre espèce avec un nombre chromosomique de $2n = 14$, ne présente pas de chromosomes longs et est le résultat d'un réarrangement secondaire des chromosomes. Il existe uniquement deux espèces annuelles tétraploïdes, *M. rugosa* et *M. scutellata*, avec un nombre chromosomique de $2n = 30$ et $2n = 32$ respectivement.

I-2-4- Les espèces du genre *Medicago* rencontrée en Algérie

Les plus importantes sont décrites par Quézel et Santa en 1962 (Tableau 1).

Tableau 1 : Espèces spontanées du genre *Medicago* présentes en Algérie (Quézel et Santa, 1962).

Nom d'espèce	Type de la plante	Gousse	Fleur	Habitat
<i>M. intertexta</i>	Annuelle	Glabre de 12 à 15mm	Jaune	Pâturages, Tell Algéro- Constantinois
<i>M. ciliaris</i>	Annuelle	Velue hirsute, plus ou moins glanduleuses de 10-15 mm	Jaune	Pâturages, prairies, Tell à sol semi salin
<i>M. falcata</i>	Vivace	Courbée en faucille ou en anneaux, pubescen	Jaune	Pâturages argileux
<i>M. lupulina</i>	Annuelle ou bisannuelle	Réniforme, fortement arquée de 2-3 mm de diamètre	Jaune	Pâturages
<i>M. secundiflora</i>	Annuelle ou bisannuelle	Brun clair de 2-2.5 mm	Jaune	Pâturages
<i>M. marina</i>	Vivace	Contournée en hélice	Jaune	Sables maritimes
<i>M. sativa</i>	Vivace	Glabre ou pubescente, à 2-3 tours de spire	Violettes ou jaunes lavées de brun	Cosmopolite
<i>M. scutellata</i>	Annuelle	Hémisphérique à spires emboîtées de 13-15 mm	Jaune	Sols argileux du Tell
<i>M. orbicularis</i>	Annuelle	Ovoïde à 5-6 tours de spires	Jaune	Pâturages du Tell
<i>M. rugosa</i>	Annuelle	Ne dépassant pas de 9mm	Jaune	Pâturages de Constantine et Alger
<i>M. soleirolii</i>	Annuelle	Glabres	Jaune	Pâturages du Tell Constantinois
<i>M. rigidula</i>	Annuelle	Glanduleuse fortement pubescente de 10 mm	Jaune	Broussailles, Montagnes
<i>M. tuberculata</i>	Annuelle	Tronquée à sa base, Glabre de 10mm	Jaune	Pâturages arides
<i>M. truncatula</i>	Annuelle	Tronquée a ses deux extrémités De 7-8 mm	Jaune	Sols argileux du Tell
<i>M. littoralis</i>	Annuelle	Ovoïde ou globuleuse de 10 mm	Jaune	Pâturages
<i>M. murex</i>	Annuelle	Glabres ou faiblement hispides	Jaune	Tell Algéro-Constantinois
<i>M. minima</i>	Annuelle	Contournée en hélice, pubescente de 3-4 mm	Jaune	Sols pauvres
<i>M. arabica</i>	Annuelle	Glabre de 5-7 mm	Jaune	Tell Algéro-Constantinois
<i>M. laciniata</i>	Annuelle	Ovoïde ou sphéroïdale de 5-6 mm	Jaune	Pâturages arides- Montagnes
<i>M. hispida</i>	Annuelle	Fortement réticulée-striée de 5-9mm	Jaune	Tell – Pâturages

I-2-5- Classification du genre *Medicago*

La position systématique du genre *Medicago* est représentée comme suit d'après (Small et Jompe, 1989).

Tableau 2 : Classification botanique du genre *Medicago* (Small et Jompe, 1989)

Règne	Plantea
Embranchement	Spermatophytes
Sous-embranchement	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
sous- classe	Rosidées
Ordre	Fabale
Famille	Fabaceae
sous- famille	Faboideae
Tribus	Trifolieae
Genre	<i>Medicago</i>

Plusieurs botanistes et taxonomistes ont proposé différentes classifications du genre *Medicago*, notamment Schoutteten (2004), Heyn (1963), Lesins et Lesins (1979), et Ernest et al., (1998). Lesins et Lesins (1979) ont désigné 55 espèces herbacées, dont 34 annuelles et 21 pérennes. Parmi ces espèces, une dizaine est cultivée, principalement dans les pâturages et les parcours, notamment dans les régions méditerranéennes. Ils ont divisé le genre en 4 sous-genres (*Lupularia*, *Orbicularia*, *Falcago*, *Spirocarpus*) et 14 sections (Schoutteten, 2004). Selon Ernest *et al.*, (1998), le genre *Medicago* comporte 86 espèces (annuelles, bisannuelles et vivaces) représentant l'ensemble des 12 sections et 8 sous-sections.

I-3-Données sur les espèces étudiées**I-3-1- *Medicago polymorpha***

Medicago polymorpha possède des caractéristiques qui en font une plante fourragère nutritive et extrêmement appréciée pour les sols légèrement neutres et alcalins des régions à climat méditerranéen (Del Pozo, 2002). Considérée comme la légumineuse la plus précieuse pour l'amélioration des pâturages (Graziano, 2010) et la stimulation de la matière organique du sol dans les sols bien drainés, elle présente une croissance rapide et dense. En fixant l'azote et en augmentant la disponibilité d'azote dans le sol, elle est extrêmement utile en tant que fumier vert (Denton *et al.*, 2007). Sa propagation à travers le monde est largement due à sa faible sensibilité à la photopériode et à la vernalisation (Clarkson et Russell, 1975).

On la retrouve notamment dans les régions tempérées chaudes, subtropicales et en altitude.

I-3-1-1- Origine et distribution géographique de *Medicago polymorpha*

L'introduction de *Medicago polymorpha* en Europe remonte à environ 470 av.J.C., avant les guerres médiques. À l'époque, elle était appelée *Medica herbà*, ou "l'herbe de Médie". Plus tard, ce nom a été adopté en tant que nom de genre : *Medicago*. Cette plante est une légumineuse annuelle avec des graines durables et une capacité d'autogénération. Originaire du bassin méditerranéen, elle se trouve largement répandue à l'état sauvage dans de nombreuses régions du monde (Crawford *et al.*, 1989). *Medicago polymorpha*, tout comme d'autres espèces annuelles de *Medicago*, présente une bonne adaptation aux sols alcalins. De plus, elle est capable de pousser dans des sols modérément acides en raison de sa tolérance aux conditions acides pendant la phase de nodulation (Howieson et Ewing, 1989 ; Ewing et Robson, 1990). Sa capacité à résister au froid est également bien étudiée et documentée (Loi *et al.*, 1993).

I-3-1-2- Morphologie

Medicago polymorpha (Fig. 2), appartenant à la famille des Légumineuses, se distingue par ses petites fleurs d'un éclatant jaune vif, mesurant entre 3 et 6 mm de longueur. Ces fleurs se regroupent en têtes composées de 2 à 10 fleurs à l'extrémité de la tige. Le fruit de *Medicago polymorpha* est une gousse qui présente une forme sinueuse avec 2 à 6 courbures, et possède des rangées d'épines sur son bord extérieur. Sa longueur est généralement d'environ 6 à 7 mm.

Initialement de couleur verte et relativement tendre, il devient rapidement brun et dur. À l'intérieur de la gousse, on trouve plusieurs graines, généralement de couleur jaune ou bronzée et de forme réniforme. Les tiges de la plante sont fragiles et atteignent une longueur de 60 à 75 cm. Dans des peuplements denses, les tiges peuvent se redresser et atteindre une hauteur de 60 cm. Le système racinaire est doté d'une racine pivotante qui s'enfonce profondément dans le sol et qui est difficile à extraire une fois que la plante est établie (Heuzé *et al.*, 2016).



Figure 2 : Morphologie de *Medicago polymorpha* (<https://www.feedipedia.org/node/276>)

I-3-1-3- Intérêt de *Medicago polymorpha*

Medicago polymorpha est une plante extrêmement bénéfique pour la restauration des sols, le fumier vert et la protection contre l'érosion, notamment dans les zones de sécheresse. Sa capacité de croissance rapide et dense, ainsi que sa capacité à fixer l'azote et à augmenter la disponibilité d'azote dans le sol, la rendent très utile en tant que fumier vert (Denton et al., 2007). L'utilisation répandue de *Medicago polymorpha* se retrouve dans les systèmes d'élevage de légumineuses, qui combinent la production végétale et animale dans des régions semi-arides et terrestres. Ce système repose sur la rotation des cultures céréalières avec l'incorporation régulière de légumineuses annuelles (Graziano et al., 2010).

Pendant les périodes de jachère ou de pâturage, *Medicago polymorpha* est utilisée pour accroître la teneur en azote du sol en raison de sa capacité à fixer l'azote atmosphérique dans ses nodules racinaires, réduisant ainsi potentiellement le besoin d'engrais azotés supplémentaires. De plus, elle perturbe le cycle de vie des organismes nuisibles et protège les sols contre la dégradation. En début de saison de croissance, elle pousse rapidement et supprime les mauvaises herbes. Les mauvaises herbes automnales peuvent être contrôlées grâce à leur repousse après la récolte, que ce soit par une plantation intercalaire avec les céréales ou par le semis des céréales dans un couvert végétal déjà établi (Clark, 2007).

En retirant les animaux de pâturage au stade de floraison, la consommation des fleurs a été réduite, ce qui a favorisé une meilleure survie des graines ultérieurement au cours de la saison de croissance (Duke, 1983 ; Tilman, 2000).

Dans les rotations à long terme des cultures, la persistance de ses graines se régénère généralement pendant la phase de pâturage des banques de semences dans le sol (Denton et al., 2007). Rochon et al., (1994) ont constaté que les paddocks à pâturage à rotation,

ensemencés avec *Medicago polymorpha* ont montré une productivité accrue sous une forte intensité de pâturage. L'élevage doit être soigneusement géré, cependant, pendant la phase de floraison afin d'éviter l'épuisement de la banque de semences causée par l'apport de semences (Rochon et al., 2004).

I-3-2- *Medicago murex*

D'après Lesins & Lesins (1979), Plantes de 30 à 90 cm de long, tiges couchées à obliques, provenant de la base et se ramifiant secondairement. Parties végétatives glabre, ou peu couvertes de simples poils semi-verticaux. Stipules profondément incisées, parfois avec incisions secondaires, formant de longues dents. Dans les nœuds supérieurs, les stipules se forment parfois en une seule dent. Folioles 9-21 mm x 8-12 mm, obovés à coniques ; face supérieur glabre, la face inférieure couverte de quelques poils surtout le long de la nervure centrale. Pédoncule de 1 à 6 fleurs, avec une arrête terminale, généralement 2 à 5 fois plus longue que le pétiole correspondant, Rarement un peu plus long ou aussi long que le pétiole. Fleurs de 4 à 7 mm de long. Pédicelle inférieur au tube de calice. Bractées ont \pm la longueur du pédicelle. Calice de 3 à 4 mm de long. La corolle jaune, généralement moins de deux fois plus longue que le calice, est rarement égal ou plus de deux fois plus longue. Les ailes nettement plus longues que la carène. Gousses matures sphérique, de couleur grises-verdâtre à noir, épineuse ou inerme, 6 à 9 spires par gousse. Graines 3.5-4.5 mm x 1.5-2.5 mm, souvent en forme d'arc, 1 à 2 graines par spire, séparées.



Figure 3 : Morphologie de *Medicago murex* (<https://www.gbif.org/fr/species/2965209>)

I-3-3- *Medicago minima*



Figure 4 : Morphologie de *Medicago minima* (https://fr.wikipedia.org/wiki/Medicago_minima)

Selon Lesins & Lesins (1979), Plantes de 20 à 60 (90) cm de long plus en moins densément couvertes de simples poils glandulaires ; branches émergeant de la base, prostrées à ascendantes, stipules entières ou dentées minutieusement. Folioles 6-14 mm × 4-8 mm, obovales, rarement aux nœuds inférieurs. Marge dans sa partie apicale dentelée 1/4-1/3 ; nervure médiane se termine par une dent terminale. Pédoncule 1 à 7 fleurs, plus long que le pétiole correspondant, ou plus court à sessile, avec une minuscule cuspide terminale ou sans. Fleurons de 3 à 6 mm de long. Pédicelle plus court que le tube du calice ; bractée ± la longueur du pédicelle. Calice ± la moitié de la longueur du fleuron. Corolle jaune vif à jaune citron ; standard obovale, parfois émarginée ; ailes généralement un peu plus courtes que la quille. La jeune gousse se tourne latéralement à travers les dents du calice. Gousse mature brun clair à brun foncé, glabrescente ou avec des poils simples et glandulaires, cylindrique ou ovale, épineuse, avec des épines courtes ou sans épines. Rouleaux 3-5, à paroi fine.

I-3-4- *Medicago lesinsii*

M. lesinsii E. Small Pays du cercle méditerranéen ; peu collecté mais largement répandue. Il s'agit de l'ancêtre probable de (25), *M. murex* (Small et Brookes 1985), dont il se distingue par l'absence de crêtes perceptibles sur le bord de la bobine à côté de l'extrémité de la bobine. Crêtes visibles sur le bord de l'enroulement à côté de la suture dorsale (les crêtes sont presque toujours évidentes chez *M. murex*). *M. lesinsii* n'ont généralement qu'une seule fleur, alors que de nombreux *M. murex* ont deux fleurs. Ces deux espèces sont beaucoup

moins pubescentes que *M. turbinata* (21), la seule autre espèce de la sous-section Pachyspireae avec une zone périphérique est sur la face de la bobine, visible sur les jeunes fruits.



Figure 5 : Morphologie de *Medicago sphaerocarpos* = *Medicago lesinsii*
(https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/137648)

I-4- Cytogénétique végétale

La cytogénétique établit un lien essentiel entre la cytologie et la génétique, couvrant un large domaine d'étude. Son principal objectif est l'investigation des chromosomes pendant la mitose et la méiose en utilisant des techniques classiques ainsi que des méthodes plus récentes telles que la FISH et la GISH (Jahier *et al.*, 1992). L'analyse des événements méiotiques fournit des informations détaillées sur le comportement chromosomique et la fertilité d'une espèce, facilitant ainsi les études d'hybridation inter et intra-spécifique (Lavinsky, 2017). La cytogénétique contribue également à la compréhension des mécanismes héréditaires, à la phylogénie et à la taxonomie des espèces (Jahier *et al.*, 1992).

I-4-1- La méiose chez les plantes

La méiose est une étape essentielle chez les espèces à reproduction sexuelle. Ce phénomène comporte une foule d'évènements hautement conservés qui assurent la viabilité des gamètes. Dans la méiose, toutes les étapes sont contrôlées par des gènes spécifiques qui opèrent les différents processus pour que la méiose se produise régulièrement (Pagliarini, 2000). La méiose comprend deux phases successives :

I-4-1-1- La division réductionnelle

La première division cellulaire permet de répartir les $2n$ chromosomes dans deux cellules-filles (n chromosomes dans chaque cellule), Ainsi, le nombre des chromosomes est

réduit de moitié et passe de $2n$ à n . Il est désormais bien établi que cette division I se déroule en quatre phases distinctes (Laberche, 2010).

- **Prophase I** : Au cours de cette phase, des réarrangements chromosomiques se produisent. Initialement, les $2n$ chromosomes, constitués de deux chromatides, commencent à se séparer progressivement (stade leptotène). Ensuite, les deux chromosomes homologues se rapprochent, s'apparient (stade zygotène) et se condensent (stade pachytène). Par la suite, ils commencent à s'éloigner l'un de l'autre (stade diplotène), tout en laissant des zones de contact appelées chiasmas, où des échanges de matériel génétique se produisent (croisements). La condensation des chromosomes s'intensifie progressivement, et la cellule progresse vers le dernier stade de cette prophase 1, appelé diacinèse, où les chromosomes homologues ne sont maintenus en contact que par les chiasmas. L'enveloppe nucléaire disparaît.

Cette phase est divisée en cinq stades successifs :

a/ Stade leptotène : Au stade leptotène, des chromosomes fins et légèrement spiralés apparaissent dans un noyau légèrement gonflé, sans clivage longitudinal visible. Ces chromosomes ont tendance à converger vers un pôle du noyau, adoptant une disposition en forme de bouquet (Figure 6 A).

b/ Stade zygotène : Au stade zygotène, les chromonémas subissent un étirement initial, puis les chromosomes homologues s'alignent directement l'un en face de l'autre et se maintiennent ensemble en plusieurs points le long de leur longueur grâce à une synapsis (Figure 6 B).

c/ Stade pachytène : Au stade pachytène, les chromosomes homologues de chaque paire subissent un enroulement intense, devenant plus courts et plus épais. La fin de ce stade est souvent désignée sous le terme de strepsitène, où les chromosomes commencent à se diviser (Figure 6 C).

d/ Stade diplotène : Au stade diplotène, les chromosomes homologues recombinants commencent à se séparer, mais ils restent connectés aux points où les croisements ont eu lieu. Ils demeurent attachés en des endroits spécifiques où une structure en forme de croix, appelée chiasma, se forme grâce à un phénomène particulier appelé crossing-over (Figure 6 D).

e/ Stade diacinèse : Au stade de la diacinèse, les chromosomes homologues se séparent. Les chromosomes peuvent atteindre un niveau maximal de condensation, devenant très courts et plus facilement manipulables pour les mouvements ultérieurs qu'ils subiront (Figure 6 E).

Pendant ce stade, le nucléole ainsi que la membrane nucléaire disparaissent, et le fuseau mitotique se forme.

- **Métaphase I** : Les paires de chromosomes homologues s'alignent à la plaque équatoriale, guidés par les microtubules du fuseau. C'est le hasard qui détermine lequel des deux homologues se place d'un côté ou de l'autre de la plaque
- **Anaphase I** : Les chromosomes homologues migrent vers les pôles du fuseau.
- **Télophase I** : Elle est identique à celle de la mitose, elle aboutit à la formation de deux cellules à n chromosomes.

I-4-1-2- La division équationnelle

Cette seconde division, ou division équationnelle, et ses différentes phases sont très semblables à celle d'une mitose classique, mais elle ne fait intervenir que n chromosomes. A la fin de cette division, il y a quatre cellules haploïdes génétiquement recombinaées (Laberche, 2010).

- **La prophase II** : est une phase brève où les filaments de chromatine constituant les chromatides sœurs d'un chromosome se condensent.
- **Métaphase II** : Les chromosomes sont à l'équateur de la cellule. Les chromatides sœurs ne sont pas colées sur toute leur longueur contrairement à ce qu'on observe à la mitose.
- **Anaphase II** : Les centromères se divisent et les chromatides sœurs se séparent et migrent vers les pôles opposés.

- **Télophase II** : Les chromatides se décondensent pour former quatre tétraspores.

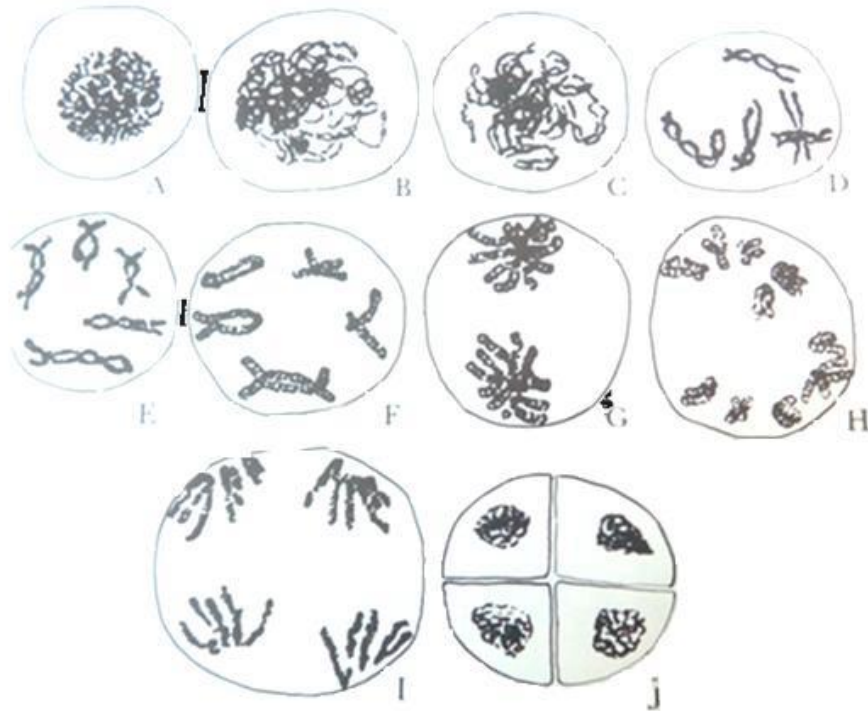


Figure 6 : Les Différents stades de la méiose : **A** : leptotène. **B** : zygotène. **C** : pachytène. **D** : diplotène. **E** : diacinèse. **F** : métaphase I. **G** : anaphase I. **H** : métaphase II. **I** : anaphase II. **J** : télophase II (Deysson, 1976).

I-4-2- Les anomalies de la méiose

L'étude des différents stades de la méiose fournit des informations détaillées sur le comportement chromosomique et la fertilité d'une espèce. Les facteurs environnementaux et épigénétiques peuvent influencer le déroulement du processus méiotique en modifiant les gènes qui contrôlent les différents événements méiotiques. Il en résulte des irrégularités qui peuvent altérer le cours normal de la méiose et conduire à une diminution de la fertilité des gamètes donc la stérilité de la plante (Lavinsky *et al.*, 2017). Les plantes peuvent présenter diverses irrégularités (ou anomalies) lors de la méiose, parmi lesquelles on peut citer les suivantes :

- **Cytomixie**

La cytomixie est définie comme la migration de la chromatine d'une cellule à une autre à travers des canaux de connexion cytoplasmiques entre cellules adjacentes. Ce phénomène a été observé pour la première fois par Körnicke (1901) dans les cellules mères de pollen (PMC) du *Crocus sativus*. Il se produit dans de nombreuses espèces (Cheng *et al.*, 1975;

Omara, 1976) et a principalement été observé dans les PMC, ainsi que dans les cellules tapétales et les cellules ovariennes de diverses plantes. La cytomixie est très probablement un phénomène naturel régulé par des facteurs génétiques directs, comme le suggèrent Mantu et Sharma (1983), bien que des facteurs physiologiques puissent également influencer sa manifestation (Bellucci et al. 2003).

➤ **Fuseaux irréguliers**

Le fuseau tripolaire, également connu sous le nom de fuseau convergent ou fuseau en V, est une organisation irrégulière des fuseaux mitotiques causée par une mutation dans le gène responsable de la division méiotique. Cette aberration peut conduire à la fusion de deux noyaux proches, entraînant la formation de triades plutôt que de tétrades à la fin de la méiose, avec un noyau non réduit ($2n$) (Zhang, 1988; Godoy *et al.* 2012; Damiao do Nascimento *et al.* 2014).

➤ **La division asynchrone**

L'origine de cette anomalie réside dans une perturbation qui touche un seul pôle nucléaire. La division méiotique se bloque dans un pôle et se poursuit dans l'autre, ce qui entraîne la formation de triades (Zhang et al. 1988).

➤ **Micronoyaux**

La formation des micronoyaux est due à une ségrégation irrégulière des chromosomes pendant la division cellulaire. Ces micronoyaux se forment soit à partir de fragments de chromatide/chromosomes acentriques qui sont retardés, soit à partir de chromosomes entiers qui ne se lient pas aux fuseaux pendant l'anaphase en raison d'un dysfonctionnement d'un fuseau ou d'un gène de contrôle de l'anaphase. De plus, des micronoyaux peuvent se former suite à la condensation de chromosomes retardés et à la condensation de matériel génétique issu de la cytomixie (Kiihl *et al.* 2011; Fenech *et al.* 2011).

➤ **Ponts chromatiques**

Defani-Scoarize et al. (1995a-b, 1996) ont signalé l'existence de ponts chromosomiques dans les lignées de cellules mères de pollen consanguines, résultant de réarrangements chromosomiques ou de fusions chromosomiques. Ces ponts sont principalement causés par des inversions paracentriques hétérozygotes et peuvent également causés par la rupture et la fusion des chromatides (Newman, 1966). Wang *et al.*, (2010) ont souligné que les anomalies

dans l'appariement chromosomique contribuent à la formation de chromosomes et de micronoyaux retardataires (Defani *et al.*, 1995).

➤ **Chromosomes retardataires**

Singhal et Kumar (2008) ont expliqué que ce phénomène est une conséquence de la cytomixie. De Godoyl (2012) a également observé ce phénomène. Les chromosomes retardataires peuvent être causés par des facteurs environnementaux tels que les rayons X, la température et les éléments du sol. Ce phénomène peut également être dû à la présence de gènes mutants ou à des facteurs abiotiques tels que des températures élevées. Les chromosomes non orientés résultent d'un défaut de liaison des fibres du fuseau aux kinétochores des chromosomes (Pagliarini, 2000; Kiihl *et al.*, 2011).

➤ **Chromosomes précoces**

La migration précoce des chromosomes en métaphase I a été observée chez les individus où certains chromosomes homologues se sont séparés et ont migré précocement vers les pôles opposés. D'après Kiihl *et al.* (2010), la migration précoce vers les pôles peut être due à l'absence ou à la terminaison précoce des chiasmas. Les chiasmas sont formés après croisement pendant la prophase I, ayant pour fonction de maintenir les chromosomes homologues ensemble jusqu'au début de l'anaphase I. Pagliarini (2000) a suggéré qu'une migration précoce des chromosomes aux pôles peut être due à la présence de gènes asynaptiques et désynaptiques (Damião, 2014).

➤ **Triades**

La présence de fuseaux tripolaires pendant la métaphase II et l'anaphase II conduit à la fusion des noyaux pendant la télophase II. Ce phénomène est également appelé fuseau convergent ou fuseau en V, et cette irrégularité peut entraîner la fusion de deux noyaux proches, ce qui donne naissance à des triades plutôt qu'à des tétrades à la fin de la méiose. La convergence de deux fuseaux en un seul pôle cellulaire entraîne donc la formation de seulement trois noyaux lors de la télophase II, l'un d'entre eux étant à $2n$ et les deux autres à n , formant ainsi des triades (Godoy *et al.*, 2012).

➤ Dyades

La connexion entre les méiocytes se fait par des ponts cytoplasmiques dont le nombre varie, ce qui aboutit à la formation d'une dyade durant la polymérisation. Au lieu de s'organiser de manière parallèle, les zones se disposent de manière transversale ou convergente. Le fuseau en forme de V qui en résulte peut conduire à la convergence des noyaux pendant la télophase, pouvant ainsi fusionner et générer deux noyaux à $2n$ chromosomes (Damião, 2014).

I-5- La cléistogamie

La cleistogamie est un système de reproduction sexuée défini comme la production de fleurs autogames fermées en permanence qui a intrigué les botanistes pendant des siècles comme un système important que l'on retrouve dans une grande variété de taxons végétaux. Le terme a été utilisé pour la première fois par Kuhn en 1867 pour décrire des fleurs en forme de bourgeon qui ne s'ouvrent jamais mais qui se transforment en fruits. Il a appelé ces fleurs cléistogames (littéralement, "mariage fermé"). Darwin (1877) a noté que chez une espèce cléistogame, ces fleurs peuvent être le seul type produit ou elles peuvent également apparaître ensemble sur la même plante avec des fleurs ouvertes, typiquement pollinisées par les insectes (connues sous le nom de fleurs chasmogames ou "mariage ouvert").

Malgré l'attention portée aux espèces cléistogames dans la littérature, l'étendue de la cléistogamie chez les angiospermes n'est pas encore totalement comprise. Les espèces et les genres ont été fréquemment répertoriés dans la littérature (Darwin, 1877 ; Kerner von Marilaun, 1902 ; Ritzerow, 1908 ; Rickett, 1932 ; Uphof, 1938 ; Camp Amp; Gilly, 1943 ; Maheshwari, 1962), mais les études les plus récentes sur la cléistogamie (Connor, 1979 ; Lord, 1981 ; Campbell *et al.*, 1983) datent de plus de 20 ans. En outre, deux de ces études (Connor, 1979; Campbell *et al.*, 1983) se concentrent strictement sur les Poaceae, et un article plus récent (Plitmann 1995) se concentre sur les dimorphismes floraux en général.

Il existe également des divergences dans la littérature quant à la définition d'une espèce cléistogame, la confusion peut être due à l'utilisation du terme "cléistogamie" pour se référer à des espèces dont les fleurs sont uniquement CL et à celles qui produisent à la fois des types de fleurs CL et CH. Par rapport à d'autres systèmes de reproduction, l'évolution de la cléistogamie a reçu relativement peu d'attention, malgré les progrès récents des techniques moléculaires qui ont stimulé le développement de phylogénies complètes pour les angiospermes (par exemple, Soltis *et al.*, 2000, 2005 ; Angiosperm Phylogeny Group, 2003 ; Hilu *et al.*, 2003). La mise en correspondance du caractère cléistogame sur ces phylogénies permettrait d'estimer le nombre de fois où la cléistogamie a évolué. L'objectif de cette étude est de clarifier les différents types de cleistogamie qui existent, de quantifier la fréquence de la cléistogamie au sein des genres et des espèces d'angiospermes, d'estimer le nombre de fois que la cleistogamie a évolué chez les angiospermes et identifier les facteurs écologiques susceptibles de favoriser l'évolution de la cleistogamie chez les plantes.

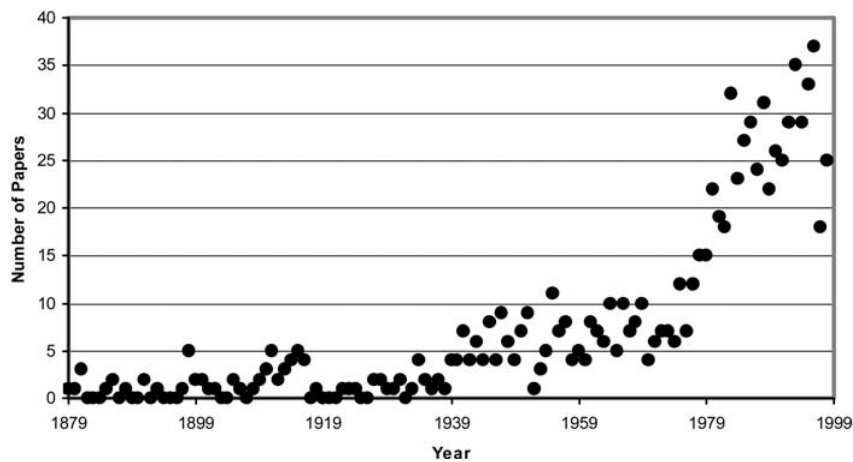


Figure 7 : Nombre d'articles publiés dans 23 revues botaniques et écologiques dans un intervalle de 120 ans (1879-1999) qui citent soit la "cleistogamie". Les données ont été obtenues grâce au moteur de recherche en ligne JSTOR (<http://www.jstor.org>), qui dispose d'un mur mobile de 5 ans (Culley, 2007).

I-5-1- Types de cleistogamie

La cléistogamie est un système de reproduction sexuelle dans lequel il n'y a pas la nécessité d'une visite de la fleur par un agent pollinisateur. La fécondation au sein des fleurs se fait sans intervention du pollinisateur, soit par transfert direct des grains de pollen de l'anthere au stigmate, soit par germination des grains de pollen dans l'anthere et croissance du tube pollinique dans le style adjacent à l'intérieur du bourgeon (Mayers et Lord, 1983b) pour cela, la cléistogamie diffère donc des systèmes asexués tels que l'apomixie, dans lesquels la double fécondation n'est pas nécessaire pour la formation complète des graines. Les fleurs ouvertes chasmogames peuvent être pollinisées par des visiteurs floraux ou peuvent parfois

s'autopolliniser grâce à l'autofécondation. Trois types principaux de cléistogamie qui varient en termes de voies de développement (Figure 8). Dans tous les cas, les formes florales sont influencées à des degrés divers.

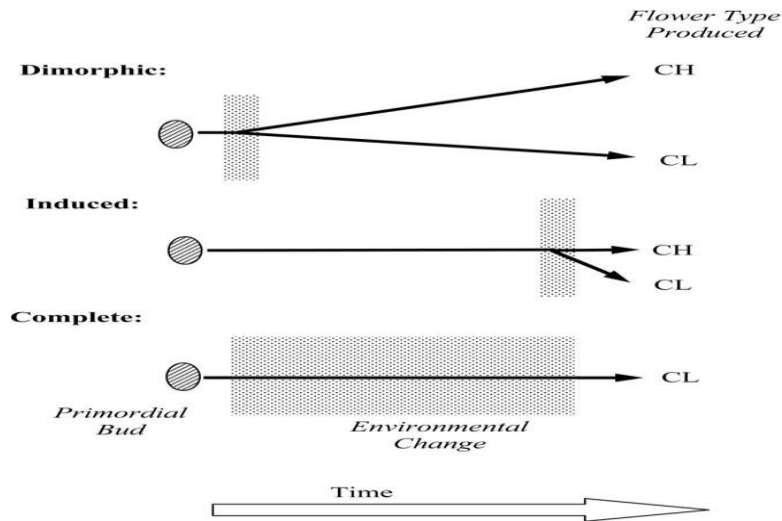


Figure 8 : Exemples de voies qui aboutissent à la production de trois types différents de cleistogamie. Les bourgeons primordiaux d'origine et une période de changement environnemental (cases ombrées) survenant au cours de la séquence de développement sont représentés. Dans la cleistogamie dimorphique, le bourgeon primordial est déjà prédéterminé pour se développer en une fleur chasmogame (CH) ou cléistogame (CL). La production effective de l'un ou l'autre type de fleur (indiqué par des lignes) dépend de l'environnement. Dans le cas de la cléistogamie induite, il n'y a pas de trajectoire de développement fixe n'a pas de trajectoire de développement fixe, et chaque bourgeon se développera en une fleur CH à moins que l'environnement n'empêche son ouverture mécanique. Enfin, tous les bourgeons des espèces à cléistogamie complète se développent en fleurs CL. (Culley, 2007).

I-5-1-1- La cléistogamie dimorphique

La cléistogamie dimorphique est la même que la catégorie de cléistogamie vraie de Lord (1981), dans laquelle les différences marquées entre les morphologies florales CL et CH résultent d'un développement divergent. Les fleurs CL sont modifiées au début de leur développement et sont caractérisées par une réduction de la taille de la corolle et du nombre d'étamines par rapport aux fleurs CH. Sur une plante donnée, les deux types de fleurs peuvent apparaître en même temps mais à des positions différentes (séparées dans l'espace ; stratégie multiple de Lloyd (1984]), ou ils peuvent être produits séquentiellement au cours de la saison (stratégie conditionnelle de Lloyd (1984]). La séparation florale spatiale est évidente, par exemple chez *Amphicarpaea bracteata* (Trapp et Hendrix, 1988) et *Vigna minima* (Gopinathan et Babu, 1987), les fleurs CH aériennes et CL souterraines sont toutes les deux produites.

Les changements de type floral au cours de la saison dans la cléistogamie dimorphique sont dus à des altérations dans la production initiale de bourgeons primordiaux, qui se développent ensuite en fleurs CH ou CL. Les bourgeons individuels sont incapables de passer d'une forme florale à une autre une fois que la voie de développement a été déterminée. Par exemple, si l'environnement lumineux de *Viola pubescens* diminue soudainement, tous les bourgeons CH des plantes individuelles avortent généralement en quelques jours, et les plantes commencent à produire de nouveaux bourgeons CL peu de temps après (Culley, 2002). La capacité à produire des fleurs CH et CL a une base génétique discrète, qui est affectée par un certain nombre de facteurs abiotiques et biotiques tels que les niveaux de lumière, la disponibilité des nutriments, la disponibilité des pollinisateurs et l'herbivorie (Culley, 2007).

I-5-1-2- Cléistogamie complète

Définie comme la production de fleurs cléistogames uniquement, sur un individu, la cléistogamie complète a été rapportée chez plusieurs espèces, notamment chez les Orchidées et les Graminées. Par exemple, l'endémique *Schiedea trinervis*, espèce endémique d'Hawaï, s'autopollinise dans le bourgeon, qui ne s'ouvre jamais (Wagner *et al.*, 2005). Cette catégorie a été maintenue dans les études précédentes sur la cléistogamie (Hackel, 1906 ; Connor, 1979 ; Lord, 1981).

I-5-1-3- La cléistogamie induite

Il s'agit de la même catégorie que celle de la pseudocléistogamie de Lord (1981) et de la cléistogamie écologique d'Uphof (1938). Dans ce cas, l'environnement arrête le développement des fleurs CH avant l'anthèse et entraîne une incapacité mécanique de la fleur à s'ouvrir, ce qui aboutit à la production d'une fleur CL (Schoen et Lloyd, 1984). Contrairement à la cléistogamie dimorphique, il n'y a pas de différences morphologiques entre les fleurs CL et CH autres que l'absence d'expansion florale et d'anthèse chez les fleurs CL (Lord, 1981). Le passage de la production de fleurs CH à la production de fleurs CL se produit plus rapidement au cours de la saison dans cette catégorie que dans la cléistogamie dimorphique. En outre, il n'y a pas de trajectoire de développement fixe qui diffère entre les deux types floraux. Dans cette catégorie, les conditions défavorables telles que la sécheresse et les basses températures favorisent souvent la production de fleurs de CL (Uphof, 1938).

II- MATÉRIEL ET MÉTHODES

II- Matériel et Méthodes

II-1- Etude de la méiose

II-1-1- Matériel végétal utilisé et les stations d'études

Pendant la période de floraison, nous avons récolté des boutons floraux de plusieurs populations et nous les avons mis directement dans des tubes contenant du fixateur. Le Tableau 3 montre les différentes populations où nous avons récolté et les dates de récoltes (voir pages 22).

Tableau 3 : Date de récolte de quatre espèces de différentes populations.

Espèces	Origine des populations	Date de récolte	Altitude	coordonnées GPS
<i>M. polymorpha</i>	Campus universitaire Targua Ouzemour	22.03.2023	/	/
	Bouira	07.04.2023	/	/
<i>M. minima</i>	Oued zhour	27.04.2023	/	/
	Ahrik ath ali	08.04.2023	/	36° 32' 05'' N 4° 34' 52'' E
	Boudjellil	01.04.2023	280m	36° 32' 06'' N 4° 26' 51'' E
<i>M. murex</i>	Thilemmathine	08.04.2023	673m	36° 32' 26'' N 4° 34' 07'' E
	Charfa	08.04.2023	759m	36° 32' 28'' N 4° 33' 33'' E
	Campus universitaire Targua Ouzemour	04.04.2023	/	/
<i>M. lesinsii</i>	Md said ali ouyidir	08.04.2023	535m	36° 32' 05'' N 4° 34' 07'' E
	Thilemmathine	08.04.2023	673m	36° 32' 26'' N 4° 34' 07'' E

II-1-2- Réalisation de l'herbier

Les plantes récoltées lors de notre stage pratique dans les différentes stations sont mises en herbier dans du papier journal.

Quelques semaines plus tard, nous avons obtenu des plantes aplaties et séchées sur du papier blanc (A4, A3) les plantes ont été collées avec un scotch blanc à une seule face. Chaque plante est étiquetée en mettant le nom scientifique de la plante, la date et le lieu de récolte, la description de la plante et le nom de récolteur. Tous les herbiers réalisés ont été scannés avec un scanner EPSON GT-2000, les figures 9-12 montrent quelques exemples.

Nous avons réalisé quelques herbiers de plantes entières avec racines, tiges, feuilles, fleurs. L'ensemble des herbiers réalisés sont déposés au niveau de laboratoire de recherche d'Ecologie et Environnement.



Figure 9 : Individus complets de *M. polymorpha*. **a :** Récolté au Campus universitaire Targua Ouzemour Bloc de recherche ; **b :** Récolté à Bouira



Figure 10 : Individus complets de *M. minima*. **a :** Récolté à Ahrik Ath Ali 'Ighzer Amokrane; **b :** Récolté à Boudjellil.

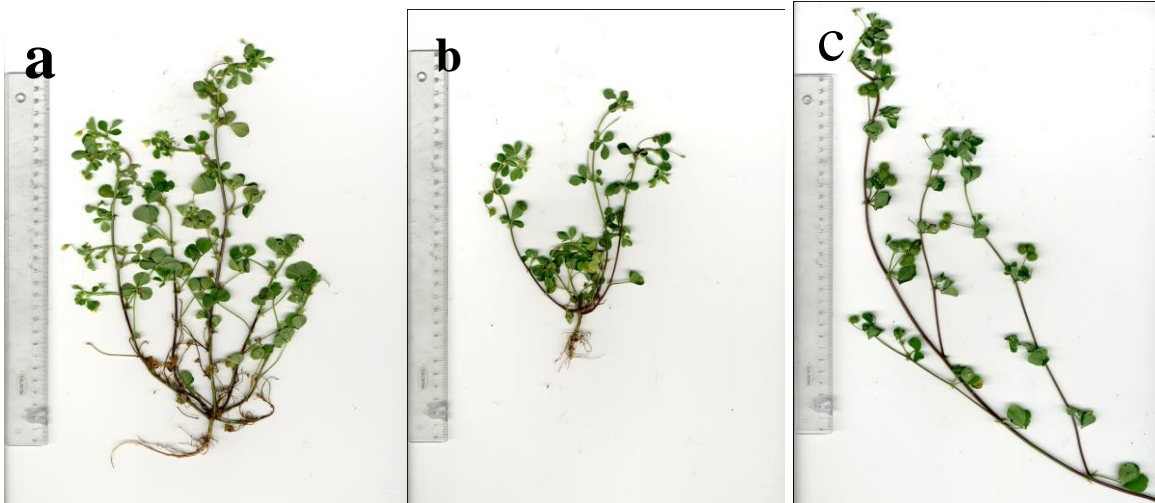


Figure 11 : Individus complets de *M. murex*. **a :** Récolte à Cherfa (Ighzer Amokrane) ; **b :** Récolte à Thilemmathine (Ighzer Amokrane); **c :** Récolte à Aboudaou (Béjaïa).



Figure 12 : Individus complet de *M. minima* récolte à Oued Zhou.

II-1-3- Préparation des solutions

-Préparation du fixateur

Le fixateur Carnoy II est un mélange composé de : 6 volumes d'éthanol, 3 volumes de chloroforme et 1 volume d'acide acétique. Il est préparé sous une hotte aspirante.

Son rôle dans la cytogénétique est d'assurer un arrêt rapide des divisions cellulaires sans détruire la structure chromosomique, et assurer une meilleure conservation pour la disponibilité du matériel végétal pendant une longue période par son rôle aseptisant lorsqu'il est conservé à l'obscurité à 4°C (Jahier *et al.* 1992).

-Préparation d'acide chlorhydrique (HCL 1N)

La solution d'acide chlorhydrique se prépare comme suit : Verser 180 ml d'HCL (35%, $d=1.17$) puis ajuster avec de l'eau distillée jusqu'à 1L. Le but de cette étape est : Ramollir les méristèmes primaires, de rompre des liaisons glucidiques des bases puriques, libérer les groupements aldéhydes de l'ADN et facilite par ailleurs l'écrasement et l'étalement des cellules.

-Préparation du colorant

Le colorant utilisé est à base d'orcéine lacto-propionique et il est préparé selon Dyer (1963), modifié selon Løve and Løve (1975). Dans un grand erlenmeyer, on dissout 2g d'orcéine dans 23ml d'acide propionique et 23ml d'acide lactique, ensuite on ajoute de l'eau distillée jusqu'à 100ml et on agite bien la solution puis on filtre. La solution d'orcéine obtenue se conserve longtemps dans un flacon en verre fumé après filtration.

II-1-4- Les principales étapes de l'analyse de la méiose

- **Fixation** : Pendant la période de floraison on a prélevé des boutons floraux sur le terrain et on les a mis immédiatement dans des tubes à essais contenant du fixateur carnoy II.

- **Récupérations des anthères** : Sous un stéréomicroscope, on a séparé chaque fleur de son bouton floral on se servant de deux pinces, puis chaque fleur sélectionnée est prise isolément dans une goutte d'eau sur une lame (il faut qu'elle soit bien nettoyée et neutre) afin qu'elle puisse être disséquée avec deux aiguilles pour en faire sortir les dix anthères qu'on sépare l'une de l'autre. À l'aide d'une aiguille on récupère la goutte d'eau pour sécher la lame. La principale difficulté dans cette étape c'est savoir prendre le bon stade au moment où les CMPs subissent la méiose.

- **Coloration** : Cette étape consiste à mettre sur les anthères récupérées précédemment sur la lame préparée une goutte d'HCL et chauffer au bain marie pendant 1 min à 60°C puis on récupère à l'aide d'une aiguille l'HCl afin d'éviter la dilution du colorant ensuite on met une goutte de colorant (orcéine) et on le met à chauffer pour une deuxième fois au bain marie mais cette fois pendant 3minutes à 60°C. Puis recouvrir d'une lamelle en mettant du papier absorbant sur la lamelle pour éliminer l'excès du colorant en exerçant d'une légère pression avec le pouce pour étaler les anthères.

- **Observation** : Une fois la lame est prête, on passe la préparation au microscope optique pour observer les cellules en méiose à l'aide d'un objectif de faible grossissement (x10) puis

au grossissement (x40) pour une bonne visualisation de l'image. Une fois qu'on a pu réaliser une bonne observation on va leur mettre du vernis à ongle transparent pour ensuite les photographier.

- **Photographie** : A l'aide d'un microscope trinoculaire (OPTIKA-B-350) qui est intégré par un appareil photo, les lames lutées vont être photographiées avec un objectif de grossissement (G=100) après avoir mis une goutte de l'huile à immersion, On photographie les différents stades de division méiotique où l'on peut identifier aussi les anomalies méiotiques.

II-2- Etude de la mitose

II-2-1- Matériel végétal utilisé et les stations d'études

L'origine géographique et les dates de récolte des graines pour 5 espèces de différentes populations. Le tableau 4 montre les différentes populations qu'on a récoltées et leurs dates de récoltes accompagné de la date de mise à germer et la date de germination.

Tableau 4 : Tableau de récolte de différentes espèces de différentes populations.

Espèce	Population	Date de récolte	Date de mise à germer	Date de germination
<i>M. polymorpha</i>	Ain Aloui	10.07.2011	06.03.2023	08.03.2023
	Ain Turk	06. 2011	11.03.2023	14.03.2023
	Tizi Ouzou (zakhnoune)	06.08.2010	11.03.2023	13.03.2023
	Bouira (vers la route de Haizer)	06.08.2010	11.03.2023	13.03.2023
	Bouira	10.03.2023	18.03.2023	20.03.2023
<i>M. lesinsii</i>	Vehloul	30.03.2005	10.03.2023	12.03.2023
<i>M. murex</i>	Thilemmathine	18.03.2023	20.03.2023	22.03.2023
<i>M. arabica</i>	Ighzer Amokrane	02.06.2005	10.03.2023	13.03.2023
<i>M. minima</i>	Allaghen	16.10.2004	12.03.2023	14.03.2023

II-2-2- Préparation des solutions

-Préparation du prétraitement à 8-hydroxyquinolcine

Le prétraitement utilisé est le 8-hydroxyquinoléine 0.002 M est préparé comme suit : Dans un flacon en verre on dissout 0.28g de 8-hydroxyquinoléine dans 1000 ml d'eau distillée, en agitant bien la solution jusqu'à ce que la poudre de 8-hydroxyquinoléine se dissout complètement.

Cette étape a pour but : De bloquer les divisions mitotiques en métaphase, de contracter les chromosomes et d'obtenir un grand nombre de plaques métaphasiques.

-Préparations du fixateur

Le fixateur utilisé est celui de Carnoy I préparé avec : 3V d'éthanol et 1V d'acide acétique. Le but de cette étape est : Détruire toute vie cellulaire, de bloquer les divisions

cellulaires en conservant l'intégrité structurale des chromosomes et protéger les chromosomes de l'action de l'agent mitoclasique du prétraitement.

-Préparation d'acide chlorhydrique (HCL 1N)

C'est le même acide chlorhydrique (HCL 1N) qu'on a utilisé dans la méiose

-Préparation du colorant

Le colorant utilisé dans cette étape est l'orcéine lactopropionique, c'est le même colorant qu'on a utilisé pour la méiose.

II-2-3-Les étapes de préparation des lames microscopiques de la mitose

- **Récolte des gousses** : Nous avons ramassé des gousses de six espèces de différentes populations du genre *Medicago* sur lesquels notre étude a porté. Les gousses ramassées ont été récoltées dans des sachets en papiers portant le nom du genre, espèce, population et la date de récolte.

- **Germination des graines** : Après avoir ramassé, les gousses on a récupéré ses graines puis on les a grattées avec une lime à ongle (pour accélérer la germination). Enfin on les a mis à germer à une température ambiante dans des boites de pétri tapissées de papier absorbant imbibé d'eau à l'obscurité. Dans chaque boite de pétri comportant les graines est placée une étiquette portant le nom de la station et la date de mise à germination (figure 13). La durée de la germination varie entre 2 à 3 jours tout dépend de la population mise à germer.



Figure 13 : Graines germées dans des boites de pétri

-**Prétraitement** : On prélève les pointes des racines avec des pinces propres et on les met immédiatement dans un tube à essai contenant la solution 8-Hydroxyquinoleine 0.002 M pour une durée de 2 heures à une température ambiante.

-**Rinçage** : Après le prétraitement on passe au rinçage avec de l'eau distillée pour éliminer l'excès de l'agent mitoclasique.

-**Fixation** : Après le rinçage on transfère les pointes des racines dans un tube à essai contenant la solution du fixateur Carnoy I.

-Hydrolyse à HCL 1N : Les pointes des racines sont ensuite transférées dans une solution d'HCL 1N et mises à hydrolyser dans un bain marie à une température de 60°C pendant 10 minutes.

-Coloration : Les pointes des racines sont transférées dans le colorant l'orcéine lactopropionique et soumises pendant 20 minutes à une température de 60°C au bain marie.

-Préparation des lames : Sous la loupe binoculaire, avec une pince propre on prend une racine et on la met sur une lame de microscope. Et avec la pointe de la seringue on coupe l'extrémité de la racine colorée en rose foncé. Puis on ajoute une goutte du colorant (orcéine lactopropionique), ensuite on place la lamelle. Après avoir éliminé le surplus de colorant à l'aide du papier absorbant, on tapote à l'aide d'une gomme à crayon sur la lamelle en prenant soin de ne pas déplacer la lamelle.

-Observation : Une fois la lame est prête on passe la préparation au microscope optique pour observer les cellules en mitose à l'aide d'un objectif de faible grossissement (x10), puis au grossissement (x40) pour une bonne visualisation de l'image. Une fois qu'on a pu réaliser une bonne observation on va leur mettre du vernis à ongle transparent pour ensuite les photographier.

-Photographie : A l'aide d'un microscope trinoculaire (OPTIKA-B-350) qui est intégré par un appareil photo, les lames lutées vont être photographiées avec un objectif de grossissement (G=100) après avoir mis une goutte de l'huile à immersion.

Remarque : Pour l'étude de la mitose on a utilisé aussi la technique de plantation des graines

II-4-Etude de la fertilité pollinique

Pour l'étude de la fertilité pollinique on a pris le même matériel végétal utilisé pour la méiose qui est les fleurs avant l'anthèse.

II-4-1-Préparation du colorant au bleu de coton

La technique utilisée est inspirée du protocole Mertens et Hammersmith (1998) qui consiste à réaliser une coloration au bleu de coton, elle se prépare comme suit : 8 volumes de glycérine, 4 volumes d'acide lactique à 85%, 4 volumes de solution de phénol (1g de cristaux de phénol + 4ml d'eau distillée), 2 volumes d'eau distillée et 1 volume de bleu d'Aniline 1% Bien mélanger puis conserver dans un flacon en verre fumé.

II-4-2- Technique de coloration et mesure des grains de pollen

Sous la loupe binoculaire sur une lame de microscope dans une goutte d'eau, nous avons isolé les anthères à l'aide de deux aiguilles pour libérer le pollen, puis nous avons écrasé celles-ci afin de récupérer le maximum de grains de pollen. Nous avons éliminé les débris des anthères vides, ensuite nous avons laissé sécher la goutte d'eau contenant les grains de pollen à l'air libre, enfin nous avons ajouté une petite goutte de bleu de coton sur les grains de pollen et nous avons recouvert d'une lamelle. Nous avons laissé agir le colorant pendant environ 15 à 30 minutes à température ambiante pour assurer une bonne coloration puis nous passons à l'observation au microscope photonique.

- **Observation** : Après coloration, le pollen est observé au microscope optique à l'objectif (x10).

-**Evaluation du taux de fertilité pollinique** : Nous avons compté entre 400 et 500 grains de pollen par fleur, sont observés pour compter le nombre de grains normaux (fertile) et le nombre de grains anormaux (stérile).

Les grains de pollen colorés uniformément d'un bleu foncé et ayant une forme bien définie sont considérés comme viable et fertiles, alors que ceux de forme et de taille anormales et non uniformément colorés sont considérés non viable et stériles.

Taux de la fertilité pollinique (TF) est calculé selon la formule suivante :

$$TF(\%) = \frac{F}{(F+S)} \times 100$$

Avec :

TF : Taux de fertilité pollinique (en %)

F : Nombre de grains de pollen fertiles (normaux)

S : Nombre de grain de pollen stériles (anormaux)

II-4-3- Mesure de la taille et l'analyse statistique des grains de pollen

Nous avons cherché à savoir si la taille des grains de pollen varie entre les différentes populations étudiées ou pas. Et pour cela, nous avons mesuré les dimensions du pollen sur 50grains par population, par une observation directe sous microscope optique (Grossissement x40).

Les données sur tailles des grains de pollen ont été analysées par une ANOVA (suivie du test HSD) et une ACP en utilisant les programmes de Statistica 8.0 (StatSoft, 2007).

II-5-Etude de la cléistogamie

Pour l'étude de la cléistogamie, nous avons pris le même matériel végétal utilisé pour la méiose et observé le stigmate des fleurs.

II-5-1- Les solutions utilisées

Dans cette étape, deux colorants différents ont été utilisés.

Le 1^{er} colorant : l'orcéine lactopropionique est le même colorant utilisé dans la méiose et la mitose.

Le 2^{ème} colorant : colorant au bleu de coton est le même colorant utilisé pour la fertilité pollinique.

II-5-2- Technique de coloration du carpelle

Sous la loupe binoculaire, sur une lame de microscope, nous avons isolé le carpelle d'une fleur à l'aide de deux aiguilles puis nous avons ajouté une petite goutte de colorant de l'orcéine lactopropionique et une petite goutte de colorant de bleu de coton sur le carpelle et nous avons recouvert d'une lamelle. Nous avons laissé agir le colorant pendant au moins 10minutes puis nous passons à l'observation au microscope photonique.

Observation : Après coloration, le stigmate est observé au microscope optique à l'objectif (x10), puis au grossissement (x40) pour une bonne visualisation de l'image.

Photographie : A l'aide d'un microscope trinoculaire (OPTIKA-B-350) qui est intégré par un appareil photo, les lames observées vont être photographiées avec un objectif de grossissement (x4) puis au grossissement (x10).

III- RÉSULTATS

III-1-Dénombrements chromosomiques

Le dénombrement chromosomique a été réalisé sur des cellules méristématiques racinaires en division mitotique au stade métaphase et sur des cellules mères polliniques au stade de la Métaphase I pour *M. polymorpha* et juste sur les CMPs pour *M. murex*, *M. minima* et *M. lesinsii*. Les résultats du dénombrement chromosomique sont enregistrés dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 : Dénombrements chromosomiques chez les populations des espèces étudiées.

Espèces	Populations	Ploidie	x	n	2n
<i>M. polymorpha</i>	Campus Targua ouzemour	2x	x=7	n=7	2n=14
	Bouira Ain Aloui				
<i>M. murex</i>	Thilemmathine	2x	x=7	n=7	2n=14
	Charfa				
	Campus Targua Ouzemour				
<i>M. minima</i>	Ahrik Ath Ali	2x	x=8	n=8	2n=16
	Boudjelil				
	Oued Zhour				
<i>M. lesinsii</i>	Md Said Ali Ouyidir	2x	x=8	n=8	2n=16
	Thilemmathine				

La Figure 14 illustre les dénombrements chromosomiques réalisé pour les quatre espèces du genre *Medicago* étudiées. Une diploïdie de $2n=2x=14$ a été révélée chez *M. polymorpha* (population Ain Aloui) en métaphase durant la mitose. Un nombre chromosomique de $n=7$ a été observé chez les deux espèces *M. polymorpha* (population Campus Targua Ouzemour, Bouira) et *M. murex* (population Thilemmathine, Charfa, Campus Targua Ouzemour) et un seul cytotype de 8 bivalents correspondant à $2n=2x=16$ chez *M. minima* (population Ahrik Ath Ali, Boudjelil et Oued Zhour) et *M. lesinsii* (population Md Said Ali Ouyidir, Thilemmathine) a été observé en méiose Métaphase I.

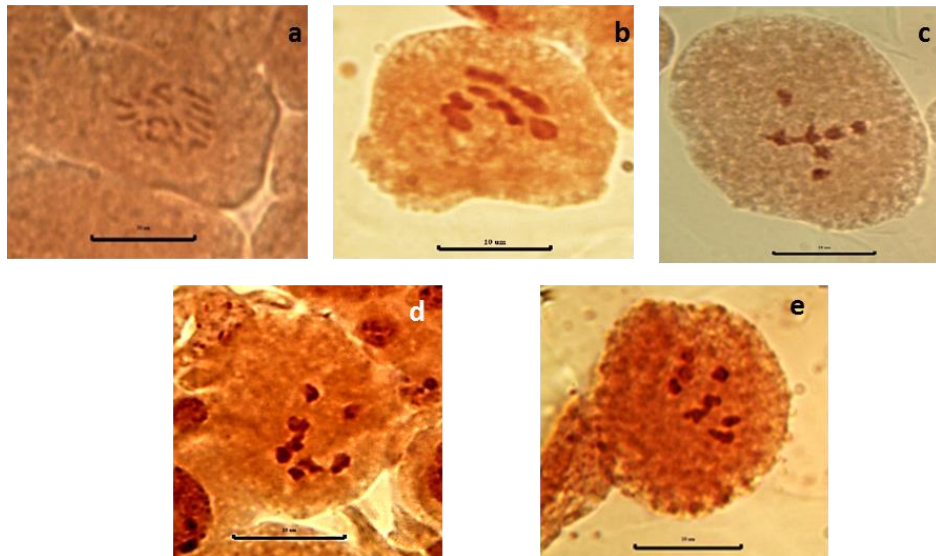


Figure 14: Dénombrements chromosomiques chez les espèces du genre *Medicago* étudiées. **a :** Métaphase mitotique chez *M. polymorpha* (Ain Aloui); **b:** Métaphase I en méiose chez *M. polymorpha* (Campus Targua Ouzemour); **c:** Métaphase I en méiose chez *M. murex* (Charfa); **c:** Métaphase I en méiose chez *M. minima* (Oued Zhour); **e:** Métaphase I en méiose chez *M. minima* (Boudjelil); **f:** Métaphase I en méiose chez *M. lesinsii* (Thilemmathine). Barre d'échelle est de 10 μm .

III-1-2- Les étapes de la méiose observés chez *M. polymorpha*, *M. murex*, *M. minima* et *M. lesinsi*.

La Figure 15 présente les différents stades de la méiose pollinique effectuée sur les cellules mères polliniques observées pour les différentes populations des quatre espèces étudiées du genre *Medicago*.

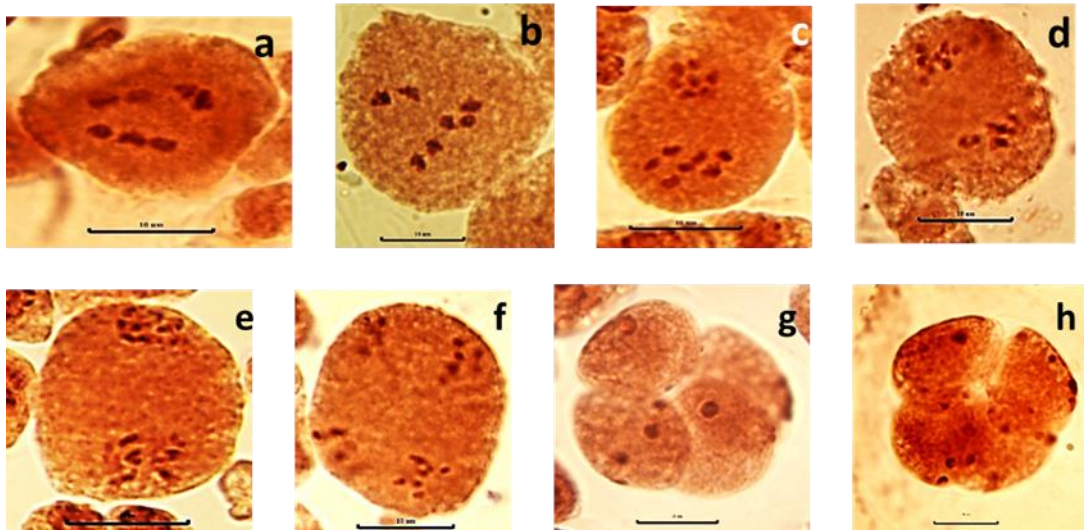


Figure 15: Les étapes de la méiose des cellules mères polliniques observées chez les espèces étudiées de *Medicago*. **a :** Métaphase I chez *M. polymorpha* (Bouira) ; **b:** Métaphase I chez *M. murex* (Charfa); **c:** Métaphase II chez *M. murex* (Charfa); **d:** Métaphase I chez *M. lesinsii* (Charfa) ; **e:** Anaphase I chez *M. minima* (Boudjellil); **f:** Anaphase II chez *M. minima* (Boudjellil); **g:** Tétrade chez *M. polymorpha* (Campus Targua Ouzemour); **h:** Tétrade *M. lesinsii* (Thilemmathine). Barre d'échelle est de 10 µm.

III-1-3- Les anomalies méiotiques observées chez *M. polymorpha*, *M. murex*, *M. minima*, *M. lesinsii*

Durant la division méiotique, nous avons observé des cytomixies en différents stade (Figure 16 a-c) et des triades (Figure 16 d) chez toutes les populations.

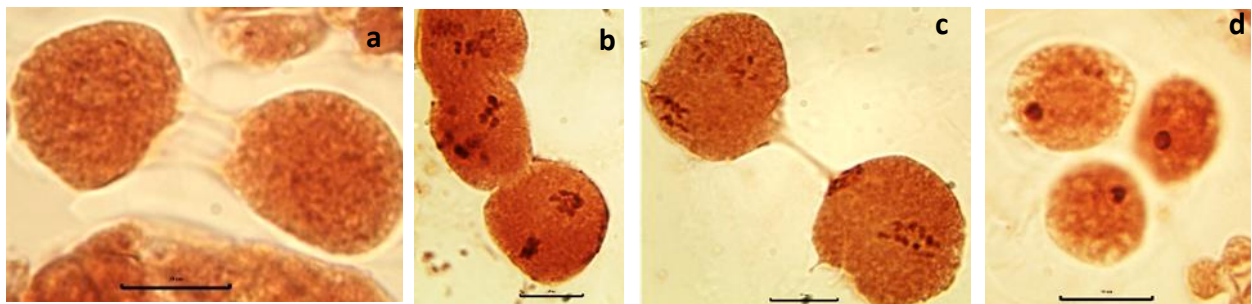


Figure 16 : Cytomixies et triades observées chez les populations étudiées. **a:** cytomixie de deux cellules en prophase ; **b:** cytomixie de trois cellules en métaphase II; **c:** cytomixie de deux cellules en anaphase II; **d:** triade. Barre d'échelle est de 10 µm.

III-1-3- Analyse de la fertilité pollinique

L'analyse de la fertilité pollinique a été réalisée sur des grains de pollen prélevés avant l'anthèse de cinq fleurs choisies au hasard pour chacune des populations. Les grains de pollen de forme régulière est bien coloré au bleu de coton sont fertiles (Figure 17 a-d) par contre les grains de pollen stériles (AN) sont d'une forme et couleur irrégulières (Figure 17 e-h) et des grains de pollen en début de germination (Figure 17 i-l).

La Figure 17 présente la forme des grains de pollen (fertile, stérile et germé) chez les différentes populations étudiées.

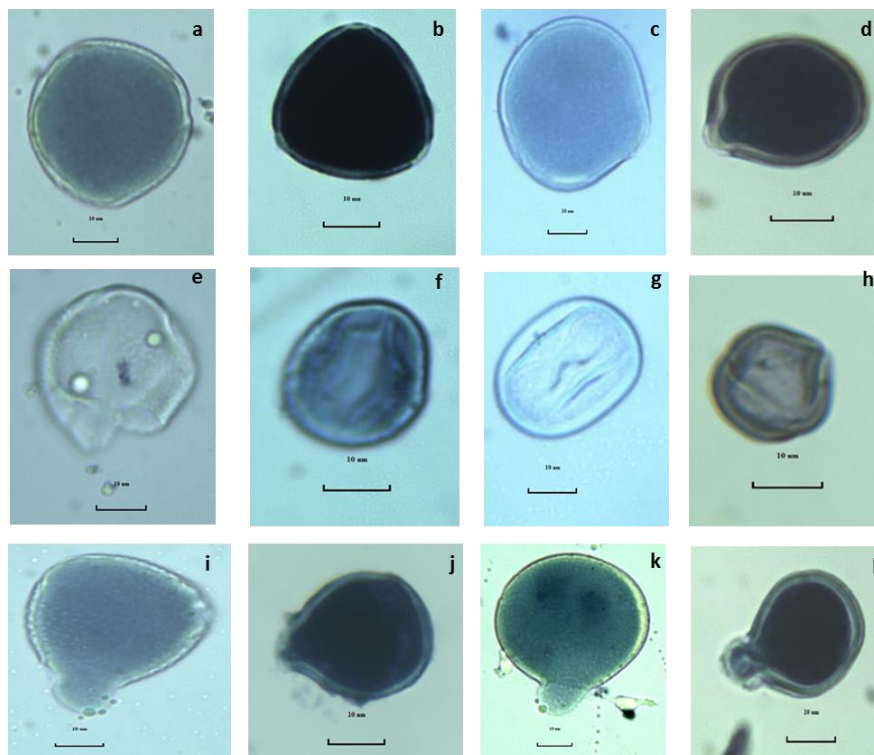


Figure 17 : Formes des grains de pollen des espèces étudiées. **a**: pollen fertile de *M. minima* (Oued Zhou); **b**: pollen fertile de *M. polymorpha* (Campus Targua Ouzemour); **c**: pollen fertile de *M. murex* (population Charfa); **d**: pollen fertile de *M. lesinsii* (Thilemmathine); **e**: pollen stérile de *M. minima* (Ahrik Ath Ali); **f**: pollen stérile de *M. polymorpha* (Campus Targua Ouzemour); **g**: pollen stérile de *M. murex* (Charfa); **h**: pollen stérile de *M. lesinsii* (Thilemmathine); **i**: pollen en début de germination de *M. minima* (Ahrik Ath Ali); **j**: pollen en début de germination de *M. polymorpha* (Campus Targa Ouzemour); **k**: pollen en début de germination de *M. murex* (Campus Targua Ouzemour); **l**: pollen en début de germination de e *M.lesinsii* (Md Said Ali Ouyidir).Barre d'échelle de 10 µm

Les taux de fertilité pollinique des populations estimés chez *M. polymorpha*, *M. murex*, *M. minima*, *M. lesinsii* sont enregistrés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Taux de fertilité polliniques (%) par fleurs et populations pour les quatre espèces de genre *Medicago* sect. *Leptospirae* étudiées.

Espèces	Populations	Taux de fertilité pollinique (%)					
		F1	F2	F3	F4	F5	Moyenne ±Ecart-type
<i>M. polymorpha</i>	Campus Targua Ouzemour	97.75	98.68	100	99.03	99.18	98.93±0.82
	Bouira	98.43	98.30	98.65	100	87.61	96.60±5.07
<i>M. murex</i>	Thilemmathine	97.82	100	100	98.94	98.06	98.96±1.03
	Charfa	98.85	99.36	94.00	99.15	98.41	97.95±2.00
	Campus Targua Ouzemour	100	99.84	99.76	99.69	99.53	99.76±0.15
<i>M. minima</i>	ahrik ath ali	99.23	99.82	99.64	98.93	99.32	99.38±0.35
	Boudjellil	98.64	100	99.33	100	98.16	99.22±0.73
	Oued Zhou	98.38	95.32	96.05	69.56	98.52	91.56±12.38
<i>M. lesinsii</i>	Md Said Ali Ouyidir	36.74	93.12	11.62	24.39	97.90	52.75±40.06
	Thilemmathine	97.69	99.12	100	97.61	96.92	98.26±1.12

D'après les résultats du Tableau 6, la majorité des fleurs avant l'anthèse des différentes populations des espèces analysées de genre *Medicago* sont à grains de pollen fertiles. La moyenne la plus élevée des taux de fertilité pollinique est de $99.76 \pm 0.15\%$ enregistré chez *M. murex* (population du Campus Targua Ouzemour) et la plus petite qui est de $52.75 \pm 40.06\%$ révélée chez *M. lesinsii* (population Md Said Ali Ouyidir).

III-1-4- Taille des grains de pollen

Le tableau 7 compare les tailles des grains de pollen des différentes populations des espèces du genre *Medicago* étudiées.

La plus petite valeur de l'axe polaire (P) des grains de pollen a été enregistrée pour la population (9) de *M. lesinsii*, tandis que la plus grande valeur a été affichée pour la population (4) de *M. minima* et pour les trois populations de *M. murex* (6, 7, 8).

Pour l'axe équatorial (E) des grains de pollen, la plus petite valeur se trouve chez la population (9) et la plus grande chez les populations de *M. murex* (6, 7).

Pour ce qui est de rapport P/E des deux axes, la plus petite valeur se trouve chez les deux populations de *M. murex* (6, 7) et la plus grande a été enregistrée chez les deux populations de *M. polymorpha* (1, 2) ainsi que les populations (3, 5) de *M. minima*.

Le tableau 8 compare les tailles des grains de pollen des différentes espèces du genre *Medicago* étudiées.

Tableau 7 : Comparaison des paramètres de taille des grains de pollen chez quelques populations de 4 espèces de *Medicago*. Les valeurs sont exprimées comme Moyenne \pm écart-type et Min-Max. P : Axe polaire; E : Axe équatorial ; P/E : Rapport des deux axes. Les moyennes désignées par différentes lettres sont statistiquement différentes (Test LSD, $\alpha = 0,05$).

Espèces	Populations		P (μm)	E (μm)	P/E
<i>M. polymorpha</i>	1	Bouira	27,57 \pm 1,38 24,70-30,95 B	26,12 \pm 1,23 23,70-28,50 B	1,06 \pm 0,05 0,91-1,14 C
	2	Targua Ouzemour	27,05 \pm 2,17 23,15-31,61 B	25,71 \pm 1,89 22,50-29,74 B	1,05 \pm 0,06 0,90-1,19 C
<i>M. minima</i>	3	Boudjellil	29,73 \pm 1,83 25,28-34,42 D	28,33 \pm 1,43 25,09-31,10 CD	1,05 \pm 0,06 0,84-1,16 C
	4	Ahrik Ath Ali	36,95 \pm 2,72 31,72-42,34 E	36,35 \pm 3,00 29,90-41,43 E	1,02 \pm 0,04 0,94-1,12 B
	5	Oued Zhour	28,75 \pm 1,76 23,32-31,96 C	27,55 \pm 1,48 23,42-30,88 C	1,04 \pm 0,06 0,91-1,17 C
<i>M. murex</i>	6	Charfa	36,78 \pm 2,61 30,89-43,91 E	38,03 \pm 2,83 33,13-44,31 F	0,97 \pm 0,05 0,89-1,11 A
	7	Campus Targua Ouzemour	36,78 \pm 3,71 31,47-45,98 E	38,51 \pm 3,09 33,07-45,07 F	0,96 \pm 0,06 0,86-1,08 A
	8	Thilemmathine	36,46 \pm 3,63 31,00-42,78 E	36,19 \pm 3,93 30,12-43,86 E	1,01 \pm 0,04 0,92-1,13 B
<i>M. lesinsii</i>	9	Md Said Ali Ouyidir	24,74 \pm 1,88 20,18-28,39 A	24,75 \pm 1,93 20,37-28,55 A	1,00 \pm 0,05 0,92-1,10 B
	10	Thilemmathine	29,39 \pm 1,41 25,44-32,51 CD	28,93 \pm 1,24 26,30-31,41 D	1,02 \pm 0,05 0,89-1,12 B

Tableau 8 : Comparaison des paramètres de taille des grains de pollen des 4 espèces de *Medicago* étudiées. Les valeurs sont exprimées comme Moyenne \pm écart-type et Min-Max. P : Axe polaire; E: Axe équatorial ; P/E : Rapport des deux axes. Les moyennes désignées par différentes lettres sont statistiquement différentes (Test HSD pour effectifs inégaux, $\alpha = 0,05$).

Espèces	P	E	P/E
<i>M. polymorpha</i>	27,31 \pm 1,83 23,15-31,61 A	25,91 \pm 1,60 22,50-29,74 A	1,05 \pm 0,05 0,90-1,19 C
<i>M. minima</i>	31,81 \pm 4,24 23,32-42,34 B	30,74 \pm 4,51 23,42-41,43 B	1,04 \pm 0,06 0,84-1,17 C
<i>M. murex</i>	36,68 \pm 3,33 30,89-45,98 C	37,58 \pm 3,44 30,12-45,07 C	0,98 \pm 0,05 0,86-1,13 A
<i>M. lesinsii</i>	27,06 \pm 2,86 20,18-32,51 A	26,84 \pm 2,65 20,37-31,41 A	1,01 \pm 0,05 0,89-1,12 B

Dans le tableau 8 comparatif des tailles des grains de pollen chez les 4 espèces étudiées, *M. polymorpha* et *M. lesinsii* présentent les valeurs les plus petites pour l'axe polaire (P) et l'axe équatorial (E) des grains de pollen. *M. murex* affiche la valeur la plus grande pour l'axe polaire (P) des grains de pollen, ainsi que pour l'axe équatorial (E). En ce qui concerne le rapport (P/E) des gains de pollen, la plus petite valeur a été enregistrée chez *M. murex* et la plus grande valeur se trouve chez les deux espèces *M. polymorpha* et *M. minima*.

L'analyse en composantes principales (ACP) des tailles des grains de pollen révèle que les espèces *M. polymorpha* et *M. lesinsii* présentent les plus petits grains de pollen, tandis que l'espèce *M. murex* possède les plus grands grains de pollen. Quant à l'espèce *M. minima*, la taille de ses grains de pollen est intermédiaire entre celle de *M. murex* et celles des espèces *M. lesinsii* et *M. polymorpha* (Fig 18).

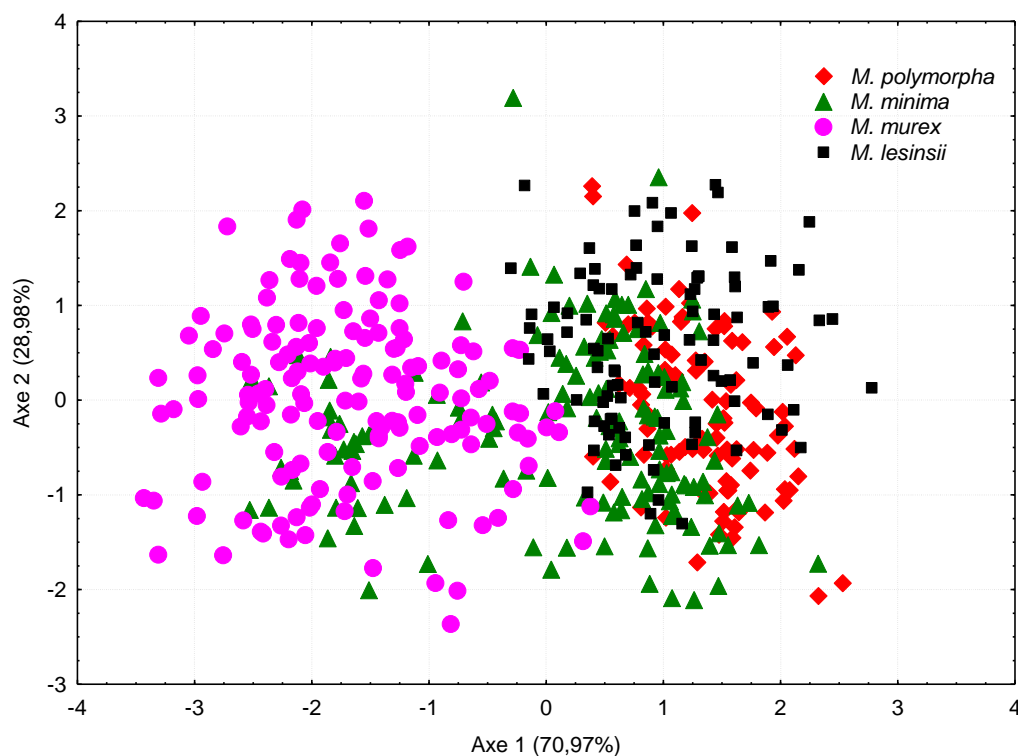


Figure 18 : ACP comparant les tailles des grains de pollen chez 4 espèces de *Medicago*. Axe 1 est défini par P (Axe polaire) et E (Axe équatorial) avec respectivement $R = -0,91$ et $R = -0,99$, Axe 2 est défini par P/E (rapport des deux axes) avec $R = -0,83$

III-1-5- L'analyse de la cléistogmie

L'étude de la cléistogamie a porté sur un total de vingt-sept fleurs fermées et cent dix fleurs à stigmate non déclenché de différentes populations chez quatre espèces du genre *Medicago*. Les résultats sont dans le Tableau 9 ci-dessous.

L'observation de 94 fleurs à stigmate non déclenchés chez *M. polymorpha* a révélé une présence de pollen sur la totalité des stigmates d'où 24 stigmates avec pollen germées et un nombre d'ovules varient de 6 à 10.

Chez *M. murex* l'analyse de 13 fleurs à stigmates non déclenché et 10 fleurs fermées a affichée une présence de pollen sur tous les stigmates d'où 5 avec pollen germée. Le nombre est de 4 à 6.

En ce qui concerne *M. minima* l'étude de 14 fleurs fermées nous a donné une présence de pollen sur 13 fleurs et une germination de pollen sur le stigmate dans 10 fleurs. Le nombre d'ovules varient de 4 à 6.

Quant à *M. lesinsii* nous avons obtenu de pollen germées sur le stigmate dans deux fleurs fermés et deux fleurs à étendards ouverts. Sachant que le nombre de fleurs examinées est de 3 à stigmate non déclenché et 4 fermées, où le pollen a été présents sur tous les stigmates non déclenchés sauf un. Le nombre d'ovules est de 6 et 7.

Tableau 9 : résultat de l'analyse de la cléistogamie chez les différentes populations des espèces de *Medicago* étudiées.

Espèce <i>M. polymorpha</i>						
Population Targua Ouzemour						
Nombre de fleurs	Présence de pollen	Pollen germé sur le stigmate	Etat du stigmate	Ovaire		Nombre d'ovules
				Poils	Translucide /foncé	
42 fleurs à stigmate non déclenché	42/42	16/42 (38%)	Jeune (5/42) Large (24/ 42) Peu large (13/42)	2/42	Translucide (39/42) Opaque (3/42)	8 (19/42) 9 (11/42) 7 (7/42) 6 (2/42) Inconnu (3/42)
Population Campus Aboudaou						
52 fleurs à stigmate non déclenché	52/52	8/52 (15.38%)	Peu large (16/52) Jeune (18/52) Large (18/52)	0/42	Translucide (43/52) Opaque (9/52)	8 (18/52) 7 (9/52) 9 (12/52) 10 (4/52) Inconnu (9/52)
Espèce <i>M. murex</i>						
Population Cherfa						
7 fleurs a stigmate non déclenché	7/7	2/7 (28.57%)	Jeune (3/7) Large (4/7)	0/7	Translucide (6/7) Opaque (1/7)	6 (5/7) 7 (1/7) Inconnu (1/7)
4 fleurs fermées	4/4	1/4 (25%)	Large (4/4)	0/4	Translucide (3/4) Opaque (1/4)	6 (1/4) Inconnu (1/4) Coupés 4 (2/4)
Population Thilemmathine						
6 fleurs fermées	6/6	1/6 (16.66%)	Large (3/6) Peu large (3/6)	0/6	Translucide (6/6)	7 (6/6)

Population Campus Targua Ouzemour						
6 fleurs a stigmaté non déclenché	6/6	1/6 (16.66%)	Large (1/3) Peu large (1/3)	0/6	Translucide (6/6)	7 (6/6)
Espèce <i>M. minima</i>						
Population Ahrik Ath Ali						
6 fleurs fermées	5/6 oui	4/6 (66.66%)	Large (4/6) Jeune (2/6)	6/6	Translucide (4/6) Opaque (2/6)	4 (3/6) 5 (1/6) Inconnu (2/6)
Population Oued zhour						
5 fleurs fermées	5/5	4/5 (80%)	Jeune (3/5) Peu large (2/5)	5/5	Translucide (2/5) Opaque (3/5)	6 (2/5) Inconnu (3/5)
Population Boudjellil						
3 fleurs fermées	3/3	2/3 (33.33%)	Large (2/3) Jeune (1/3)	3/3	Translucide (2/3) Opaque (1/3)	6 (2/3) Inconnu (1/3)
Espèces <i>M. lesinsii</i>						
Population Md Said Ali Ouyidir						
3 fleurs à stigmaté non déclenché	3/3	2/3 (33.33%)	Large (2/3) Peu large (1/3)	0/3	Translucide (1/3) Opaque (2/3)	6 (1/3) Inconnu (2/3)
2 fleurs fermées	1/2	0/2	Large (1/2) Jeune (1/2)	0/2	Translucide (2/2)	7 (2/2)
Population Thilemmathine						
2 fleurs fermées	2/2	0/2	Large (1/2) Jeune (1/2)	0/2	Translucide (2/2)	7 (2/2)

Les stigmates jeunes ont une forme fongiliforme avec absence de pollen germé tandis que les stigmates matures sont d'un aspect large ou peu large avec présence de pollen germé et non germés, le nombre d'ovules varie d'une espèce à l'autre (Tableau 9).

Ainsi donc, l'espèce qui présente le plus de cléistogamie est *M. minima* qui montre du pollen germé pour la plupart de fleurs fermées analysées. La cléistogamie est aussi assez présente chez *M. polymorpha* et *M. murex*. Elle a été observée aussi pour *M. lesinsii* mais peu de fleurs ont été analysées pour cette espèce.

La figure 19 illustre les stigmates avec pollen germé chez les fleurs fermées (Figure 19 a) et à étendards ouverts (Figure 19 b-d) des 4 espèces de *Medicago* étudiées.

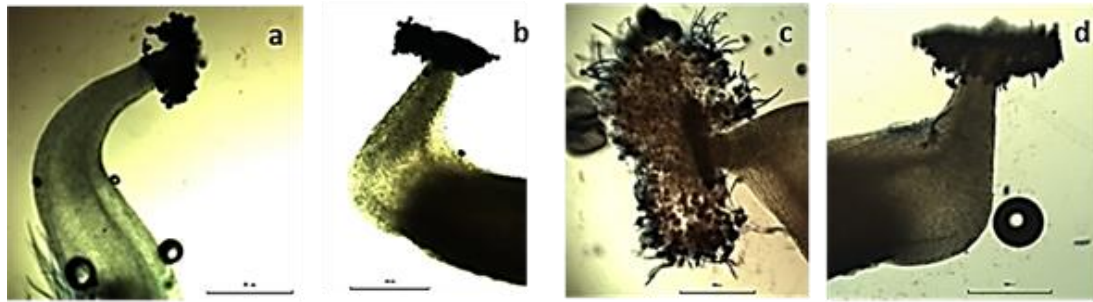


Figure 19 : la présence de pollen germé sur les stigmates non déclenchés des fleurs chez les espèces étudiées. **a**: stigmate non déclenché mature (large) à pollen germé d'une fleur fermée chez *M. minima* (Oued Zhour) ; **b**: stigmate non déclenché mature d'une fleur à étendard ouvert chez *M. lesinsii* (Md Said Ali Ouyidir) ; **c**: stigmate non déclenché mature d'une fleur à étendard ouvert chez *M. polymorpha* (Campus Targua Ouzemour) ; **d**: stigmate non déclenché mature d'une fleur à étendard ouvert chez *M. murex* (Thilemmathine). La barre d'échelle est de 300µm.

La figure 20 présente les différents états des stigmates et nombre d'ovules dans les fleurs fermées (Figure 20 a) et à étendard ouvert (Figure 20 b-d) des différentes populations chez les espèces étudiées.

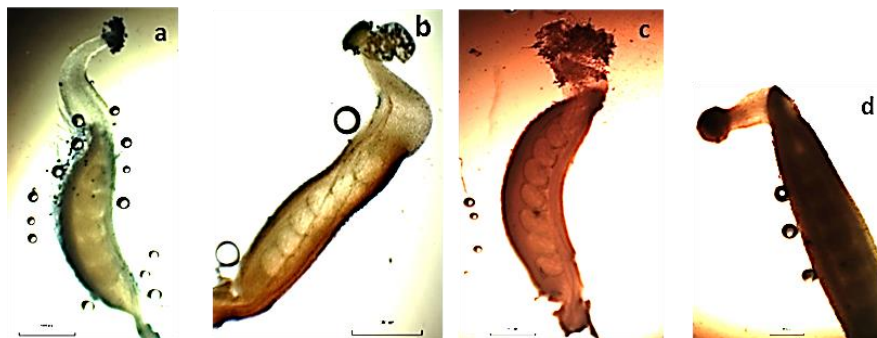


Figure 20 : Etat du stigmate non déclenché et le nombre d'ovules dans les fleurs analysées. **a** : stigmate non déclenché mature avec pollen germé à 5 ovules d'une fleur fermée chez *M. minima* (Oued Zhour) ; **b**: stigmate non déclenché jeune à 6 ovules d'une fleur à étendard ouvert chez *M. murex* (Cherfa) ; **c**: stigmate non déclenché mature avec pollen germé à 8 ovules d'une fleur à étendard ouvert chez *M. polymorpha* (Campus Targua Ouzemour) ; **d**: stigmate non déclenché jeune à 6 ovules d'une fleur à étendard ouvert chez *M. lesinsii* (Md Said Ali Ouyidir). La barre d'échelle est de 500 µm.

IV- DISCUSSION

IV-1-Dénombrements chromosomiques chez les espèces étudiées de *Medicago*

L'analyse de la mitose des méristèmes racinaires de *M. polymorpha*, *M. lesinsii*, *M. arabica*, *M. murex*, *M. minima* nous a donné une séparation insuffisante des chromosomes au cours de la métaphase. De ce fait, les chromosomes n'ont pas pu être comptés de façon correcte sur les plaques métaphasiques mitotiques. Par contre, nous avons obtenu une lame qui est bien visible pour l'espèce *M. polymorpha* population Ain Aloui (Bouira), Nous avons compté un nombre de $2n = 2x = 14$ ($x = 7$) avec 7 bivalents ($n = 7$).

L'analyse de la méiose des cellules mères polliniques des quatre espèces de différentes populations a révélé un cytotype diploïde de $2n=2x=14$ pour toutes les populations de *M. polymorpha*. Le même résultat a été rapporté pour *M. polymorpha* par Hein (1963), Lesins et Lesins (1979), Small et Jomphe (1989) sur un matériel de différentes régions de la Méditerranée et par Benmouhoub (2007) et Bouchibane (2009) dans la région de Béjaïa et la Soummam.. Le même nombre $2n=2x=14$ a été aussi compté pour toutes les populations de *M. murex* comme il a déjà été mentionné pour cette espèce par Lesins et al. (1970).

Concernant *M. minima*, nous avons compté, sur des métaphases I, un nombre de $2n = 2x = 16$ ($x = 8$) pour toutes les populations échantillonnées. Les mêmes comptages ont été rapportés pour *M. minima* par Hein (1963), Lesins et Lesins (1979), Small et Jomphe (1989) de différentes localités en région méditerranéenne et par Benmouhoub (2007) dans la Vallée de la Soummam. De même, pour toutes les populations de *M. lesinsii*, nous avons compté $2n=2x=16$, rejoignant les comptages rapportés pour cette espèce par Lesins et al. (1970).

IV-2-Les anomalies méiotiques observées chez les espèces étudiées

Lors de cette étude, nous avons observé, à une faible fréquence, des cytomixies et des triades chez toutes les populations des espèces étudiées (*M. polymorpha*, *M. murex*, *M. minima*, *M. lesinsii*). La cytomixie (qui est à l'origine de la formation de tétrades anormales comme les triades) est considérée comme une caractéristique des plantes génétiquement déséquilibrées tels que les hybrides, les mutants et les aneuploïdes (Kim et al. 2009). La cytomixie peut conduire à la formation de PMCs (Cellules Mères Polliniques) avec des nombres chromosomiques anormaux ou des microspores aberrantes, des triades, des pentades, hexades... etc. (Bellucci et al., 2003). Elle a un rôle dans l'évolution des plantes car elle est considérée comme un mécanisme supplémentaire à l'origine de l'aneuploïdie et la polyploïdie

(Pagliarini, 2000). Des conditions environnementales et des facteurs génétiques, non encore élucidés, peuvent induire cette anomalie (Love, 1938 et Bass et al. 2003).

IV-3-La fertilité pollinique

Les taux de fertilité pollinique que nous avons obtenus sont élevés quasiment pour toutes les populations des espèces abordées dans ce travail, elles varient de 87.91% à 100% pour *M. polymorpha*, de 94% à 100% pour *M. murex*, de 69.56% à 100% pour *M. minima*, de 11.62% à 100% pour *M. lesinsii*. Les facteurs responsables de la réduction de la fertilité pollinique incluent les anomalies de la méiose, les facteurs environnementaux et génétiques (Pagliarini, 2000), ainsi que les stress abiotiques tels que les chocs thermiques et les stress biotiques (Benmouhoub, 2007). Les faibles fréquences d'anomalies méiotiques (cytomixies et triades) sont en accord avec les taux de fertilité élevés. La baisse de fertilité pollinique chez certaines plantes de *M. lesinsii* serait due au stress hydrique, vue la sécheresse durant la période d'échantillonnage, la basse altitude et le type de sol sableux du site.

IV-4-Taille des grains de pollen

La taille des grains de pollen est homogène pour les populations de *M. polymorpha* et *M. murex* mais hétérogène pour les populations de *M. minima* et *M. lesinsii*. (Tab. 7, Résultats). Dans certaines espèces, la taille des grains de pollen est positivement corrélée avec la quantité d'ADN dans les noyaux. Ainsi, l'hétérogénéité des tailles des grains de pollen entre les populations de *M. minima* et *M. lesinsii* dénote-t-elle une hétérogénéité génétique de ces deux espèces ?

Les tailles des grains de pollen se sont avérées différentes entre les 4 espèces étudiées (Tab. 8). *M. polymorpha* et *M. lesinsii* qui affichent des tailles de pollen statistiquement identiques, *M. minima* et *M. murex* sont différentes entre et avec les deux premières. Les plus gros grains de pollen se trouvent *M. murex* et les plus petits chez *M. polymorpha* et *M. lesinsii*, avec *M. minima* intermédiaire entre les deux extrêmes (Tab. 8). Il serait intéressant de vérifier à quel point la taille des grains de pollen est corrélée avec la quantité d'ADN dans les cellules ou, à défaut, avec la longueur totale du caryotype.

Les rapports P/E sont aussi hétérogènes. Les plus petits rapports se trouvent chez *M. murex* et les plus grands chez *M. polymorpha* et *M. minima*. *M. lesinsii* présente des rapports intermédiaires entre les deux extrêmes. Sinon, tous rapports tournent autour de 1 dénotant la

quasi-égalité des deux axes, mais le test détecte que P est légèrement mais significativement supérieur à E ($P/E > 0$).

IV-5-Cléistogamie

Toutes les 4 espèces étudiées ont montré du pollen germé sur des stigmates de fleurs fermées (*M. murex*) ou des stigmates non encore déclenchés (c'est-à-dire encore emprisonnés dans la carène) dénotant ainsi la présence de cléistogamie chez toutes les 4 espèces étudiées. Mais la question était de savoir s'il y a présence de cléistogamie complète (toutes les fleurs sont cléistogames). La présence de pollen germé sur certaines fleurs et non germé sur d'autres incite à dire que la cléistogamie est partielle (présence simultanée de fleurs cléistogames et de fleurs chasmogames sur une même plante). Cependant rien ne prouve que les fleurs sans pollen germé ne sont pas en fait déjà fécondées par des tubes polliniques à germination précoce à travers les parois des anthères, phénomène déjà signalé chez certaines espèces de *Medicago* (Novoselova, 2003) et d'autres plantes. Des croisements entre différentes formes de *M. polymorpha* ont été réussis montrant ainsi que toutes les fleurs ne seraient pas cléistogames ou au moins la fécondation ne prend pas place très tôt avant l'anthèse, en revanche, chez *M. minima*, sur des dizaines de croisement intraspécifiques tentés, aucun hybride n'a été obtenu, dénotant présence de cléistogamie totale chez les souches utilisées (Benmouhoub, 2007). Dans nos résultats, *M. minima* est la seule espèce montrant des poils sur les ovaires (Tab. 10). Cet état de l'ovaire serait un indice de fécondation (Small et al., 1987). Cependant, Lesins et Lesins (1979) ont rapporté des croisements réussis entre une forme à gousses avec épines et une autre à gousse sans épines. *M. murex* aussi serait candidat à une cléistogamie complète, de même que *M. lesinnsii*, observation appuyée par le fait que Lesins et Lesins (1979) n'ont jamais réussi à croiser ces deux espèces malgré leurs nombreuses tentatives.

Novoselova (2003) rapporte que sur 29 espèces annuelles analysées (sans préciser lesquelles), la cléistogamie des bourgeons a été mise en évidence chez 7 espèces qui, selon l'occurrence des fleurs cléistogames, peuvent être classées comme suit : *M. orbicularis* (le plus grand nombre), *M. scutellata*, *M. lupulina*, *M. turbinata*, *M. arabica*, *M. intertexta* et *M. radiata*.

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de cette étude cytogénétique d'examiner la mitose, la méiose, la fertilité pollinique, la taille des grains de pollen ainsi que la présence de la cléistogamie chez quelques populations de 4 espèces de *Medicago* : *M. polymorpha*, *M. murex*, *M. minima*, *M. lesinsii*.

L'analyse de la mitose chez *M. polymorpha* a révélé un nombre chromosomique de $2n = 2x = 14$ ($x=7$) chez la population de Ain Aloui (Bouira) et une séparation insuffisante des chromosomes pour pouvoir les compter chez les 3 autres espèces *M. murex*, *M. minima*, *M. lesinsii*.

Quant à l'analyse de la méiose I des cellules mères polliniques chez les différentes populations des 4 espèces étudiées, elle a révélé un cytotype de 7 bivalents donc de $2n=2x=14$ pour *M. polymorpha* et *M. murex* et un cytotype à 8 bivalents donc de $2n=2x=16$ pour chez *M. minima* et *M. lesinsii*. Lors de cette analyse de la méiose, nous avons observé, à une faible fréquence, deux types d'anomalies chez les quatre espèces étudiées : les cytomixies et les triades (ces dernières pouvant être une conséquence des premières).

L'étude de la fertilité pollinique réalisée sur des fleurs avant l'anthèse chez les quatre espèces étudiées a montré que les taux de fertilité sont très élevés chez les espèces étudiées. Ils sont de $96.60 \pm 5.07\%$ à $98.93 \pm 0.82\%$ pour *M. polymorpha*, de $97.95 \pm 2.00\%$ à $99.76 \pm 0.15\%$ pour *M. murex* et de $91.56 \pm 12.38\%$ à $99.38 \pm 0.35\%$ pour *M. minima*, et de $98.26 \pm 1.12\%$ chez la population thlemmathine de *M. lesinsii*. Le taux de fertilité pollinique a été peu élevé qui est et une peu élevée pour la population Md Said Ali Ouyidir, il n'est que de $52.75 \pm 40.06\%$. Cette baisse de fertilité pollinique chez ce dernier semble due à un stress hydrique.

Les tailles des grains de pollen telles qu'exprimées par l'axe polaire (P) et l'axe équatorial (E) sont identiques et plus petites chez *M. polymorpha* ($P = 27,31 \pm 1,83 \mu\text{m}$ et $E = 25,91 \pm 1,60 \mu\text{m}$) et *M. lesinsii* ($P = 27,06 \pm 2,86 \mu\text{m}$ et $E = 26,84 \pm 2,65 \mu\text{m}$). Les plus gros de pollen se trouvent chez *M. murex* ($P = 36,68 \pm 3,33 \mu\text{m}$ et $E = 37,58 \pm 3,44 \mu\text{m}$). Quant à *M. minima* ($P = 31,81 \pm 4,24 \mu\text{m}$ et $E = 30,74 \pm 4,51 \mu\text{m}$), elle a montré un pollen de taille intermédiaire entre celui de *M. murex* et celui de *M. polymorpha* et *M. lesinsii*. P est légèrement mais significativement supérieur à E ($P/E > 0$).

Toutes les 4 espèces semblent renfermer de la cléistogamie. *M. murex* et *M. minima* seraient probablement complètement cléistogames.

Dans l'avenir, il serait intéressant d'élargir l'étude cytogénétique sur la mitose chez les quatre espèces de genre *Medicago* analysés dans le but d'avoir des plaques métaphasiques bien comptables, et approfondir l'analyse de la cléistogamie pour mieux démontrer ce phénomène naturelle.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

- Abdelguerfi A., Abdelguerfi-berrekia R., Guittonneau G.G. (1988). Contribution à l'étude des espèces spontanées du Genre *Medicago* L. en Algérie. Iii. Dénombrement chromosomique chez 35 populations de 17 espèces. *Algerian Annals of Agronomy* 12(1) : 342-354.
- Azcan N., Saricoban S., Demirci B., Aytac Z. et Baser K.H.C. (2001). Seed oils of fifteen *Ebenus* taxa growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds* 37(3):253-255.
- Bajpai V. K., Shukla S. et Kang S. C. (2008). Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource technology* 99(18): 8903-8908.
- Guignard J.L. et Dupont F. (2005). Botanique. 13ème Edition Masson, Paris. 336 p.
- Bass H.W., Bordoli S.J., Foss E.M. (2003). The desynaptic (dy) and desynaptic1(dsy1) mutations in maize (*zea mays* L.) cause distinct telomere-misplacement phenotypes during meiotic prophase. *Journal of Experimental Botany*. 54(380): 39 – 46.
- Bauchan G.R. et Elgin J.H. (1984). A new chromosome number for the genus *Medicago*. *Crop Science* 24: 193-195.
- Bayrakdar F., Aytac Z., Suludere Z. et Candan S. (2010). Seed morphology of *Ebenus* L. species endemic to Turkey. *Turkish Journal of Botany* 34: 283-289.
- Bellucci M., Roscini C. et Mariani A. (2003). Cytomixis in pollen mother cells of *Medicago sativa* L. *Journal of heredity* 94(6): 512 - 516.
- Benmouhoub H. (2007). Analyse d'hybrides F1 et F2 intra- et/ou interspécifiques chez *Medicago polymorpha* L., *M. intertexta* (L.) Miller, *M. ciliaris* (L.) Krockner, *M. arabica* (L.) Hudson, *M. orbicularis* (L.) Bartal. et *M. minima* (L.) Bartal. Interprétation taxogénétique. Magister en biologie, option : biologie de la conservation et éco développement, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, 86 p.
- Bouchibame M. (2009). Analyse des méioses et des mitoses de quelques morphotypes de *Medicago polymorpha* L. dans la région de la Soummam et Taskriout (Béjaïa). Magister en Biologie. Option : Biologie de la Conservation et Ecodéveloppement, Université de Bejaia. 83p.
- Chakravaty H. L. (1976). Plant Wealth of Iraq. Ed. A dictionary of economic plant, 1: 505.
- Chalck P.M. (1998). Dynamics of biologically fixed N in legume-cereal rotations: a review. *Aust. J. Res.* 49:303-316.

- Cheng K.C., Nich H. W., Yang C. L., Wang I.M., Chou I.S., Chen J. S., Cheng, K. C., Nich, H. W., Yang, C. L., Wang, I.M., Chou, I.S., Chen, J. S. (1975). Light and electron microscopical observations on cytomixis and the study of its relation to evolution. *Acta Botanica Sinica* 17: 60-69.
- Clarkson N.M et Russell J.S. (1975). Flowering responses to vernalization and photoperiod in annual medics (*Medicago* spp.). *Australian Journal of Agricultural Research*, 26(5): 831-838.
- Crawford E. J., Lake, A. W. H., & Boyce, K. G. (1989). Breeding annual *Medicago* species for semiarid conditions in southern Australia. *Advances in Agronomy* 42: 399-437.
- Culley T.M., et Klooster M.R. (2007). The cleistogamous breeding system: a review of its frequency, evolution, and ecology in angiosperms. *The Botanical Review* 73(1): 1-30.
- Damião D.N.P., Gonçalves S., Andréia R.A-P., Adriele F.D.C., Mariza B.R., Odair A. et Claudicéia R.-P. (2014). Analysis of meiotic behavior in *Cordia calyculata* Vell. (Boraginaceae). *Revista Biotemas*, 27 (4): 21-27.
- De M. (1983). Cytomixis in pollen mother cells of an apomictic ornamental *Ervatamia divaricata* (Linn.) Alston. *Cytologia* 48(1) : 201-207.
- Defani-Scoarize M. A., Pagliarini M. S. et Aguiar G. (1995a). Evaluation of meiotic behavior in double cross maize hybrids and their parents. *Maydica* 40: 319-324.
- Del Pozo A., Ovalle C., Aronson J. et Avendano J. (2002). Ecotypic differentiation in *Medicago polymorpha* L. along an environmental gradient in central Chile. I. Phenology, biomass production and reproductive patterns. *Plant Ecology* 159: 119-130.
- Delalande M., Greene S., Hughes S., Nair R., Huguet T., Aouani M.E. et Proserpi J.M. (2007). Wild accessions / populations. *Medicago truncatula* handbook 1-27.
- Denton M.D., Hill C.R., Bellotti W.D et Coventry D.R. (2007). Nodulation of *Medicago truncatula* and *Medicago polymorpha* in two pastures of contrasting soil pH and rhizobial populations. *Applied soil ecology* 35(2): 441-448.
- Deysson G. (1976). La cellule végétale, structure et fonctionnement. Tome 1. 3ème édition Sedes, Société d'édition d'enseignement supérieur, Paris, 298 pages. ISBN 2-7181-7124-3
- Domergues Y., Duhoux E., Diem H.G. (1999). Les arbres fixateurs d'azote. Ed. CIRAD, ESPACE, FAO, IRD. 499 p.
- Doyle J.J. (1994). Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 25: 325–349.

- Doyle J.J. et Luckow M.A. (2003). The rest of the iceberg. Legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiol.* 131: 900-910.
- Dyer A. F. (1963). The use of lacto-propionic orcein in rapid squash methods for chromosome preparations. *Stain Technology* 38(2): 85-90.
- Ernest S., Stephen R. D., Deborah S., Erica J. et Heidi L. Z. (1998). Multiple independent losses of the plastid rpoC1 intron in *Medicago* (Fabaceae) as inferred from phylogenetic analyses of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Can. J. Bot.* 76(5): 791–803.
- Ewing M.A., et Robson A.D. (1990). The effect of solution pH and external calcium concentration on the early growth and nodulation of several annual *Medicago* species. *Australian Journal of Agricultural Research* 41(5): 933-939.
- Faria S.D., Franco A.A., Jesus R. D., Menandro M. D. S., Baitello J. B., Mucci E. S. F., ... et Sprent J. I. (1984). New nodulating legume trees from south-east Brazil. *New phytologist* 98(2): 317-328.
- Fenech M., Kirsch V.M., Natarajan A.T, Surralles J., Crott J.W., Parry J., Norppa Y.H., Eastmond D.A., Tucker J.D. et Thomas P. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26(1): 125–132.
- Fournier P. (1961). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology* 148: 1985-1995.
- Fyad Lameche F.Z. (2007). Les Légumineuses ou Fabacées. Cours présentés à la faculté des Sciences. Département de Biotechnologie. Université d’Oran Es-senia. Algérie.
- Godoy S. M., Pereira A. R. A., Romagnolo M. B et Risso-Pascotto C. (2012). Meiotic behavior during microsporogenesis of *Alchornea triplinervia* (Sprengel) Müller. *Argoviensis. Ciência Rural* 42(6): 1027-1032.
- Graham P.H. et Vance C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131(3): 872–877.
- Graziano, P.A., Calkins, S.D., & Keane, S.P. (2010). Toddler self-regulation skills predict risk for pediatric obesity. *International journal of obesity* 34(4): 633-641.
- Heyn C. C. (1984). *Medicago*. In: K. H. Rechinger, Flora Iranica, Papilionaceae 2, pp. 253-271; Papilionaceae 2 (Tabula), Tab. 156-170, Akademische Druck- u. Verlagsanstalt, Graz, Austria.

- Jahier J., Chevre A.M., Eber F., Delourme R. et Tanguy A.M. (1992). Techniques de cytogénétique végétale. Ed. *INRA*, Paris. 183 p.
- Kiihl P. R. P., Pereira A. R. A., Godoy S. M., Stenzel N. M. C et Pascotto C.P. (2011). Chromosome stickiness during meiotic behavior analysis of *Passiflora serrato-digitata* L. (Passifloraceae). *Biology Ciência Rural* 41(6): 1018-1023.
- Kim J.S., Oginuma K. et Tobe H. (2009). Syncyte formation in the microsporangium of *Chrysanthemum* (Asteraceae): a pathway to infraspecific polyploidy. *J Plant Res* 122: 439–444.
- Kornicke M. (1901). Über ortsveränderung von Zellkernen S B Niederhein. *Ges Natur-U Heilkunde Bonn A*, 14–25
- Laberche J.-C. (2010). Biologie végétale. 3 éd. Dundo, Paris, 295 p.
- Lajudie P., Willems A., Nick G., Moreira F., Molouba F., Hoste B., Torck U., Neyra M., Collins M.T., Lindström K., Dreyfus B et Gillis M. (1998). Characterization Of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. Nov. *Int. J. Syst. Bactriole* 48: 369-382.
- Lavinsky M.P., Souza M.M., Silva G.S et Melo C.A.F. (2017). Contributions of classical and molecular cytogenetic in meiotic analysis and pollen viability for plant breeding. *Genetics and Molecular Research*, 16 (3): gmr16039582
- Lee G.J., Wu. X., Shannon J. G., Sleper D. A. and Nguyen H. T. (2007). Chapter 1: Soybean. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants Oilseeds, de 1-53 C. Kole (Ed.). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*.
- Lesins K. A, Lesins I. et Gillies C. B. (1970). *Medicago murex* with $2n = 16$ and $2n = 14$ chromoome complements. *Chromosoma* 30: 109-122.
- Lesins K. A.D. et Lesins I. (1979) - Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenetic study. W.Junk publishers, The Hague, Boston, London. 228 p.
- Lewis G.; Schrire B., Mackinder B. et Lock M. (eds). (2005). Legumes of the World. Richmond, U.K : Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewis G.P., Schrire B.D., Mackinder B.A et Lock J.M., ed. (2003). Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Love R.M. (1938). Somatic variation of chromosome numbers in hybrid wheats. *Genetics* 23: 517 – 522.
- Löve A., Löve D. (1975). Plant chromosomes. T1, Ed. Cramer. Menglan. 184 p.

- Mariani A., Pupilli F et Calderini O. (1996). Cytological and molecular analysis of annual species of the genus *Medicago*. *Canadian Journal of Botany* 74(2) : 299–307.
- Mathieu M. (2003). Luzerne: culture, récolte, conservation, utilisation. France agricole. p 11-16.
- Mertens T. R. et Hamnersmith R. L. (1998). Genetics Laboratory investigations, Eleventh edition, Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 275 p.
- Novoselova L.V. (2003). Bud cleistogamy at annual species of genus *Medicago* L. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 39: 285–287.
- Omara M. K. (1976). Cytomixis in *Lolium perenne*. *Chromosoma* 55(3): 267-271.
- Pagliarini M.S. (2000). Meiotic behavior of economically important plants species: the relationship between fertility and male sterility. *Genetics and molecular Biology* 23(4): 997-1002.
- Prosperi J.M., Isabelle O., Angevain M., Génier G. et Nansat P. (1993). Diversité génétique, Conservation et utilisation des ressources génétiques des luzernes méditerranéennes. Laboratoire de Ressources génétiques et d'Amélioration des luzernes méditerranéennes. INRA. Mauguio. N°4: 1-5.
- Prosperi, J. M., Guy, P. et Balfourier, F. (1995). Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. Ed. INRA. Paris. 245 p
- Quézel P et S. Sanata. (1962). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. T. 1. Ed. CNRS. Paris. 498- 506 p.
- Rochon J.J., Doyle C. J., Greef J.M., Hopkins A., Molle G., Sitzia M et Smith C. J. (2004). Grazing legumes in Europe: a review of their status, management, benefits, research needs and future prospects. *Grass and Forage Science* 59(3): 197-214.
- Sahgal M. et Johri B. N. (2003). The changing face of rhizobial systematics. *Current Science*. 84(1): 43-48.
- Schouttet F. (2004). La luzerne. Fiche technique agro-industrie. Champagen-Ardenne. P15
- Simon B. (2005). *Trace ideals and their applications* (No. 120). American Mathematical Soc..
- Simon J.P. (2005). Plantes utilisées par l'Homme : chapitre 11 les légumineuses. Préparés pour le département de Sciences biologiques. Université de Montréal.
- Singhal V. K., Kaur D et Kumar P. (2008). Effect of cytomixis on the pollen size in Seabuckthorn' (*Hippophae rhamnoides* L., Elaeagnaceae). *Cytologia* 73(2): 167-172.

- Small E.,2011.Alfafa and relatives: evolution and classification of *Medicago*. Ed. NRC,Ottawa,727 p.
- Small E. et Brookes B.S. (1985). *Medicago lesinsii*, a new Mediterranean species. *Canadian journal of botany* 63(4): 728-734.
- Small E., Lassen P. et Brookes B.S. (1987). An expanded circumscription of *Medicago* (*Leguminosae*, *Trifolieae*) based on explosive flower tripping. *Willdenowia* 16: 415-437.
- Small E.et Jomph M. (1989). A synopsis of the genus *Medicago* (*Leguminosae*). *Can. J. Bot.* 67: 3260-3294.
- Thami Alami I. et El-Mzouri E.H. (2000). Etude de l'efficacité et de la persistance des souches de Rhizobium de sulla. *CIHEAM - Options Mediterraneennes* 2: 321-325.
- Wani S. P., Rupela O. P. et Lee K.K. (1995). Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant ant Soil* 174: 29-49.
- Zhang Y., Lespinasse Yet Salesses G. (1988). Etude Cytogénétique de quelques clones diploïdes et polyploïdes de pommier (*Malus×domestica* Borkh.), considérations quant à l'origine du pommier. *Cytologie* 53: 749-755.

