

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



جامعة بجاية
Tasdawit n Bgayet
Université de Béjaïa

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques de Environnement
Laboratoire d'Ecologie et Environnement

THÈSE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
DOCTORAT

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie. Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biologie-Santé-Environnement

Présentée par
ZEMOURI TASSADIT

Thème

**Etude taxonomique de l'endémique nord-africaine *Ebenus pinnata*
Aiton (Fabaceae) dans l'Est algérien**

Soutenue le : 07/02/2024

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

M. BOUGAHAM Abdelazize Franck	PR	Univ. de Bejaia.	Président
M. SAHNOUNE Mohamed	PR	Univ. de Bejaia	Rapporteur
Mme ISSOLAH Rachida	DR	INRAA, CRP Alger	Examinatrice
M. DADACH Mohammed	MCA	Univ. de Bejaia	Examineur
Mme MESBAH Melilia	MCB	Univ. de Bejaia	Invitée

Année Universitaire : 2023/2024

Remerciements

En premier lieu, merci à l'éternel Dieu, tout puissant, pour sa grâce dans ma vie ; et de m'avoir donné la force, ainsi que la patience pour dépasser toutes les difficultés.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Ecologie et Environnement et dirigé par Monsieur Mohamed SAHNOUNE, Professeur à l'Université de Bejaia. Je le remercie vivement d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et pour m'avoir initiée à la recherche. Je lui exprime ma profonde gratitude pour m'avoir fait profiter de ses connaissances, de son expérience, de ses méthodes de travail, et surtout de sa rigueur scientifique. Grâce à lui, j'ai découvert un domaine de recherche qui aujourd'hui me passionne.

Mes remerciements les plus profonds s'adressent également à Monsieur. Abdelazize Franck BOUGAHAM, professeur à l'université de Bejaia et directeur du Laboratoire d'Ecologie et Environnement, qui me fait l'honneur d'être le président du jury de ma soutenance.

Je remercie vivement Madame Rachida ISSOLAH., Directeur de Recherche à l'INRAA (CRP Mehdi Boualem Baraki. Alger) pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

De même, j'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur. Mohammed DADACH, MCA à l'Université de Bejaia, pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail.

Je remercie également Madame Melilia MESBAH, MCB à l'Université de Bejaia, d'avoir accepté l'invitation à examiner et juger ce travail.

Je tiens à remercier vivement une personne exceptionnelle, Mlle Hassina BENMOUHOU, MAA à l'Université de Bejaia, pour avoir été à mes côtés durant tout mon parcours, pour sa modestie, sa disponibilité, son soutien moral, matériel et académique ; j'ai beaucoup appris avec toi et je suis vraiment ravie d'être ta collègue et ton amie.

Je tiens également à exprimer ma gratitude à nos deux magnifiques ingénieurs du Laboratoire d'Ecologie et Environnement, notamment Madame Samira BOUDERSA née HOCINE et Monsieur Mourad ZEMOURI : je vous remercie pour tous les bons moments passés ensemble, les fous rires, votre bonne humeur et pour cette complicité qui ont contribué à mon bien-être au sein du laboratoire.

Je tiens aussi a remercié Mr Mohamed Malik MAHDJOUB membre de notre laboratoire MCA à l'Université de Bouira, pour son aide dans le traitement d'images et l'étude des herbiers.

Mes remerciements vont également Dr Ales Kovarik et à son équipe (Institut de biophysique, AS CR, Académie tchèque des sciences, Královopolská 135, 612 65 Brno, République tchèque) et Madame Farida BELKACEM, membre de notre laboratoire et nouvellement MAB à l'Université de Bab Ezzouar, pour leur aide précieuse dans l'extraction et le séquençage de l'ADN. Un grand merci encore une fois à madame Melilia MESBAH pour sa contribution à l'analyse phylogénétique.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur Amirouche Chikhoun, MCA à l'Université de Bejaia, pour son aide précieuse dans la partie phytochimique, ainsi qu'à tous les membres du Laboratoire d'analyse physico-chimique des aliments, pour leur accueil chaleureux et leur aide.

Pour finir, je remercie toutes les personnes qui m'ont aidée dans l'échantillonnage des différentes populations : M. Mohamed SAHNOUNE pour la majorité des populations, mes parents, ainsi que M. Mokhtar HARRAT, M. Ali LAIB et M. Hafid BEDJIL.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail, je vous suis toute reconnaissante.

A Mes Très chers Parents

A ma très chère **mère**, pour l'amour que tu m'a toujours donné, tes encouragements et toute l'aide et le soutien que tu m'as apportés durant mes études et toute ma vie.

A mon très cher **père**, tu es et tu resteras toujours le meilleur, merci de m'avoir donné les options pour avancer, pour ta confiance et tes sacrifices, et pour avoir toujours répondu présent.

Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien-être. J'espère avoir réussi à vous honorer. Que Dieu le plus puissant vous protège et vous procure de la santé et du bonheur.

Je dédie ce modeste travail à ma famille et à mes amis qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours.

Tassadit (Rosa)

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ENSA : École Nationale Supérieure Agronomique.

PCoA : Analyse des Coordonnées Principales.

UPGMA : Unweighted Paired Group Mean Arithmetic.

ACP : Analyse en Composantes Principales.

AFC : Analyse Factorielle des Correspondances.

HSD : Différence Hautement Significative.

ITS : Espaceur Interne Transcrit.

matK : Maturase K.

PCR : Polymerase Chain Reaction.

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl.

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique.

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Caractérisation des espèces du genre <i>Ebenus</i> .	15
2	Caractéristiques des populations, dates d'échantillonnage, tailles des échantillons et codifications. Dans la dernière colonne, SA : Semi-aride, SH : Subhumide. H : Humide.	35
3	Caractères morphologiques utilisés dans l'étude/ C : Continu ; D : Discret (dénombrement) ; O : Ordinal ; B : Binaire.	39
4	Caractères morphologiques utilisés dans l'étude morphométrique des herbiers.	42
5	Comparaison des caractères morphologiques entre les groupes d' <i>Ebenus pinnata</i> . Les valeurs sont exprimées en moyenne±ET (ligne supérieure) et en valeurs min-max (ligne inférieure). Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes à p=0.05 (HSD à N inégaux). FL1 : Poids factoriels pour l'axe 1 de la PCoA (ligne supérieure) et de l'ACP (ligne inférieure) ; FL2 : Poids factoriels pour l'axe 2 de la PCoA (ligne supérieure) et de l'ACP (ligne inférieure). Les poids factoriels sont calculés en tant que coefficient de corrélation de Pearson. L'ACP n'est pas concernée par les traits qualitatifs. Les poids factoriels des traits qualitatifs pour l'axe 1 et l'axe 2 de la PCoA sont données comme coefficient de Pearson R (ligne supérieure) et comme coefficient Gamma (ligne inférieure). Les résultats de la PCoA et de l'ACP figurent respectivement dans les figures 20 et 22. NA : Non attribué (état constant du caractère). Voir Tableau 3 pour la signification des codes des caractères.	57
6	Comparaison de la taille des grains de pollen des groupes C1, C2 et C3 d' <i>Ebenus pinnata</i> avec celle des autres espèces du genre <i>Ebenus</i> . P : axe polaire ; E : axe équatorial. Une couleur similaire indique une taille similaire des grains de pollen.	67
7	Populations et nombres de plaques utilisées pour les comptages chromosomiques. Voir Tab. 2 pour la signification des codes des populations.	69
8	Mesures des chromosomes (μm) d' <i>Ebenus pinnata</i> . Les plaques A, B et C correspondent aux plaques de métaphase mitotique de la Figure 27. C1 (Population FB), C2 (Population BM) et C3 (Population AS) correspondent aux groupes taxonomiques tels que délimités dans la Figure 3. Chr : Chromosomes classés du plus long au plus court ; TL1 : Longueur totale avant correction ; TL2 : Longueur totale après correction ; W1 : Largeur avant correction ; W2 : Largeur après correction.	70
9	Comparaison des longueurs de chromosomes (μm) et d'autres paramètres du caryotype (KP) chez les espèces d' <i>Ebenus</i> . C1, C2, C3 : Groupes taxonomiques avant correction de la longueur des chromosomes ; C1', C2', C3' : Groupes taxonomiques après correction de la longueur des chromosomes. EP : <i>E. plumose</i> ; EM : <i>E. macrophylla</i> ; EH : <i>E. haussknechtii</i> ; EB : <i>E. barbiger</i> ; EL : <i>E. longipes</i> ; EA : <i>E. argentea</i> . CL1-7 : Longueur du chromosome de la paire 1-7 (valeur moyenne des deux longueurs de chromosomes) ; T : Longueur totale du caryotype haploïde (ΣCLi) ; D : Gamme de longueur des chromosomes (CL1-CL7) ; R :	71

	Longueur totale relative du caryotype haploïde (T/D) ; RCL1-7 : Longueurs relatives des chromosomes 1-7 (=CLi/T). On s'attend à ce que les mêmes caryotypes aient des longueurs relatives totales de caryotype haploïde (R) et des longueurs relatives de chromosomes (RCL) très similaires.	
10	Matrice de distance euclidienne basée sur les longueurs relatives des chromosomes. Les données utilisées sont les longueurs chromosomiques relatives individuelles RCL (Tableau 8). Les distances euclidiennes entre les trois groupes d' <i>E. pinnata</i> (jaune) sont du même ordre ou plus grandes qu'entre la plupart des autres espèces d' <i>Ebenus</i> (vert). C1, C2, C3 : Groupes taxonomiques d' <i>E. pinnata</i> ; EP : <i>E. plumose</i> ; EM : <i>E. macrophylla</i> ; EH : <i>E. haussknechtii</i> ; EB : <i>E. barbiger</i> ; EL : <i>E. longipes</i> ; EA ; <i>E. argentea</i> . Voir le dendrogramme correspondant (Figure 28).	71
11	Estimations de la divergence évolutive par paire entre les séquences ITS1-ITS2 des espèces du genre <i>Ebenus</i> . La divergence est exprimée en nombre de différences de bases. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 602 positions dans l'ensemble de données finales. Les séquences d' <i>E. pinnata</i> nouvellement obtenues sont FB1-3 (Groupe C1), BO1-5 (Groupe C2), SM1-SM3 (Groupe C3). Toutes les autres séquences sont obtenues à partir de GenBank (voir Matériaux et Méthodes pour les références des séquences). <i>Taverniera aegyptiaca</i> et <i>T. multinoda</i> sont le groupe externe utilisé dans l'inférence phylogénique (Figure30). Noter la similarité des distances au sein du groupe de séquences d' <i>E. pinnata</i> (vert) avec celles entre certaines autres espèces d' <i>Ebenus</i> reconnues (jaune). L'espèce la plus proche d' <i>E. pinnata</i> est ici <i>E. armatagei</i> (en gras).	76
12	Comparaison des activités antioxydante et antibactérienne de trois échantillons d'extraits éthanoliques d' <i>Ebenus pinnata</i> provenant de différents étages climatiques. Pour chaque paramètre, les valeurs sont exprimées sous forme de Min-Max (ligne supérieure) et de Moyenne \pm écart-type (ligne inférieure). Les lettres majuscules différentes indiquent des différences significatives entre les valeurs moyennes (test LSD, $\alpha = 0,01$ pour les paramètres antioxydants et $\alpha = 0,05$ pour l'activité antibactérienne, avec C>B>A). TPC : teneur totale en polyphénols ; DPPH : activité de piégeage des radicaux ; RP : dosage du pouvoir réducteur.	78

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Quelques formes de fleurs des <i>Leguminosae</i> A : <i>Cercis siliquastrum</i> ; B : <i>Cadia purpurea</i> ; C : <i>Daniellia ogea</i> ; D : <i>Peltogyne chrysopis</i> ; E : <i>Cassia fistula</i> ; F : <i>Mimosa benthamii</i> ; G : <i>Acacia dealbata</i> ; H : <i>Haplormosia monophylla</i> ; I : <i>Ormosia lewisii</i> ; J : <i>Astragalus uniflorus</i> ; K : <i>Trifolium rubens</i> ; L : <i>Baphia leptobotrys</i> (LPWG, 2017).	6
2	Quelques formes de fruits des <i>Leguminosae</i> . A : <i>Abarema jupunba</i> ; B : <i>Inga feuillei</i> ; C : <i>Swartzia parvipetala</i> ; D : <i>Andira micrantha</i> ; E : <i>Berlinia razzifera</i> ; F : <i>Eligmocarpus cynometroides</i> ; G : <i>Dalbergia lemurica</i> ; H : <i>Machaerium millei</i> ; I : <i>Carmichaelia cf. aligera</i> ; J : <i>Erythrina madagascariensis</i> ; K : <i>Piscidia grandifolia</i> ; L : <i>Phaseolus</i> spp (LPWG, 2017).	7
3	Nombre de genres et d'espèces pour les six sous familles des <i>Leguminosae</i> (LPWG, 2017).	8
4	Arbre de consensus selon la règle de la majorité à 50 % résultant de l'analyse bayésienne de l'ensemble de données ITS de l'ADNr. Les nombres au-dessus des branches correspondent à la probabilité postérieure et à la vraisemblance, ainsi qu'aux valeurs bootstrap de parcimonie, respectivement. Les valeurs de 50 % n'ont pas été indiquées.	13
5	Arbre le plus parcimonieux de l'analyse cladistique basée sur 21 caractères morphologiques des espèces du genre <i>Ebenus</i> et genres proches. Les valeurs sur les branches correspondent aux pourcentages bootstrap (Kaveh et Kazempour-Osaloo, 2012).	23
6	Profils SDS-PAGE des protéines des graines chez le genre <i>Ebenus</i> (1) <i>E. macrophylla</i> , (2) <i>E. plumosavar. plumosa</i> , (3) <i>E. plumosavar. speciosa</i> , (4) <i>E. barbiger</i> , (5) <i>E. reesei</i> , (6) <i>E. haussknechtii</i> , (7) <i>E. depressa</i> , (8) <i>E. bourgaei</i> , (M) Marqueurs [Myosine (200 kDa), β -galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), sérum albumine (66 kDa), ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), inhibiteur de trypsine (21 kDa), lysozyme (14 kDa)], (9) <i>E. cappadocica</i> , (10) <i>E. boissieri</i> , (11) <i>E. hirsuta</i> , 12- <i>E. longipes</i> , (13) <i>E. argentea</i> , (14) <i>E. laguroides</i> , (15) <i>E. pisidica</i> (Çelebi et al., 2009).	24
7	Phénogramme UPGMA basé sur les similarités calculées sur la base des profils SDS-PAGE des protéines des graines chez quelques espèces d' <i>Ebenus</i> (Çelebi et al., 2009).	24

8	Profils RAPD de 15 espèces du genre <i>Ebenus</i> . M: Marqueurs (Fermentas, Gene Ruler™ DNA Ladder Mix SMO331; 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp) 1- <i>E. macrophylla</i> ; 2- <i>E. plumosa</i> var. <i>plumosa</i> ; 3- <i>E. plumosa</i> var. <i>speciosa</i> ; 4- <i>E. barbigera</i> ; 5- <i>E. reesei</i> ; 6- <i>E. haussknechtii</i> ; 7- <i>E. depressa</i> ; 8- <i>E. bourgaei</i> ; 9- <i>E. cappadocica</i> ; 10- <i>E. boissieri</i> ; 11- <i>E. hirsuta</i> ; 12- <i>E. longipes</i> ; 13- <i>E. argentea</i> ; 14- <i>E. laguroides</i> (Çelebi et al., 2009).	25
9	Phénogramme UPGMA basé sur les profils RAPD de 15 espèces du genre <i>Ebenus</i> (Çelebi et al., 2009).	25
10	Plaques métaphasiques de 6 espèces d' <i>Ebenus</i> L. de Turquie. a- <i>Ebenus plumosa</i> var. <i>plumosa</i> ; b- <i>E. plumosa</i> var. <i>speciosa</i> ; c- <i>E. macrophylla</i> ; d- <i>E. barbigera</i> , (Aksoy et al., 2001) ; e- <i>E. longipes</i> ; f- <i>E. argentea</i> (Aytaç et al., 2000). Barre d'échelle de 10 µm pour a, b, c et d, et de 5 µm pour e et f.	26
11	Idiogrammes de 6 espèces du genre <i>Ebenus</i> L. a- <i>E. longipes</i> , b- <i>E. argentea</i> (Aytaç et al., 2000) ; c- <i>E. macrophylla</i> , d- <i>E. barbigera</i> , e- <i>E. plumosa</i> var. <i>Plumosa</i> , f- <i>E. plumosa</i> var. <i>Speciosa</i> , (Aksoy et al., 2001). La barre d'échelle correspond à 2 µm pour a, b, c, d, et à 1 µm pour e, f.	27
12	Forme des grains de pollen du genre <i>Ebenus</i> . A, D, G, J, L, O : Vues équatoriales. B, e, H, K, M, P : Vues polaires. C, F, I, K, N, Q : Vues équatoriales montrant une ouverture sur le profile. (A-C) <i>E. plumosa</i> . (D-F) <i>E. barbigera</i> . (G-I) <i>E. bourgei</i> . (J, K) <i>E. cappadocica</i> . (L-N) <i>E. boissieri</i> . (O-Q) <i>E. laguroides</i> (Pinar et al., 2000). La barre d'échelle correspond à 20µm.	28
13	A : <i>Ebenus pinnata</i> ; B : Portion de la tige; C : Fleur; D : Etendard ; E : Aile; F : Carène; G ₁ : 9 étamines soudées; G ₂ : 10 ^{ème} étamine; H : Gousse (Jafri 1980).	30
14	Types fonctionnels d' <i>Ebenus pinnata</i> : a- Type éphémère ; b- Type modulaire ; c- Type permanent (Hegazy et al., 2010).	31
15	Dénombrement chromosomique en mitose chez <i>Ebenus pinnata</i> . a-b : Population de Kherrata (fleur rose) ; c- Population de Kherrata (fleur blanche) ; d- Population de Afra (fleur rose). [GX100. La barre d'échelle correspond à 10 µm] (Hadawat et Madani, 2022).	32
16	Localisation géographique des populations étudiées.	34
17	<i>Ebenus pinnata</i> à l'état naturel, station de kherrata (codes KH et FB).	34
18	Précision des caractères des parties florales et des graines d' <i>Ebenus pinnata</i> .	42
19	Répartition géographique d' <i>Ebenus pinnata</i> Ait. et des autres espèces du genre <i>Ebenus</i> . (Pampanini,1930; Hegazy et al., 2010; Hegazy et Eesa, 1991; e-Recolnat, 2013; MNHN, 2018; Miara, 2016; Madoui et al, 2006; Gandoger, 1908; Debeaux, 1894; Cosson, 1857; Mukassabi et al., 2012; Bekdouche et al., 2011; Chermat et al., 2012; Bayrakdar et al., 2010; Aytaç et Yildirim, 2017; Azcan et al., 2001; Haytaa et al., 2014 et Sibthorp, 1833).	52

20	Nuage de points PCoA de 639 plantes d' <i>Ebenus pinnata</i> basé sur 52 caractères morphologiques. A : Les principaux groupes et sous-groupes discriminés (C11, C12, C13 ; C2 ; C31 C32). B : Relations entre les populations (chaque symbole coloré correspond à la population Pi) avec une tendance des individus d'une même population à se regrouper, sauf dans certains cas. Les codes des populations sont indiqués entre parenthèses. Voir les figures 5-6 pour la comparaison et le tableau 1 pour la signification des codes de population. Les valeurs moyennes des coordonnées par rapport aux axes 1 et 2 sont significativement différentes pour tous les groupes et sous-groupes (HSD à N inégaux, P=0,05).	54
21	Dendrogramme UPGMA montrant les relations entre les 34 populations. Trois groupes principaux peuvent être reconnus (C1, C2 et C3), avec plus ou moins de sous-groupes. Voir le Tableau 2 pour les codes des populations et la Figure 20 pour la comparaison.	55
22	Nuage de points de l'ACP basé sur les caractères quantitatifs. Voir Figure 21 pour la comparaison et le Tableau 5 pour la contribution des variables.	56
23	Traitement multivarié des caractères qualitatifs. A : Nuage de points AFC comparant les 34 populations sur la base de 8 caractères qualitatifs (points bleus) ; B : CAH sur les mêmes données qu'en A (résumées dans le tableau de gauche). Voir les tableaux 1 et 2 pour les populations et les codes de caractères. Les variables discriminantes et la caractérisation morphologique détaillée des six groupes sont présentées dans le Tableau 5. Les six groupes sont significativement discriminés pour la plupart des caractères (Tableau 5).	63
24	Nuage de points PCoA de spécimens d'herbiers numériques (A) en comparaison avec des plantes fraîches (B). L'axe 1 est expliqué par les traits quantitatifs des tiges et des feuilles, l'axe 2 par la pilosité des tiges.	64
25	Sélection de caractères morphologiques chez <i>Ebenus pinnata</i> . A. Poils de la tige chez les plantes à fleurs pourpres (A1) et les plantes à fleurs blanches (A2) ; B : Feuilles et folioles chez <i>E. pinnata</i> ; C : Inflorescence des plantes à fleurs pourpres (C1) et à fleurs blanches (C2) ; D-k : Caractères floraux des plantes à fleurs pourpres (D1-K1) et des plantes à fleurs blanches (D2-K2) (D : Fleur entière ; E : Stipule supérieure à gauche et Stipule inférieure à droite ; F : Calice entier à gauche, calice ouvert à droite ; G : Corolle entière ; H : Carène ; I : Etandard, face supérieure à gauche, face inférieure à droite ; J : Colonne staminale et pistil ; K1-6 : Gradient morphologique de l'aile (K1-3 : Groupes C1, C2 et C3 respectivement ; K4-6 : Groupe C2, C31 et C32) ; L : Gousse ; M : Différentes formes de graines.	66
26	Stigmate du bouton floral d' <i>Ebenus pinnata</i> . Stigmate et étamines à l'intérieur de la carène (A : type à fleurs pourpres ; B : type à fleurs blanches) ; Stigmate avant l'anthèse couvert de grains de pollen, observé au microscope optique (C). Notez les grains de pollen germés avec les tubes polliniques colorés en bleu dans C. Barre d'échelle : 3mm (A et B) ; 100 µm (C).	67

27	Chromosomes mitotiques d' <i>Ebenus pinnata</i> . A : plaque métaphasique de la population FB (groupe C1) ; B : plaque métaphasique de la population BM (groupe C2) ; C : plaque métaphasique de la population AS (groupe C3). A' : Caryogramme de la plaque A ; B' : Caryogramme de la plaque B ; C' : Caryogramme de la plaque C. A'' : Caryogramme A' après correction ; B'' : Caryogramme B' après correction ; C'' : Caryogramme C' après correction (les longueurs et largeurs des chromosomes ont été corrigées en référence à A' comme expliqué dans Matériel et méthodes). Les flèches indiquent les chromosomes divisés. Barre d'échelle = 10µm.	69
28	Dendrogramme UPGMA comparant les longueurs relatives des chromosomes entre les groupes d' <i>Ebenus</i> (RCL) du Tableau 8. La matrice de distances euclidiennes est donnée Tableau 8. C1, C2, C3 : Groupes taxonomiques d' <i>E. pinnata</i> de la présente étude ; EP : <i>E. plumose</i> ; EM : <i>E. macrophylla</i> ; EH : <i>E. haussknechtii</i> ; EB : <i>E. barbigera</i> ; EL : <i>E. longipes</i> ; EA ; <i>E. argentea</i> .	72
29	Chromosomes méiotiques d' <i>Ebenus pinnata</i> . A : Métaphase I avec 5 bivalents en anneau et 2 bivalents en bâtonnet ; B : Métaphase II ; C : Métaphase III (quatre noyaux au stade métaphase ; D : Deux grains de pollen nouvellement formés avec des chromosomes au stade métaphase ; E : Grain de pollen germé avec deux noyaux à l'intérieur ; F : Grain de pollen germé avec un noyau à l'intérieur du grain de pollen et un autre dans le tube pollinique. Les mêmes configurations ont été plus ou moins observées pour toutes les populations étudiées. Noter le type tricolpate des grains de pollen (E). Barre d'échelle = 10µm.	73
30	Arbre phylogénétique bayésien montrant les relations des séquences ITS d' <i>Ebenus pinnata</i> et d'autres espèces d' <i>Ebenus</i> . <i>Taverniera aegyptiaca</i> et <i>T. multinoda</i> constituent le groupe externe. FB1-3 : Séquences du groupe C1 ; BO1-5 : Séquences du groupe C2 ; SM1-SM3 : Séquences du groupe C3 ; <i>E. pinnata</i> 1-4 : Séquences GenBank. Au-dessus des branches internes se trouvent les valeurs des probabilités postérieures. Voir Tableau 10 pour les valeurs des distances par paire.	75
31	Analyse des activités antioxydante et antibactérienne de trois écotypes d' <i>Ebenus pinnata</i> provenant de différents étages climatiques. A. Activité antioxydante ; B. Activité antibactérienne. Source des données dans le tableau 12.	79

Table de matière

Introduction générale	1
I. Synthèse bibliographique	4
I.1. Les <i>Fabaceae</i>	4
I.1.1. Description botanique	4
I.1.2. Classification	8
I.1.3. Intérêt	9
I.2. La tribu des <i>Hedysareae</i>	11
I.3. Le genre <i>Ebenus</i> L.	14
I.3.1. L'origine du mot <i>Ebenus</i>	14
I.3.2. Morphologie et écologie du genre <i>Ebenus</i>	14
I.3.3. Intérêt du genre <i>Ebenus</i> L.	20
I.3.4. Classification du genre <i>Ebenus</i>	22
I.3.5. Cytogénétique du genre <i>Ebenus</i>	25
I.4. <i>Ebenus pinnata</i> Aiton	29
I.4.1. Ecologie et distribution géographique	29
I.4.2. Description morphologique	29
I.4.3. Caryologie d'<i>Ebenus pinnata</i>	31
II. Matériel et méthodes	33
II.1. Distribution géographique	33
II.2. Échantillonnage du matériel végétal	33
II.3. Analyse morphologique	38

II.4. Analyse multivariée	38
II.5. Mesures des grains de pollen	43
II.6. Cultures expérimentales	43
II.7. Analyse cytogénétique	44
II.7.1. Choix du matériel végétal	44
II.7.2. Préparations des solutions	44
II.7.2.1. Les solutions de prétraitement	44
II.7.2.2. Le fixateur	45
II.7.2.3. Le colorant	45
II.7.2.4. Solutions d'hydrolyse (HCl 1N)	45
II.7.2.5. Bleu de coton	45
II.7.3. Etude des mitoses	46
II.7.4. Etude des méïoses	46
II.7.5. Etude du pollen	46
II.8. Phylogénie	47
II.8.1. Matériel utilisé pour l'analyse phylogénétique	47
II.8.2. Extraction et séquençage d'ADN	48
II.8.3. Analyse phylogénétique	48
II.9. Analyse phytochimique	49
II.9.1. Préparation de l'extrait végétal	49
II.10. Détermination de l'activité antioxydante	50
II.10.1. Teneur phénolique totale	50
II.10.2. Essai de piégeage des radicaux libres DPPH	50
II.10.3. Dosage du pouvoir réducteur	50

II.11. Criblage de l'activité antibactérienne	51
II.11.1. Souches bactériennes	51
II.11.2. Test antibactérien	51
III. Résultats	52
III.1. Distribution géographique et écologie	52
III.2. Traitement multivarié des données morphométriques	53
III.3. Morphologie, pollinisation, dispersion des graines et pouvoir germinatif	65
III.4. Analyse cytogénétique	68
III.5. Divergence évolutive	73
III.6. Activité antioxydante	76
III.7. Activité antibactérienne	76
IV. Discussion	79
IV.1. Distribution géographique, écologie et pression de sélection	79
IV.2. Xérophilie	79
IV.3. Défense contre les stress abiotiques et biotiques	80
IV.4. Mécanisme de dispersion des graines	80
IV.5. Système de reproduction et spéciation	81
IV.6. Traitement taxonomique et évolution	82
IV.7. Nombre de chromosomes, anomalies méiotiques et fertilité du pollen	83
IV.8. Activités antioxydantes et antimicrobiennes	84
Conclusion générale	85
Références bibliographique	86

Introduction générale

Les plantes *Ebenus* ont été mentionnées pour la première fois par Prospero Alpini (1592) et de l'Ecluse (1526-1609) (in Drapiez, 1835) sous le nom d'*Ebenus cretica*. Le genre *Ebenus* a été établi par Linnaeus (1753) sur la base de l'unique espèce *E. cretica* qui a ensuite été incluse dans le genre *Anthyllis* sous le nom de *A. cretica* par Lamarck (1783), confirmé plus tard par Willdenow (1765-1812) et confondu avec *Hedysarum* par Vahl (1790) (in De Candolle, 1825). De Candolle (1825) a finalement réhabilité le genre *Ebenus* principalement sur la base du port de la plante et de la morphologie de la fleur, clairement distincts de ceux des genres *Anthyllis* et *Hedysarum*. Le genre *Ebenus*, tel que délimité par De Candolle, 1825, comprend trois espèces : *E. cretica* L. en Crète, *E. pinnata* Desf. dans les parties côtières d'Afrique du Nord, et *E. sibthorpii* DC. sur les monts Athos et Parnasse (Grèce).

Les espèces d'*Ebenus* se répartissent dans la zone irano-turaniennne, le bassin méditerranéen, l'Afrique du Nord et la région arabo-sindienne, avec l'Anatolie (Turquie) comme centre de diversité du genre (Huber-Morath, 1970 ; Aytaç, 2000 ; Aytaç et Yildirim, 2018). Aujourd'hui, le genre *Ebenus* comprend vingt espèces (Huber-Morath, 1965 ; Aytaç, 2000), dont quatorze sont endémiques à la Turquie, y compris la nouvelle espèce décrite récemment *Ebenus zekiyeae* Aytaç & Yildirim (Aytaç et Yildirim, 2018). Les six espèces restantes sont *E. Cretica* L. en Crète ; *E. sibthorpii* DC. dans le sud-est de la Grèce et les îles de la mer Égée (Kaveh et Kazampour-Osaloo, 2012 ; Aytaç et al., 2015) ; *E. stellata* Boiss. en Iran, Oman, Afghanistan, Pakistan et Inde (Aytaç et al., 2015) ; *E. lagopus* Boiss. dans le sud de l'Iran (Boissier, 1872), mais ce dernier n'a jamais été retrouvé depuis ; *E. armitagei* Schweinf. & Taubertin en Libye et en Egypte (Boulos, 1999 ; Jafri, 1980 ; Dobignard et Chatelain, 2012) et *E. pinnata* Ait. en Libye, Tunisie, Algérie et Maroc (Quézel et Santa, 1962 ; Dobignard et Chatelain, 2012).

Traditionnellement, les plantes *Ebenus* sont utilisées dans la médecine populaire comme traitements de divers troubles de santé tels que les maladies de la peau, l'hypertension, les maladies de l'estomac et les problèmes rénaux (Pinar et al., 2000 ; Uyar et al., 2006 ; Ozdmir et Alpınar, 2015). Des activités antifongiques, antimicrobiennes, anticonvulsivantes, anticancéreuses, antioxydantes et œstrogéniques ont été rapportées pour de nombreuses espèces d'*Ebenus* (Abreu et al., 2007 ; Kounadi et al., 2011 ; Khodaparast et al., 2012 ; Uyar et al., 2006 ; Bektas et al., 2018). Les plantes d'*Ebenus* sont également riches en métabolites secondaires, tels que le méthylinositol, la rutine, la catéchine, l'hyperoside, la piceine, l'acide tannique et l'acide p-coumarique (Abreu et al., 2007 ; Ceylan et al., 2016). D'autres services potentiels des plantes d'*E. pinnata* sont l'enrichissement du sol en azote (Zakhia, 2004), le

pâturage, la stabilisation du sable, l'exploitation horticole et le contrôle de l'érosion hydrique (Aytaç et al., 2000 ; Çelebi et al., 2009 ; Bidak et al., 2015).

Ebenus se distingue par un calice à longues dents plumées, des étamines monodelphes, des gousses non segmentées de 1 ou 2 graines enfermées dans le calice (Huber-Morath, 1970). Cette unicité phénotypique du genre *Ebenus* est corroborée par des analyses phylogénétiques morphologiques (Kaveh et Kazampour-Osaloo, 2012) et moléculaires (Lewke-Bandara et al., 2013 ; Ahangarian et al., 2007 ; Duan et al., 2015 ; Amirahmadi et al., 2014), dans lesquelles le genre *Ebenus* s'est avéré être un groupe monophylétique bien étayé, niché dans le clade des Hedysaroïdes (Tribu des Hedysareae), avec le genre *Taverniera* et, à un moindre degré, *Hedysarum* et *Onobrychis* comme groupes frères les plus proches.

A part *E. armitagei*, qui est restreint à quelques endroits du bord de mer du nord-est de l'Égypte et du nord-ouest de la Libye, *E. pinnata* est la seule espèce clairement nord-africaine du genre ; elle est mentionnée dans le nord-ouest de la Libye, en Tunisie, en Algérie et au Maroc (Jafri, 1980 ; Boulos, 1999 ; Dobignard et Chatelain, 2012). *E. pinnata* est une herbe vivace canescente, ligneuse à la base, avec des poils blancs soyeux et des tiges ramifiées de 30-60 cm de hauteur ; 5-15 folioles, velues, linéaires-oblongues ou linéaires-lancéolées jusqu'à 20 x 4 mm, obtuses à aiguës aux sommets, légèrement mucronées ; stipules presque aussi longues que les folioles mais généralement plus larges, brunâtres, lobées ou dentées aux sommets ; inflorescences denses, à fleurs multiples, ovoïdes, velues et bractéiformes, avec un très long pédoncule ; fleurs roses, petites (5-6 mm), incluses dans le long calice plumeux (12-15 mm de long) ; gousses ovoïdes, membraneuses, densément poilues à la base, réticulées et incluses dans le tube du calice (Desfontaines, 1798-1799 ; Quézel et Santa, 1962 ; Jafri, 1980).

Malgré sa large distribution dans toute l'Afrique du Nord, qui est écologiquement très hétérogène, et son importance pour les clarifications taxonomiques et la compréhension de l'évolution et de la spéciation au sein du genre *Ebenus*, *E. pinnata* reste singulièrement sous-étudié du point de vue taxonomique. Dans ce mémoire de thèse, nous rapportons les résultats d'une étude morphologique, biogéographique, cytogénétique, palynologique et phylogénétique des populations d'*E. pinnata*, avec un accent sur le nord-est de l'Algérie, en incluant aussi des résultats préliminaires sur les activités anti-oxydante et anti-bactérienne des extraits des parties aériennes de ces plantes.

Afin d'exposer le compte rendu de ce travail, nous avons organisé ce mémoire en 4 chapitres. Le premier chapitre aborde une synthèse bibliographique. Le deuxième est consacré au matériel végétal analysé ainsi que la méthodologie utilisée. Dans le troisième chapitre, nous exposons les résultats obtenus. Enfin, dans le quatrième nous présentons les discussions des résultats obtenus. Nous terminons avec une conclusion générale et des perspectives, après lesquelles sont insérés la liste bibliographique les résumés en français, anglais et arabe.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Les *Fabaceae*

La famille des *Fabaceae* ou *Leguminosae* est très importante économiquement et écologiquement (Lewis et al., 2005; Yahara et al., 2013) avec près de 770 genres et plus de 19 500 espèces (Lewis et al., 2005, 2013; LPWG, 2013a). En Algérie la famille est représentée par 67 genres et 455 espèces dont 30 endémiques (Dobignard et Chatelain, 2012). Les légumineuses sont la troisième plus grande famille d'angiospermes en termes de nombres d'espèces après les Astéracées et les Orchidacées. Sur le plan économique, les légumineuses sont au deuxième rang après les Poacées (Lewis et al., 2005; LPWG, 2013a). Le nom « *Fabaceae* », dérivé du genre *Faba* (maintenant considéré comme un synonyme du genre *Vicia*), *Leguminosae* est un nom plus ancien, toujours considéré comme valide, fait référence au fruit typique (*légume* = gousse) de cette famille (Lewis et al., 2005).

Les légumineuses ont été domestiquées aux côtés des graminées dans différentes régions du monde depuis les débuts de l'agriculture et ont joué un rôle clé dans son développement précoce (Gepts et al., 2005; Hancock, 2012). Les légumineuses sont particulièrement importantes en tant que fourrage et engrais vert dans les régions tempérées et tropicales, et sont utilisés pour leur bois, leurs tanins, leurs huiles et leurs résines, dans la fabrication de vernis, de peintures, de colorants et de médicaments, et dans le commerce horticole (LPWG, 2017).

Les *Fabaceae* ont une distribution cosmopolite, représentant des constituants écologiques importants dans presque tous les biomes du monde et se trouvent même dans les habitats les plus extrêmes (Schrire et al., 2005a, b; Spent, 2001). Ils constituent des éléments significatifs en termes de diversité et d'abondance des espèces, dans les forêts tropicales humides des basses terres en Afrique, en Amérique du Sud et en Asie (Yahara et al., 2013). Elles dominent les forêts sèches et les savanes à travers les tropiques (Dryflor, 2016), elles se trouvent également dans les régions méditerranéennes, désertiques et tempérées, jusqu'aux latitudes élevées et à haute altitude (LPWG, 2017).

I.1.1. Description botanique

Les *Leguminosae* varient beaucoup en termes de type biologique. On y trouve de grands arbres tropicaux émergents avec des contreforts, des petites herbes annuelles éphémères, des annuelles grimpantes ou des plantes vivaces avec des vrilles, des arbustes du désert, des sous-arbustes géoxyliques, des lianes ligneuses et, moins communément, des plantes aquatiques (LPWG, 2017; Spent, 2001). Les types des fleurs s'étendent de la symétrie radiale

(actinomorphie) à la symétrie bilatérale (zygomorphie) et aux fleurs asymétriques, qui sont à leur tour adaptées à un large éventail de pollinisateurs tels que les insectes, les oiseaux et les chauves-souris (LPWG, 2017) (Figure 1).

La principale caractéristique unificatrice de la famille des légumineuses est la gousse (Figure 2). Celle-ci (avec très peu d'exceptions) comprend un carpelle supérieur unique avec un locule, deux à plusieurs ovules à placentation pariétale le long de la suture adaxiale en deux rangées alternées sur un seul placenta. Le type de fruit le plus courant est une gousse avec deux valves qui se séparent et se tordent pour libérer les graines, mais cela a été modifié de nombreuses façons pour faciliter la dispersion par les animaux, le vent et l'eau. Parfois, les graines se trouvent dans des chambres à graines durcies qui ne s'ouvrent pas et sont diversement en forme de noix, ailées, charnues ou flottantes. Chez d'autres taxons, les graines sont brillamment colorées et exposées sur des valves de fruits de couleur contrastante, ou pourvues de tiges charnues qui attirent les mammifères et les oiseaux. Dans encore d'autres groupes de genres, le fruit entier est divisé en chambres à une seule graine qui se désarticulent, avec une dispersion par les animaux souvent renforcée par des soies ou des poils crochus sur les chambres. L'enveloppe de la graine de légumineuse est également unique; l'épiderme forme une palissade distinctive avec des parois tordues et l'hypoderme est presque toujours composé de cellules en forme de sablier (Lewis et al, 2005; LPWG, 2017).

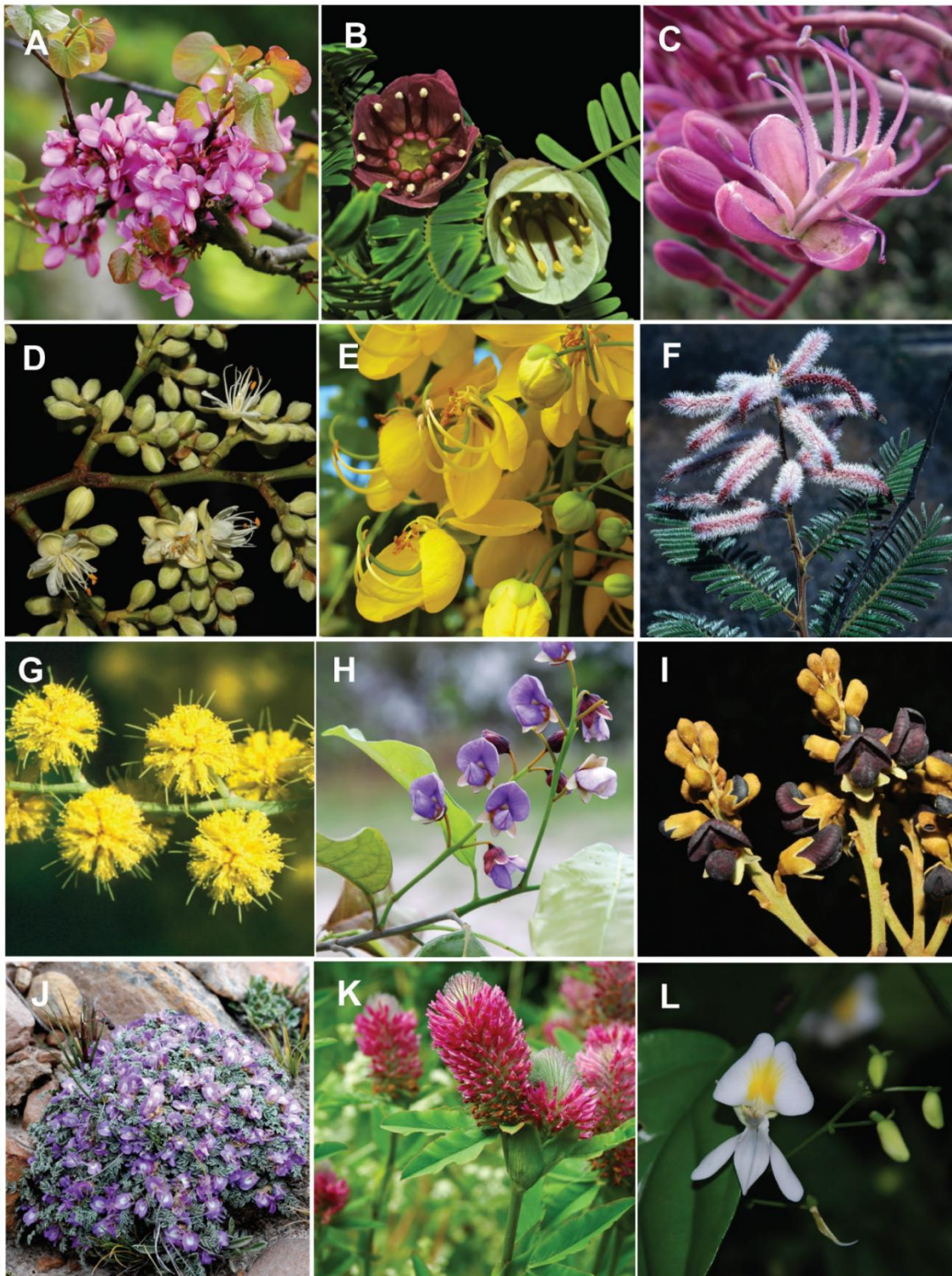


Figure 1 : Quelques formes de fleurs des *Leguminosae* **A :** *Cercis siliquastrum*; **B :** *Cadia purpurea*; **C :** *Daniellia ogea*; **D :** *Peltogyne chrysopis*; **E :** *Cassia fistula*; **F :** *Mimosa benthamii*; **G :** *Acacia dealbata*; **H :** *Haplormosia monophylla*; **I :** *Ormosia lewisii*; **J :** *Astragalus uniflorus*; **K :** *Trifolium rubens*; **L :** *Baphia leptobotrys* (LPWG, 2017).



Figure 2 : Quelques formes de fruits des *Leguminosae*. **A :** *Abarema jupunba*; **B :** *Inga feuillei*; **C :** *Swartzia parvipetala*; **D :** *Andira micrantha*; **E :** *Berlinia razzifera*; **F :** *Eligmocarpus cynometroides*; **G :** *Dalbergia lemurica*; **H :** *Machaerium millei*; **I :** *Carmichaelia cf. aligera*; **J :** *Erythrina madagascariensis*; **K :** *Piscidia grandifolia*; **L :** *Phaseolus* spp (LPWG, 2017).

I.1.2. Classification

En 1825, dans son *Prodromus*, De Candolle a subdivisé les légumineuses en quatre sous-ordres (= sous-familles), nommant pour la première fois les trois sous-familles connues en plus d'un quatrième sous-ordre, les Swartzieae, désormais inclus dans la sous-famille des Papilionoideae. Bentham en 1865 a reconnu trois grands groupes au sein des légumineuses et dont la classification a servi de base à toutes les classifications ultérieures de la famille au cours des 140 années suivantes (Taubert, 1891; Polhill, 1994; Lewis et al., 2005; LPWG, 2017). En 2017, le groupe de travail sur la phylogénie des légumineuses (LPWG) a proposé une nouvelle classification qui reflète la structure phylogénétique qui est systématiquement résolue et reconnaissable de six sous-familles: recirccription de la sous-famille des Caesalpinioideae DC. en incluant la sous-famille traditionnellement reconnue Mimosoideae, les Cercidoideae LPWG (stat. nov.), les Detarioideae Burmeist., les Dialioideae LPWG (stat. nov.), les Duparquetioideae LPWG (stat. nov.) et les Papilionoideae DC. La figure 3 montre la classification, la phylogénie et les nombres de genres et d'espèces pour chaque sous-famille.

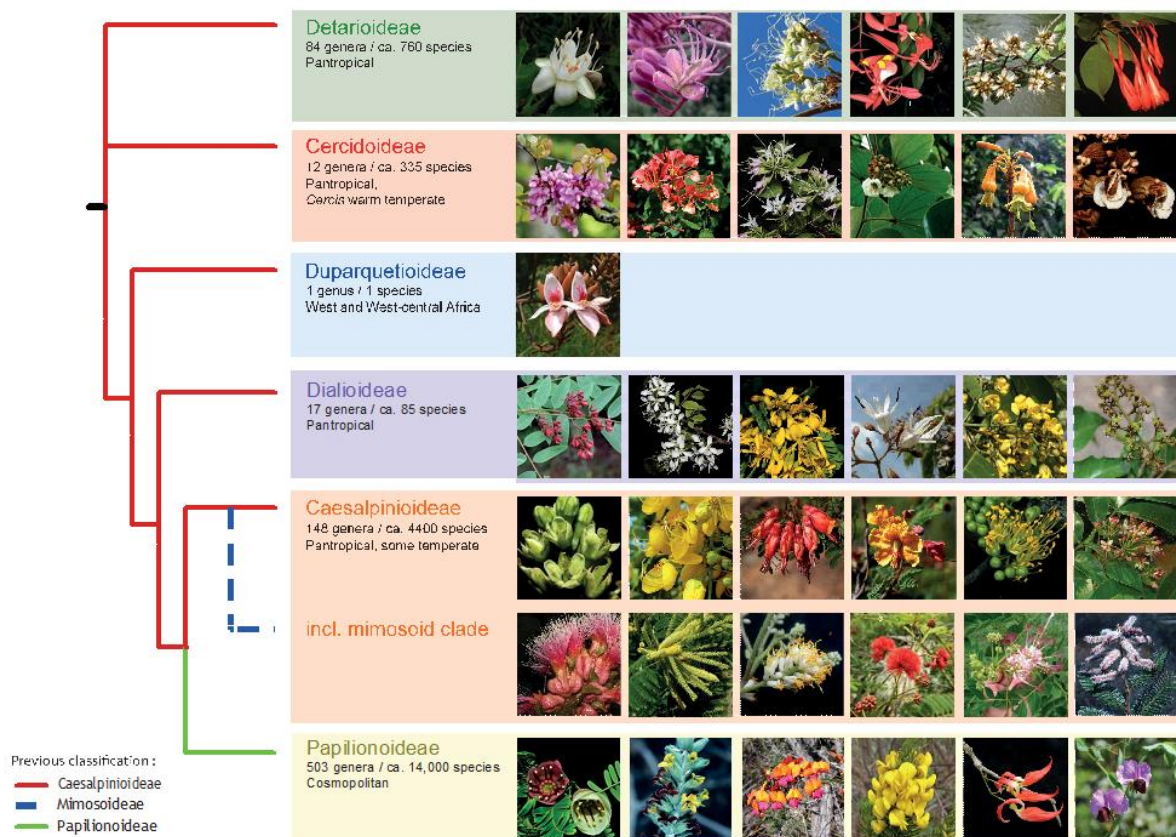


Figure 3 : Nombre de genres et d'espèces pour les six sous familles des *Leguminosae* (LPWG, 2017).

I.1.3. Intérêt

Depuis des millénaires, les légumineuses sont récoltées, cultivées, consommées et utilisées d'une multitude d'autres manières par l'homme, on peut dire qu'elles sont aussi importantes que les graminées avec une marge d'utilisations certainement plus large (Lewis et al., 2005). Les produits à base de légumineuses sont indispensables pour l'économie mondiale comme aliments (pour les humains et les animaux), produits pharmaceutiques et médicaments, carburant biodiesel, la biotechnologie (en tant qu'enzymes industrielles), bâtiment et construction, textiles, meubles et artisanat, papier et pâte à papier, exploitation minière, produits chimiques, engrais, horticulture, lutte contre les ravageurs et l'écotourisme. *Ceratonia siliqua* L. (caroubier ou caroube) est remarquable pour ses larges utilisations depuis longtemps, ces graines (on dit qu'elles sont à l'origine du carat utilisé comme poids étalon par les bijoutiers) sont utilisées pour fabriquer un substitut de chocolat et, mélangées à de la chicorée, un substitut de café. La gomme de caroube est utilisée dans les aliments et les cosmétiques, les adhésifs, les encres, les peintures, les vernis et comme émulsion de film photographique (Lewis et al., 2005).

Les légumineuses sont largement utilisées comme substituts du café, thé, tabac, noix de bétel, houblon, ail, bois d'ébène, cocaïne, savon et de la réglisse (la vraie réglisse, *Glycyrrhiza glabra* L., est également une légumineuse) (Lewis et al., 2005).

Nos ancêtres étaient conscients de la capacité de certaines légumineuses à améliorer la qualité du sol, même s'ils ne savaient pas que cela est dû à la fixation symbiotique de l'azote (Van den Bosch et Stacey, 2003). Chaque année, entre 40 à 60 millions de tonnes d'azote sont fixées par les légumineuses cultivées et 3 à 5 millions de tonnes par les légumineuses dans les écosystèmes naturels (Graham et Vance, 2003). De nombreuses espèces sont utilisées comme fertilisants des sols, engrais verts et stabilisateurs, ainsi que dans les programmes de reboisement. De nombreuses espèces des légumineuses sont exploitées dans les domaines des médicaments, insecticides, molluscicides, abortifs, purgatifs, poisons pour poissons, flèches et calvaires, agents antifongiques, aphrodisiaques, hallucinogènes, antidotes aux poisons, anti-inflammatoires et antiseptiques. Plusieurs légumineuses sont riches en gommes utilisées comme colles et épaississants alimentaires (par exemple, *Acacia*, *Astragalus*), en résines utilisées dans les peintures, les encaustiques et les vernis (par exemple, *Hymenaea*, *Copaifera*, *Prioria*) et en huiles utilisées dans les lubrifiants et les cosmétiques, en coloration d'importants colorants (brasil, l'indigo et l'algue des teinturiers) proviennent tous de

légumineuses, en fabrication de l'encre et en tannage du cuir (Graham et Vance, 2003; Lewis et al., 2005).

Les légumineuses, à grains et fourragères, sont cultivées sur environ 180 millions d'hectares (12 à 15 %) de la surface arable de la Terre et représentent 27 % de la production mondiale de cultures primaires, les légumineuses à grains (les légumes secs) contribuent avec 33 % des besoins en azote protéique de l'alimentation humaine (Graham et Vance, 2003). Elles comprennent plusieurs espèces de haricots (*Phaseolus*), le pois (*Pisum sativum* L.), le pois chiche (*Cicer arietinum* L.), la fève (*Vicia faba* L.), le pois d'Angole (*Cajanus cajan* (L.) Huth), le niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) et la lentille (*Lens culinaris* Medik.). Les légumineuses (principalement le soja, *Glycine max* (L.) Merr. et l'arachide, *Arachis hypogaea* L.) fournissent également plus de 35 % de l'huile végétale transformée dans le monde (Graham et Vance, 2003). Les légumineuses fourragères fournissent des protéines, des fibres et de l'énergie qui constituent la base de la production de viande et d'aliments quotidiens depuis des siècles. Dans les régions tempérées, la luzerne (*Medicago sativa* L.) est une culture fourragère importante pour le bétail. Les genres *Trifolium*, *Lotus*, *Melilotus* et *Vicia* sont utilisés pour le foin, l'ensilage, l'engrais vert ainsi que pour le fourrage. Sous les tropiques, les espèces des genres *Aeschynomene*, *Arachis*, *Centrosema*, *Desmodium*, *Macroptilium* et *Stylosanthes* sont toutes utilisées pour améliorer les systèmes de pâturage (Graham et Vance, 2003).

En Europe du Nord, les espèces de *Gleditsia*, *Laburnum* et *Robinia* sont largement cultivées comme arbres de rue, de parc et de jardin depuis des siècles, et les espèces exotiques, telles que les acacias australiens à floraison hivernale, sont très courantes. Quelques espèces sont vendues comme fleurs coupées "mimosa du fleuriste" (Lewis et al., 2005).

Les espèces à fleurs voyantes de *Caesalpinia*, *Calliandra*, *Mucuna* et *Strongylodon* sont également devenues très courantes dans les jardins tropicaux. Dans les régions subtropicales, une variété encore plus grande de genres et d'espèces a été introduite dans l'horticulture. Certaines d'entre elles, comme *Acacia*, *Dichrostachys*, *Leucaena*, *Mimosa* et *Sesbania*, sont devenues des plantes adventices et envahissantes. Les arbres et arbustes à usages multiples sont depuis longtemps sélectionnés et perfectionnés pour l'ombre, l'ornement, le fourrage, le bois de chauffage, le butinage pour la production de miel et l'enrichissement des sols. Parmi les favoris régionaux, citons *Butea*, *Dalbergia* et *Millettia* en Inde ; *Calliandra*, *Gliricidia*, *Inga* et *Leucaena* en Amérique centrale et *Faidherbia* et *Acacia* en Afrique (Polhill, 1997).

Les légumineuses constituent un pourcentage important du programme de conservation *ex situ*. Dans les années 80 et 90, des banques de semences ont récolté des légumineuses à usages multiples comme les *Acacia*, *Anadenanthera*, *Dalbergia*, *Erythrina*, *Prosopis* et *Pterocarpus* pour les introduire comme espèces d'essai dans les systèmes agroforestiers (Lewis et al., 2005).

Certains genres des légumineuses sont cultivés pour former des haies épineuses impénétrables, des clôtures vivantes et des brise-vents et le bois de nombreuses autres est depuis longtemps utilisé à de multiples fins, allant de la construction lourde (construction de maisons et de bateaux, traverses de chemin de fer), à la fabrication de papier et de contreplaqué, ainsi que la production de meubles raffinés, la menuiserie, la marqueterie, le placage et la construction marine (Les bois riches en silice comme *Dicorynia guianensis* Amshoff). Certaines espèces (par exemple *Kalappia celebica* Kosterm., *Dalbergia nigm* (Veil.) Allemao ex Benth.) sont devenues rares et menacées en raison de la surexploitation pour la valeur commerciale de leur bois. *Caesalpinia echinata* Lam. (bois de brésil, l'arbre qui a donné son nom au Brésil), connu par son colorant rouge est toujours le bois préféré pour les archets de violon (Lewis et al., 2005).

Le pois, espèce étudiée par Mendel, est devenu le premier système modèle pour la génétique quantitative. Plusieurs autres légumineuses ont été des objets modèles pour de nombreuses études biologiques tout au long du 20^e siècle (Van den Bosch et Stacey, 2003).

I.2. La tribu des *Hedysareae*

La tribu des *Hedysareae* appartient à la sous-famille des *Papilionoideae*, famille des *Leguminosae*. La tribu dans son ensemble se rencontre généralement dans des endroits secs et ouverts avec un climat continental tempéré ou méditerranéen, est limitée à l'Eurasie, l'Afrique du Nord, la Corne d'Afrique et Socotra (Lewis et al., 2005).

Cette tribu a été établie pour la première fois par De Candolle (1825) avec trois sous-tribus : *Alhageae*, *Coronilleae* et *Euhedysareae*. Bentham (1865) a incorporé la plupart des taxons légumineux à fruits articulés dans la tribu *Hedysarea* subdivisée en six sous-tribus : *Aeschynomeneae*, *Adesmieae*, *Coronilleae*, *Desmodieae*, *Euhedysareae* et *Stylosantheae*. Hutchinson (1964) l'a redéfinie de manière plus étroite pour contenir les genres *Alhagi* Gagnebin, *Arthroclianthus* Baill., *Baueropsis* Hutch, *Corethrodendron* Fisch. ex Basiner, *Ebenus* L., *Eversmannia* Bunge., *Hedysarum* L., *Onobrychis* Mill., *Stracheya* Benth. et *Taverniera* DC. Par la suite, Polhill (1981) a limité les *Hedysareae* à sept genres : *Alhagi*,

Ebenus, *Eversmannia*, *Hedysarum*, *Onobrychis*, *Stracheya* et *Taverniera*. Cette délimitation est restée inchangée chez Polhill (1994) et a été largement suivie par Ahangarian et al. (2007) et Amirahmadi et al. (2014). Sur la base des données de séquences ITS, Sanderson et Wojciechowski (1996) ont distingué un groupe monophylétique dans la tribu *Galegeae*, comprenant quatre genres arbustifs (*Alhagi*, *Calophaca* Fisch. ex DC., *Caragana* Fabr., *Halimodendron* Fisch. ex DC.) que Lock (2005) a transféré ensuite dans la tribu *Hedysareae*. Cependant, Ahangarian et al. (2007) ont rapporté que *Calophaca*, *Caragana* et *Halimodendron* appartenaient bien à la tribu *Galegeae* sur la base d'une analyse des ITS, ce qui a été accepté par le LPWG (2013). Suite à une étude phylogénétique, Amirahmadi et al., 2014 ont délimité la tribu dans un sens plus restreint en excluant *Calophaca*, *Caragana* et *Halimodendron*, en transférant *Sartoria* Boiss. & Heldr. dans *Hedysarum* et en établissant un nouveau genre, *Greuteria* Amirahmadi & Kaz.Osaloo, basé sur *Hedysarum* sect. *Membranacea* B.Fedtsch. (Figure 4). Actuellement la tribu *Hedysareae* compte neuf genres : *Alhagi*, *Corethroedron*, *Eversmannia*, *Greuteria*, *Hedysarum*, *Onobrychis*, *Sulla*, *Taverniera* et *Ebenus* (Duan et al., 2015).

Deux nombres chromosomiques de base sont signalés pour la tribu *Hedysareae*, $x = 8$ (le plus courant) trouvé chez *Eversmannia*, *Hedysarum*, *Onobrychis* et *Taverniera* et $x = 7$ chez *Ebenus* et *Onobrychis*, et la plupart des espèces de la sect. *Obscura* du genre *Hedysarum* (Choi et Ohashi, 2003). La plupart des espèces de la tribu sont diploïdes, plus rarement tétraploïdes (Rice et al. 2015). Le genre qui contient le plus d'espèces tétraploïdes est *Onobrychis* ($x = 7, 8$) ; une seule espèce tétraploïde est mentionnée pour le genre *Hedysarum* ($x = 8$) et aucune pour le reste des genres de la tribu (Rice et al., 2015). Les espèces à $x = 7$ sont de loin plus fréquentes que celles à $x = 8$.

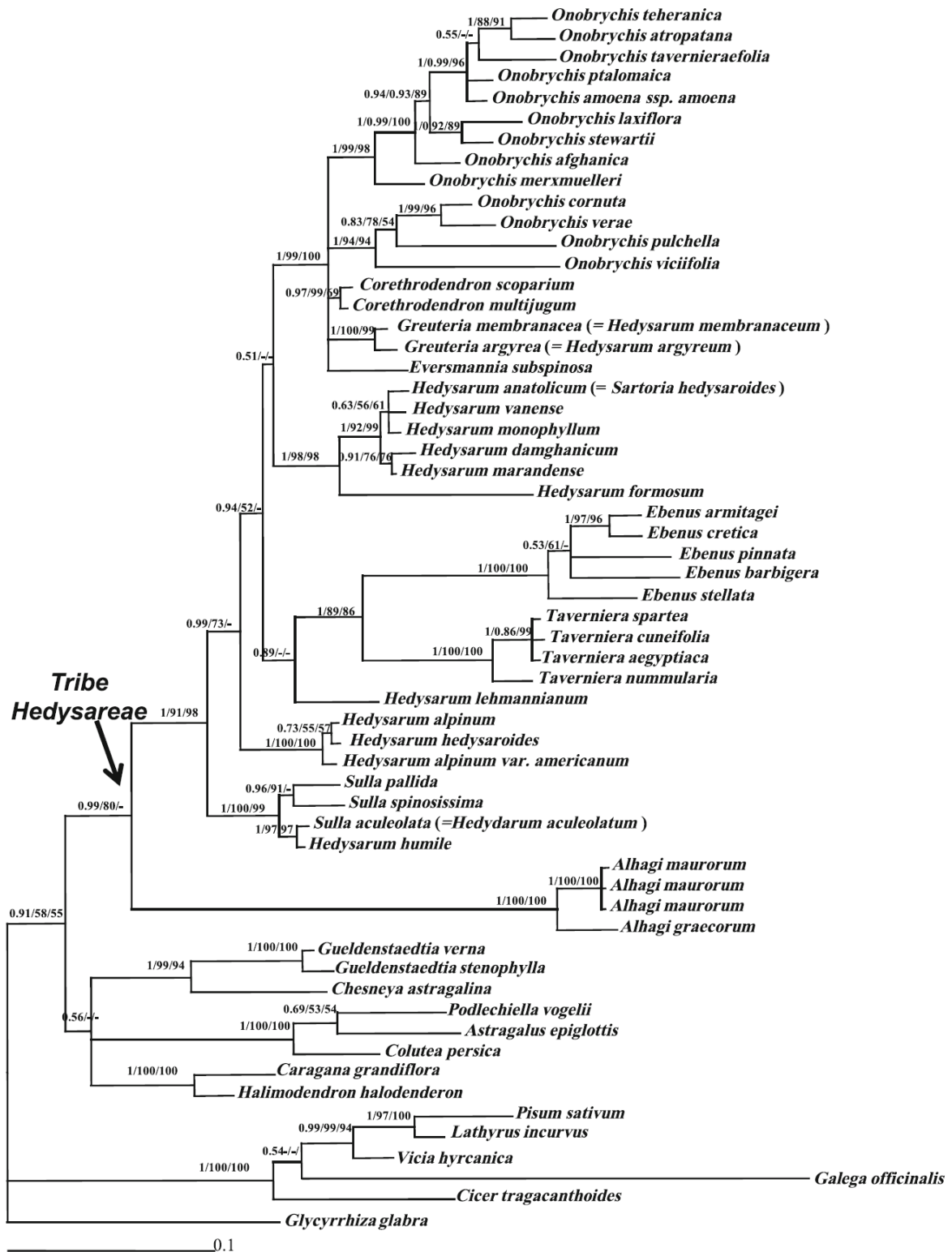


Figure 4 : Arbre consensus selon la règle de la majorité à 50 % résultant de l'analyse bayésienne de l'ensemble de données ITS de l'ADNr chez les *Hedysareae*. Les nombres au-dessus des branches correspondent à la probabilité postérieure et à la vraisemblance, ainsi qu'aux valeurs bootstrap de parcimonie, respectivement. Les valeurs de 50 % n'ont pas été indiquées (Amirahmadi et al., 2014).

I.3. Le genre *Ebenus* L.

Le genre *Ebenus* L. (Famille des *Leguminosae*, sous-famille des *Papilionoideae*, tribu des *Hedysareae*) est composé de 20 espèces. La Turquie seule compte 14 espèces endémiques dont deux avec deux variétés chacune : *E. plumosa* Boiss. et Bal. (avec deux variétés : *E. plumosa* var. *plumosa* et *E. Plumosa* var. *speciosa*) et *E. reesei* Hub-Mor. (avec deux variétés: *E. reesei* var. *reesei*, *E. reesei* var. *minor*), *E. macrophylla* Jaub. et Spach., *E. barbiger* Boiss., *E. haussknechtii* Bornm. ex Hub-Mor., *E. depressa* Boiss. et Bal., *E. bourgaei* Boiss., *E. cappadocica* Hausskn. Siehe ex Bornm., *E. boissieri* Barbey., *E. longipes* Boiss. et Bal., *E. hirsuta* Jaub. et Spach., *E. laguroides* Boiss., *E. pisidica* Hub-Mor., *E. argentea* Siehe ex Born (Aytaç et al., 2000; Azcan et al., 2001; Çelebi et al., 2009). Les autres espèces sont *E. pinnata* Ait. (Afrique du Nord), *E. armitagei* Schweinf et Traub. (Égypte, Libye et Est algérien), *E. cretica* L. et *E. sibthorpii* DC. (Crète), *E. stellata* Boiss. (Afghanistan, Perse et Péninsule arabique), *E. lagopus* (Iran) (Kaveh et al., 2012).

I.3.1. L'origine du mot *Ebenus*

Le mot "*Ebenus*" (Ebenos en grec) a été emprunté au mot arabe "Abnous" faisant référence à un bois dur noir compact (c'est-à-dire l'ébène) (Drapiez, 1835 ; Gledhill, 2008). Le nom *Ebenus cretica* (ébène de Crète) semble avoir été adopté par analogie avec le faux ébène (*Laburnum anagyroides* Medik.) auquel il ressemble par l'apparence, la morphologie des feuilles, la forme des inflorescences, la structure des fleurs, et même parfois par la couleur des fleurs (formes à fleurs roses de *L. anagyroides*) (obs. pers).

I.3.2. Morphologie et écologie du genre *Ebenus*

Les espèces du genre *Ebenus* sont des vivaces hémicryptophytes, suffrutescentes ou herbacées, soyeuses-pubescentes ou velues, avec des tiges rampantes ou érigées, des feuilles imparipennées, avec 3-15 folioles entières (Huber-Morath, 1970 ; Jafri, 1980). Il est considéré comme un genre morphologiquement unique au sein du clade des Hedysaroides en raison de ses inflorescences globuleux-cylindriques, compacts, densément poilés, longuement pédonculés, petites corolles jaune-violet, ailes très courtes et gousses minuscules articulées (segmentées), suffisamment petites pour être incluses dans le tube du calice (Huber-Morath 1970 ; Çelebi et al., 2009 ; Amirahmadi et al., 2014 ; Aytaç et al., 2015 ; Duan et al., 2015). En outre, les caractéristiques morphologiques, telles que la surface réduite des feuilles (folioles étroitement oblongues), la pubescence dense et brillante sur l'ensemble des parties végétatives et florales, la distribution dans des environnements plutôt secs (voir le tableau 1),

l'anatomie et l'histologie des plantes (Vrachnakis et al., 2005 ; Syros et al., 2006), la morphologie et la structure des grains de pollen (Aytaç et al., 2000 ; Pinar et al., 2000 ; Ghanavati et Amirabadizadeh, 2012) montrent que les membres d'*Ebenus* sont plutôt de nature xérophile.

Tableau 1 : Caractérisation des espèces du genre *Ebenus*.

Espèces	Habitat	Morphologie	Distribution	Ecologie
<i>E. pinnata</i> Ait.	Herbe pérenne (Jafri, 1980; Quézel et Santa 1962)	Plante: 30–60 cm Foliolle: 2–5 paires Pédoncule: -30 cm Fleur: rose Calice: 2-3 fois plus long que la corolle Graine: 1 (Jafri, 1980; Quézel et Santa 1962)	Méditerranéenne Libye, Tunisie, Algérie, Maroc (Jafri, 1980; Quézel et Santa 1962)	Collines non cultivées, versants de montagne, clairières de forêts et de fourrés, champs rocailloux (Jafri, 1980; Quézel et Santa 1962)
<i>E. armitagei</i> Schweinf. et Taubert.	Petit arbuste (Jafri, 1980)	Plante: 15–25 cm Foliolle:3 Pédoncule: – Fleur: rose Calice: 2-3 fois plus long que la corolle Graine: 1 (Jafri, 1980)	Méditerranéenne Égypte, Libye (Jafri, 1980)	Sol pierreux (Jafri, 1980)
<i>E. cretica</i> L.	Sous- arbuste boisé, pérenne (Vrachnakis et Vlahos, 2008 ; Bazos et Rivers, 2017)	Plante: supérieur à 60 cm Foliolle: 3–7 paires Pédoncule: – Fleur: rose Calice: aussi long ou plus court que la corolle Graine: 1 (Sibthorp, 1833)	Méditerranéenne Crète (Grèce) (Bazos et Rivers, 2017)	Collines rocailleuses, falaises abruptes (Bazos et Rivers, 2017)
<i>E. sibthorpii</i> DC.	Pérenne (Sibthorp, 1833)	Plante: up to 30cm Foliolle: 3–5 paires Pédoncule: – Fleur: rouge-rose Calice: aussi long que la corolle Graine: 1 (Sibthorp, 1833)	Méditerranéenne Sud-est de la Grèce (Sibthorp, 1833)	bords de routes, roches sédimentaires (Sibthorp, 1833)

<i>E. barbigera</i> Boiss.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 10–30 cm Foliole: 3–4 paires Pédoncule: 4–10 cm Fleur: rose avec carène à longue barbe Calice: plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Méditerranéenne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Roches calcaires, clairières de la forêt de <i>Pinus nigra</i> (Aytaç et al., 2015)
<i>E. pisidica</i> Hub.–Mor. et Reese	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 5–15 cm Foliole: 3–4 paires Pédoncule: 3–8 cm Fleur: rose Calice: plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Méditerranéenne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Sols de roches serpentines, forêt de <i>Pinus nigra</i> (Aytaç et al., 2015)
<i>E. plumosa</i> Hub.–Mor.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 25–60 cm Foliole: 4–7 paires Pédoncule: 10–20 cm Fleur: Jaune avec une carène rose Calice: un peu plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Méditerranéenne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Pentes calcaires rocallieuses sèches avec des arbustes de <i>Quercus coccifera</i> (Aytaç et al., 2015)
<i>E. boissieri</i> Barbey	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 20–50 cm Foliole: 2–5 paires Pédoncule: 15–35 cm Fleur: Jaune Calice: un peu plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Méditerranéenne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Près des champs (Aytaç et al., 2015)

<i>E. bourgaei</i> Boiss.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 5–20 cm Foliole: 3 Pédoncule: 2–7 cm Fleur: rose Calice: un peu plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Méditerranéenne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	buissons de <i>Quercus coccifera</i> (Aytaç et al., 2015)
<i>E. reesei</i> Hub.–Mor.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 15–30 cm Foliole: 2–3 paires Pédoncule: 8–16 cm Fleur: rose Calice: plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Méditerranéenne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Zone protégée, pentes calcaires (Aytaç et al., 2015)
<i>E. macrophylla</i> Jaub. et Spach.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 25–35 cm Foliole: 3 paires Pédoncule: 15–30 cm Fleur: rose Calice: un peu plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Irano-turanienne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Sol gypseux (Aytaç et al., 2015)
<i>E. hirsuta</i> Jaub. et Spach	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 10–25 cm Foliole: 3–6 paires Pédoncule: 3–10 cm Fleur: jaune, étendard plus court que la carène Calice: souvent plus court que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Irano-turanienne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Calcaire pierreux pentes, rochers, zone protégée (Aytaç et al., 2015)

<i>E. longipes</i> Boiss. & Bal.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 20–30 cm Foliole: 2–3 paires Pédoncule: 15–25 cm Fleur: rose Calice: plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Irano-turanienne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Pentes pierreuses, steppe (Aytaç et al., 2015)
<i>E. depressa</i> Boiss. et Bal.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 5–10 cm Foliole: 3 Pédoncule: 3–4 cm Fleur: rose Calice: un peu plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Irano-turanienne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Endroits rocheux (Aytaç et al., 2015)
<i>E. cappadocica</i> Hausskn. et Siehe.	Pérenne (Huber-Morath, 1971)	Plante: 5–10 cm Foliole: 3 Pédoncule: 1–4 cm Fleur: rose Calice: un peu plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)	Irano-turanienne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)	Zone protégée (Aytaç et al., 2015)
<i>E. zekiyeae</i> Aytaç et Yildirim	Pérenne (Aytaç et Yildirim, 2017)	Plante: 5–15 cm Foliole: 5–9 paires Pédoncule: 1–4 cm Fleur: rose Calice: aussi long ou plus court que la corolle Graine: 1 (Aytaç et Yildirim, 2017)	Iran-turanienne Turquie (Aytaç et Yildirim, 2017)	Roches calcaires, pentes (Aytaç et Yildirim, 2017)

<p><i>E. haussknechtii</i> Bornm.</p>	<p>Pérenne (Aytaç et Yildirim, 2017)</p>	<p>Plante: 20–30 cm Foliole: 2–4 paires Pédoncule: 6–10 cm Fleur: rose Calice: plus long que la corolle Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)</p>	<p>Irano-turanienne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)</p>	<p>Pentes rocheuses calcaires, bord de route (Aytaç et al., 2015)</p>
<p><i>E. laguroides</i> Boiss.</p>	<p>Pérenne (Aytaç et Yildirim, 2017)</p>	<p>Plante: 5–30 cm Foliole: 3–5 paires Pédoncule: 3–13 cm Fleur: rose Calice: aussi long ou plus long que la corolle, avec des dents inégales : les trois inférieures sont plus longues que les deux supérieures Graine: 1 (Huber-Morath, 1971; Aytaç et Yildirim, 2017)</p>	<p>Irano-turanienne Turquie (Huber-Morath, 1971; Aytaç et al., 2015; Aytaç et Yildirim, 2017)</p>	<p>Steppe, pentes rocheuses (Aytaç et al., 2015)</p>
<p><i>E. stellata</i> Boiss.</p>	<p>Arbuste pérenne (eFloras, 2008)</p>	<p>Plante: 30–40 cm Foliole: 3 Pédoncule: 3–8 cm Fleur: jaune avec des taches rouges Calice: plus long que la corolle Graine: 1 (eFloras, 2008 ; Kaveh et Osaloo, 2012)</p>	<p>Irano-turanienne Afghanistan, Inde, Iran, Oman, Pakistan, Himalaya occidental (eFloras, 2008)</p>	<p>Zone ouverte des falaises et sommets orientés vers les nord (eFloras, 2008)</p>

<p><i>E. lagopus</i> Boiss.</p>	<p>Arbuste pérenne (eFloras, 2008)</p>	<p>Plante: moins de 20 cm Foliolle: 3–5 paires Pédoncule: 7–10 cm Fleur: rougeâtre Calice: plus long que la corolle Graine: 1–3 (Boissier, 1872)</p>	<p>Irano-turanienn Sud de l’Iran (Boissier, 1872)</p>	<p>Prairies sèches et pierreuses (Boissier, 1872)</p>
-------------------------------------	--	--	---	---

I.3.3. Intérêt du genre *Ebenus* L.

Les plantes d'*Ebenus* sont utilisées dans la médecine populaire traditionnelle pour traiter divers troubles de santé en Turquie (Pinar, 2000 ; Uyar, 2006 ; Özdemir, 2015). Elles contiennent de 4,0 à 13,0 % d'huiles de graines comprenant cinq acides gras différents (Azcan et al., 2001). *Ebenus haussknechtii* Bornm. ex Hub.-Mor. est utilisé pour prévenir les problèmes de peau, l'hypertension et les maladies de l'estomac (Uyar et al., 2006). L'analyse de sa composition chimique a permis d'identifier divers composés naturels (dont deux glycosides flavonoïdes et un méthylinositol) ayant une activité antimicrobienne très importante (Uyar et al., 2006). Quant à *E. hirsuta* Jaub. et Spach. elle est utilisée pour traiter les troubles rénaux (Özdemir et Alpınar, 2015 ; Kültür et al., 2021). Ses parties aériennes contiennent principalement de l'hyperoside, de la rutine, de l'hespéridine, de l'acide tannique et de l'acide p-coumarique (Ceylan et al., 2016). Ses extraits présentent de forts effets antigénotoxiques et une activité significative contre les bactéries et les champignons (Ceylan et al., 2016). Les auteurs suggèrent qu'*E. hirsuta*, ainsi que *Cytisopsis dorycnifolia*, pourraient être utiles pour la préparation de produits pharmaceutiques et d'ingrédients alimentaires fonctionnels de grande valeur. De même, *E. laguroides* Boiss. et *E. macrophylla* Jaub. et Spach. se sont révélés avoir une activité antioxydante et antibactérienne significative dû aux différents composés chimiques, en particulier la rutine, le composé dominant dans les espèces d'*Ebenus* (Bektas et al., 2018). Les extraits de racines et de parties aériennes d'*E. boissieri* Barbey ont révélé une activité immunomodulatrice et antitumorale induisant l'apoptose dans les cellules du cancer du sein (Imir et al., 2016) et l'apoptose induite par la caspase sur la lignée cellulaire Hela du cancer du col de l'utérus (Simsek et al., 2017 ; Bhuwan et al., 2022). *E. boissieri* peut être considéré comme une source de nouveaux agents anti-apoptotiques et donc anti-cancérogènes (Aydemir et al. 2015 ; Imir et al., 2016). Outre

son rôle ostéoprotecteur, *E. cretica* est très riche en flavonoïdes et isoflavones tels que la formononétine (Ingham, 1978), le glucoside de maesopsine (aurone) et d'autres composés (Kounadi et al., 2011). Les résultats obtenus par Kounadi et al. (2011) représentent des informations précieuses sur les effets bénéfiques d'*E. cretica* qui pourrait être utilisé comme complément alimentaire, comme aliment fonctionnel ou même comme médicament. L'administration d'extraits d'*E. cretica* exerce un effet bénéfique significatif sur la perte de densité osseuse chez des rats ovariectomisés (Dontas et al., 2019). Mitrocotsa et al. (1999) rapporte une longue liste de composants importants isolés à partir d'*E. cretica* et d'*E. sibthorpii* DC, notamment le D-pinitol, la quercétine, les glycosides d'isorhamnétine et, en particulier, la rutine-7,4'-di-O-méthyl éther et 8,4'-diméthoxy-7-hydroxy-isoflavone, les glycosides d'ionyle icariside B1 et B2. *E. stellata* est présentée comme vitale de médicaments avec une activité antioxydante significative (Mandokhail et al., 2020). Cette plante est également utilisée pour traiter l'indigestion chez le bétail au Pakistan (Abidin et al., 2021). Les analyses phytochimiques des extraits d'*E. stellata*, connus pour leur activité anticonvulsive, ont révélé la présence de coumarines, d'alcaloïdes, de glycosides cardiaques, de flavonoïdes, de quinones, de saponines, de stéroïdes, de terpénoïdes et de tanins (Khodaparast et al., 2012 ; Zameer et al., 2022). Les extraits d'*E. stellata* ont des activités antioxydantes et antimicrobiennes (bactéries et champignons) significatives (Zameer et al., 2022). Une étude de Kiazai et al. (2019) a montré que la concentration de métaux lourds dans les plantes d'*E. stellata* est inférieure aux limites sécurité selon la FAO et l'OMS, ce qui dénote leur non-toxicité et leur aptitude à être utilisées comme médicaments traditionnels et pour la synthèse de nouveaux médicaments. *E. armitagei* Schweinf. et Taub. figure parmi les plantes ayant une activité chistosomicide modérée in vitro (Yousfi et al., 2007). L'étude de la composition chimique des plantes d'*E. pinnata* de Tunisie a permis de détecter la présence de plusieurs métabolites secondaires dont l'ombuoside, le kaempférol 3-O-rutinoside, la rutine, la catéchine, la picéine, le β -sitostérol et le sitostérol β -glucoside, les quatre premiers ayant une activité antioxydante significative (Braham et al. 2004, Abreu et al. 2007). Une étude par Nouioua et Gaamoune (2018) a montré qu'*E. pinnata* présente l'extrait le plus antioxydant (IC₅₀ = 12) par rapport à huit autres taxons d'Algérie.

I.3.4. Classification du genre *Ebenus*

Boissier dans sa "Flora Orientalis" a divisé le genre *Ebenus* en trois sections (Huber-Morath, 1965):

- *Euebenus* Boiss. : Cette section regroupe la majorité des espèces du genre (*E. cretica*, *E. sibthorpii*, *E. pinnata*, *E. armitagei* et les 14 espèces endémiques de la Turquie) des herbacées et arbustes sans épines, stipules soudées, ailes très courtes, fruits monospermiques.
- *Tragacantha* Jaub. et Spach : Arbustes épineux, stipules soudées, ailes très courtes, fruits monospermiques, avec une seule espèce *E. stellata* Boiss. .
- *Ebenidium* (Jaub. et Spach) Boiss. : Cette section est représentée par *E. lagopus* seule, Herbacées non épineuse, stipules libres, ailes aussi longues que la carène, fruits à 3 graines (Jaub. et Spach) Boiss..

Kaveh et al. (2012) ont réalisé une étude cladistique basée sur 21 caractères morphologiques de 26 espèces de la tribu des *Hedysareae* dont 19 du genre *Ebenus*, 2 du genre *Taverniera*, 2 du genre *Onobrychis* et 2 du genre *Hedysarum* comme ingroupe en plus de *Alhagi persarum* comme out-groupe. L'analyse a révélé que le genre *Ebenus* est monophylétique mais aucune de ses sections multi-spécifiques décrites par Boissier ne l'est (Figure 5). *E. cretica* et *E. stellata* constituent les branches les plus basiques par rapport au clade composé des espèces restantes.



Figure 5: Arbre le plus parcimonieux de l'analyse cladistique basée sur 21 caractères morphologiques des espèces du genre *Ebenus* et genres proches. Les valeurs sur les branches correspondent aux pourcentages bootstrap (Kaveh et Kazempour-Osaloo, 2012).

Les profils SDS-PAGE des protéines extraites des graines ont servi pour réaliser une phylogénie de 15 espèces d'*Ebenus* : *E. macrophylla*, *E. plumosa* var. *plumosa*, *E. plumosa* var. *speciosa*, *E. barbiger*, *E. resei*, *E. haussnechtii*, *E. depressa*, *E. bourgaei*, *E. cappadocica*, *E. boissieri*, *E. hirsuta*, *E. longipes*, *E. argentea*, *E. laguroides*, *E. pisidica* (Figures 6 et 7) (Çelebi et al., 2009). Les résultats de cette étude révèlent une relation étroite entre *E. plumosa* var. *plumosa* et *E. plumosa* var. *speciosa* avec une distance génétique de 0,4 % (Figure 7), confirmant les résultats morphologique et cytogénétique obtenus par Aksoy et al. (2001).

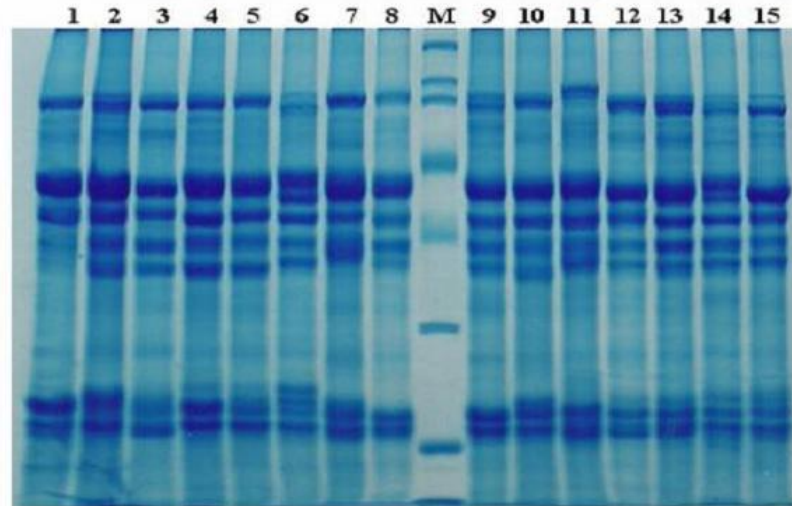


Figure 6: Profils SDS-PAGE des protéines des graines chez le genre *Ebenus* (1) *E. macrophylla*, (2) *E. plumosavar. plumosa*, (3) *E. plumosavar. speciosa*, (4) *E. barbiger*, (5) *E. reesei*, (6) *E. haussknechtii*, (7) *E. depressa*, (8) *E. bourgaei*, (M) Marqueurs [Myosine (200 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97 kDa), sérum albumine (66 kDa), ovalbumine (45 kDa), anhydrase carbonique (31 kDa), inhibiteur de trypsine (21 kDa), lysozyme (14 kDa)], (9) *E. cappadocica*, (10) *E. boissieri*, (11) *E. hirsuta*, 12- *E. longipes*, (13) *E. argentea*, (14) *E. laguroides*, (15) *E. pisidica* (Çelebi et al., 2009).

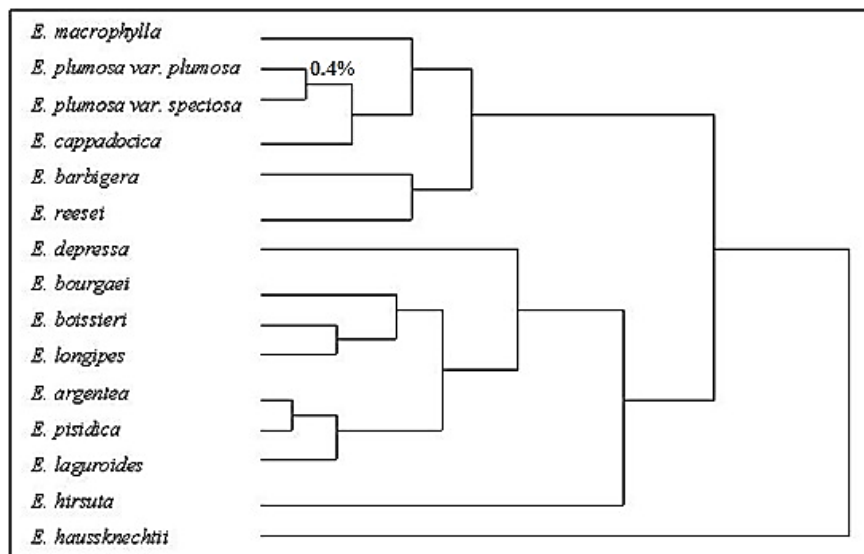


Figure 7 : Phénogramme UPGMA basé sur les similarités calculées sur la base des profils SDSPAGE des protéines des graines chez quelques espèces d'*Ebenus* (Çelebi et al., 2009).

Contrairement aux analyses précédentes, l'analyse des 15 espèces par RAPD ne confirme pas les liens de parenté étroits entre *E. plumosa var. plumosa* et *E. plumosa var. speciosa* signalée précédemment (Figures 8 et 9) (Çelebi et al., 2009).

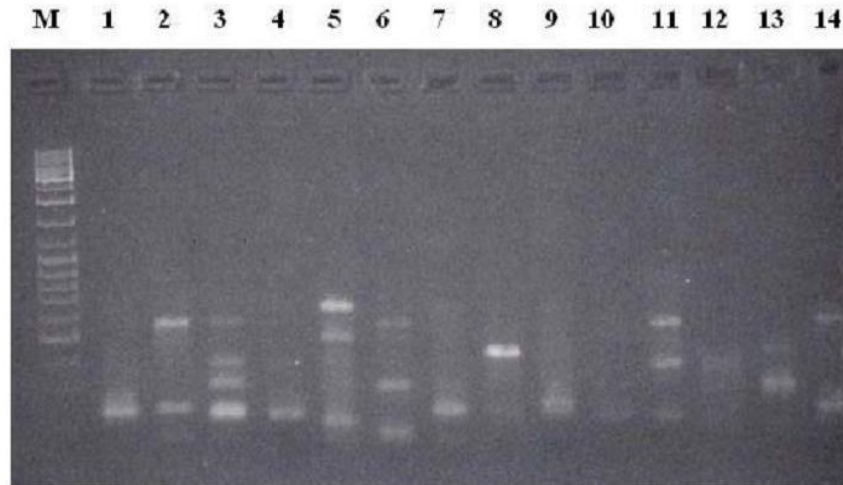


Figure 8 : Profils RAPD de 15 espèces du genre *Ebenus*. M: Marqueurs (Fermentas, Gene Ruler™ DNA Ladder Mix SMO331; 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp) 1-*E. macrophylla*; 2-*E. plumosa* var. *plumosa*; 3-*E. plumosa* var. *speciosa*; 4-*E. barbiger*; 5-*E. reesei*; 6-*E. haussknechtii*; 7-*E. depressa*; 8-*E. bourgaei*; 9-*E. cappadocica*; 10-*E. boissieri*; 11-*E. hirsuta*; 12-*E. longipes*; 13-*E. argentea*; 14-*E. laguroides* (Çelebi et al., 2009).

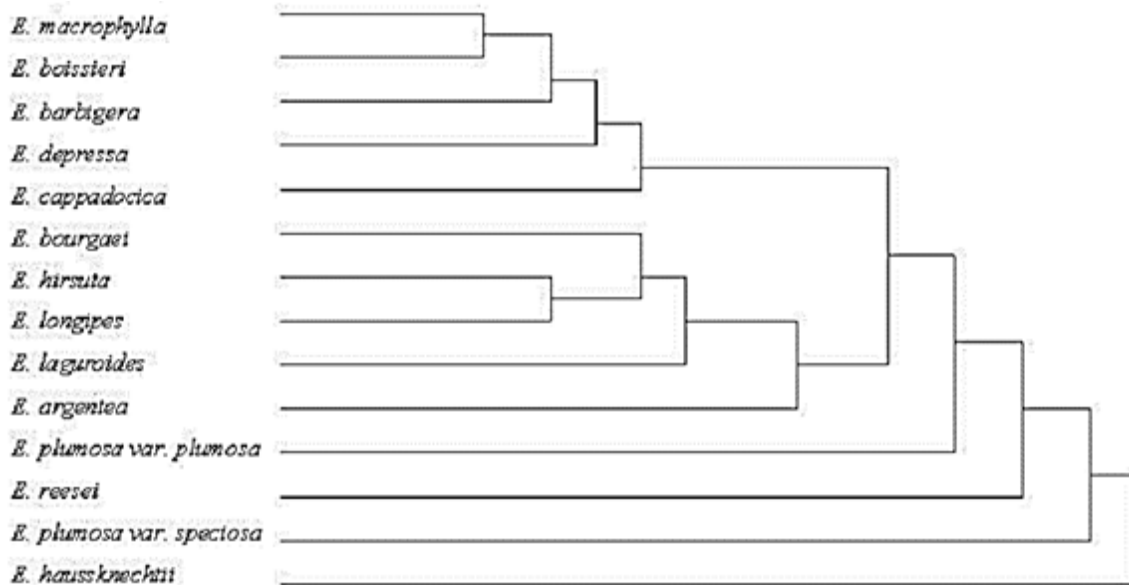


Figure 9 : Phénogramme UPGMA basé sur les profils RAPD de 15 espèces du genre *Ebenus* (Çelebi et al., 2009).

I.3.5. Cytogénétique du genre *Ebenus*

Les comptages chromosomiques ont été effectués pour toutes les espèces d'*Ebenus* sauf pour *E. lagopus* (Sud d'Iran) et *E. armitagei* (Libye et Egypte). Pour toutes les espèces, le nombre chromosomique est de $2n = 2x = 14$ ($x = 7$) (Aytaç et Yildirim, 2016 ; Aytaç et al.,

2015 ; Rice et al. 2015) sauf pour *E. pinnata* où deux nombres chromosomiques ont été signalés : $2n = 14$ compté sur une population de la région de Safi au Maroc (Molero et Montserrat Marti, 1986) et $2n = 18$ compté sur une population du Haut Atlas Marocain, entre Tizi-n-Test et Azni (Kamari et al., 1999).

E. plumosa var. *plumosa*, *E. plumosa* var. *speciosa*, *E. macrophylla*, *E. barbiger*a, *E. longipes* et *E. argentea* sont diploïdes avec $2n = 2x = 14$ (Figure 10) (Aytaç et al., 2000 ; Aksoy et al., 2001).

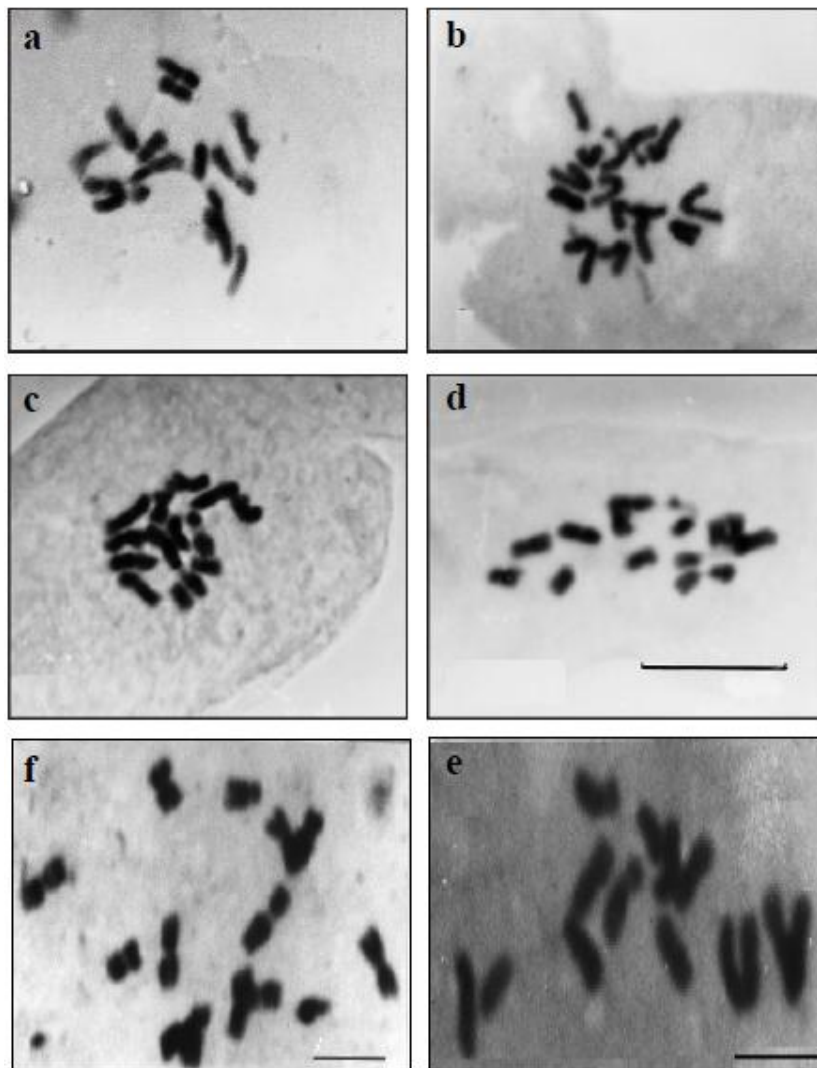


Figure 10 : Plaques métaphasiques de 6 espèces d'*Ebenus* L. de Turquie. a- *Ebenus plumosa* var. *plumosa* ; b- *E. plumosa* var. *speciosa* ; c- *E. macrophylla* ; d- *E. barbiger*a, (Aksoy et al., 2001) ; e- *E. longipes* ; f- *E. argentea* (Aytaç et al., 2000). Barre d'échelle de 10 µm pour a, b, c et d, et de 5 µm pour e et f.

Chez *E. macrophylla* et *E. barbiger*a, tous les chromosomes sont métacentriques. La longueur totale des chromosomes d'*E. barbiger*a est plus petite que celle d'*E. macrophylla* (Figure 11 a et b). La longueur des chromosomes varie de 4,22 à 2,15 μm chez *E. macrophylla* et de 2,78 à 1,58 μm chez *E. barbiger*a. La longueur totale du lot haploïde est de 21,93 μm chez *E. macrophylla* et 15,34 μm *E. barbiger*a. Des satellites sont présents sur le bras long du chromosome 4 chez *E. macrophylla* et le bras long du chromosome 3 chez *E. barbiger*a (Figure 11 c et d).

Un fragment additionnel de 2.44 μm sur l'un des chromosomes de la paire 6, dont la nature est inconnue, est observé chez *E. plumosa* var. *speciosa* (Figure 11 f) (Aksoy et al., 2001).

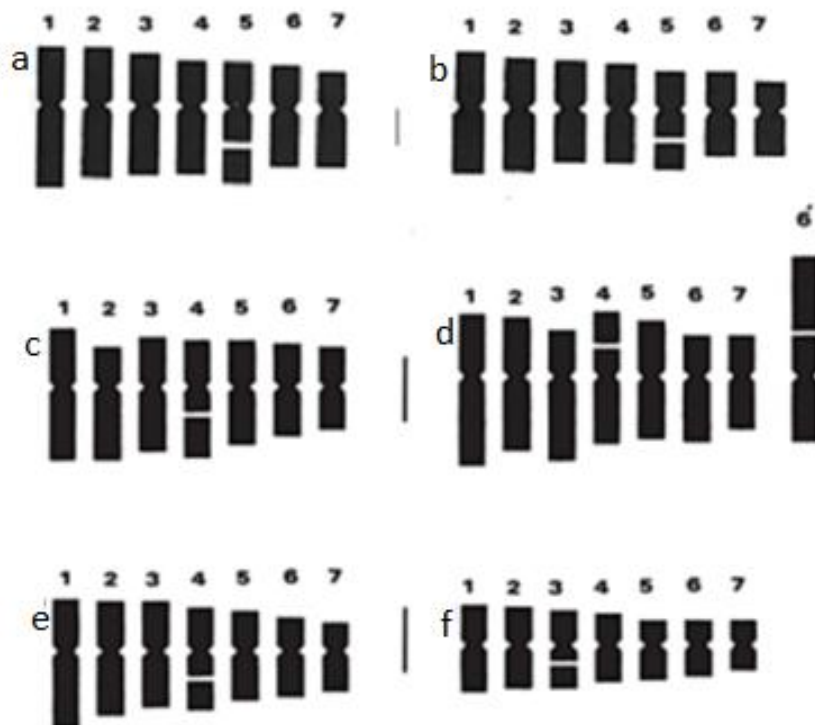


Figure 11 : Idiogrammes de 6 espèces du genre *Ebenus* L. a- *E. longipes*, b- *E. argentea* (Aytaç et al., 2000) ; c- *E. macrophylla*, d- *E. barbiger*a, e- *E. plumosa* var. *Plumosa*, f- *E. plumosa* var. *Speciosa*, (Aksoy et al., 2001). La barre d'échelle correspond à 2 μm pour a, b, c, d, et à 1 μm pour e, f.

Les grains de pollen ont une forme et une structure similaires pour toutes les espèces d'*Ebenus* étudiées jusqu'à présent (Aytaç et al. 2000 ; Pinar et al. 2000 ; Ghanavati et Amirabadizadeh 2012 ; Halbritter et al. 2020). Ils sont radialement symétriques, isopolaires, tricolpés, allongés (prolate), sphériques, ou rarement aplatis (perprolates), intine de 0,5 μm et exine de 1 μm (ektexine plus épaisse que l'endexine), avec des ornements réticulés et

des lumina (lacunes) plus ou moins étroites (Figure 12). La taille des grains de pollen est assez hétérogène entre les espèces. Leur diamètre polaire varie de 24,6 μm à 40 μm , et leur diamètre équatorial de 12,4 μm à 20 μm , avec des contours elliptiques allongés en vue équatoriale et des contours circulaires à subcirculaires en vue polaire respectivement (Aytaç et al. 2000 ; Pinar et al. 2000 ; Ghanavati et Amirabadizadeh 2012 ; Halbritter et al. 2020).

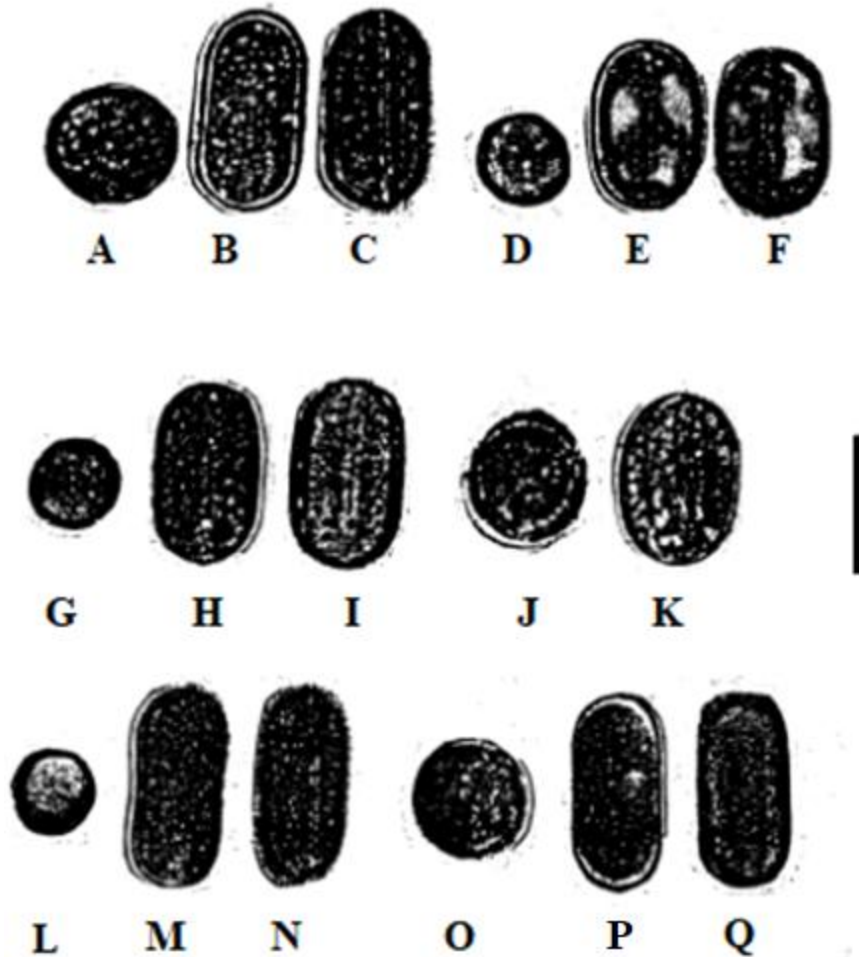


Figure 12 : Forme des grains de pollen du genre *Ebenus*. A, D, G, J, L, O : Vues équatoriales. B, e, H, K, M, P : Vues polaires. C, F, I, K, N, Q : Vues équatoriales montrant une ouverture sur le profile. (A-C) *E. plumosa*. (D-F) *E. barbigara*. (G-I) *E. bourgei*. (J, K) *E. cappadocica*. (L-N) *E. boisseri*. (O-Q) *E. laguroides* (Pinar et al., 2000). La barre d'échelle correspond à 20 μm .

I.4. *Ebenus pinnata* Aiton

I.4.1. Ecologie et distribution géographique

A l'exception d'*E. armitagei*, qui est limitée à quelques endroits du bord de mer au nord-est de l'Égypte et du nord-ouest de la Libye, *E. pinnata* est la seule espèce clairement nord-africaine du genre ; elle est mentionnée dans le nord-ouest de la Libye, en Tunisie, en Algérie et au Maroc (Jafri 1980 ; Boulos 1999 ; Dobignard et Chatelain 2012). Cette dernière est généralement présente sur les sols calcaires pauvres des collines et des pentes montagneuses non cultivées, dans les clairières des forêts et des fourrés (souvent associés à *Pinus halepensis*), dans les champs rocaillieux, depuis le niveau de la mer jusqu'à environ 1200 m d'altitude, depuis le bord de la Méditerranée jusqu'aux limites septentrionales de l'Atlas saharien (Quézel et Santa 1962 ; Fennane et al. 2007). Elle est présente dans presque toute la Tunisie (Pottier-Alapetite 1979) et s'étend plus à l'est jusqu'au centre nord de la Libye (près du bord de mer) où elle est rare (Jafri 1980). Elle pousse dans une large gamme de conditions climatiques, de l'étage humide à l'étage aride (Fennane et al. 2007). Selon Quézel et Santa (1962), elle est absente sur le littoral de l'Est algérien.

I.4.2. Description morphologique

E. pinnata est une herbe vivace, ligneuse à la base, avec des poils blancs soyeux donnant à la plante un aspect blanchâtre, des tiges ramifiées de 30-60 cm de hauteur ; 5-15 folioles, velues, linéaires-oblongues ou linéaires-lancéolées jusqu'à 20 x 4 mm, obtuses à aiguës aux sommets, légèrement mucronées ; stipules presque aussi longues que les folioles mais généralement plus larges, brunâtres, lobées ou dentées aux sommets ; inflorescences denses, à fleurs nombreuses, ovoïdes, velues et bractéiformes, avec un très long pédoncule ; fleurs roses, petites (5-6 mm), incluses dans le long calice plumeux (12-15 mm de long) ; gousses ovoïdes, membraneuses, densément poilues à la base, réticulées et incluses dans le tube du calice (Figure 13) (Desfontaines, 1798-1799 ; Quézel et Santa, 1962 ; Jafri, 1980).

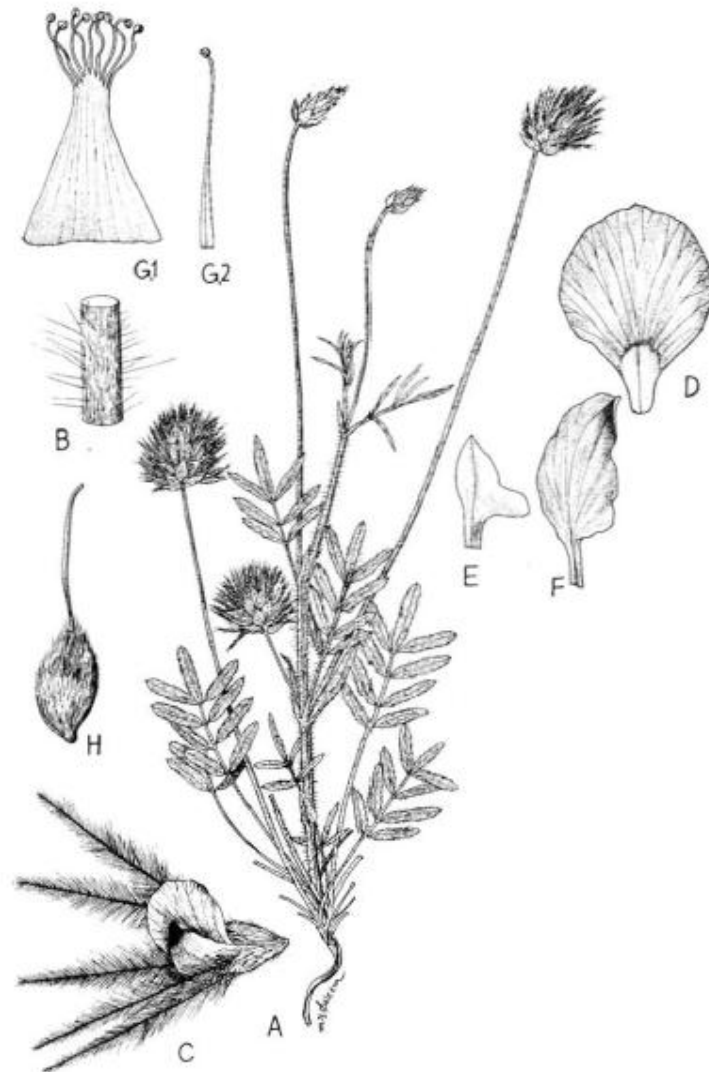


Figure 13 : A : *Ebenus pinnata*; B : Portion de la tige; C : Fleur; D : Etendard ; E : Aile; F : Carène; G₁ : 9 étamines soudées; G₂ : 10^{ème} étamine; H : Gousse (Jafri 1980).

Trois types fonctionnels intraspécifiques ont été décrits dans les populations d'*E. pinnata* de Libye: le type éphémère (individus courts, avec peu de branches et 1-5 inflorescences) (Figure 14 a); le type modulaire (individus de hauteur intermédiaire, avec peu de branches et 5-50 inflorescences) (Figure 14 b); le type permanent (individus avec une racine pérenne, plusieurs longues branches et 50-100 inflorescences) (Figure 14 c). Cette variation intra-populationnelle des types fonctionnels a été interprétée comme un mécanisme de plasticité développé afin de faire face à des environnements hétérogènes (Hegazy et al. 2010a).



Figure 14 : Types fonctionnels d'*Ebenus pinnata* : a- Type éphémère ; b- Type modulaire ; c- Type permanent (Hegazy et al., 2010).

I.4.3. Caryologie d'*Ebenus pinnata*

Deux cytotypes ont été signalés au Maroc pour *E. pinnata* dont un à $2n = 14$ (Molero et Montserrat-Marti 1986) et un autre à $2n = 18$ (Parra et al. 1999). En Algérie, un seul nombre ($2n = 2x = 14$) a été trouvé par Hamma et Gadoum (2016) et Hadawat et Madani (2022) pour les populations de la région de Béjaïa (Figure 15).

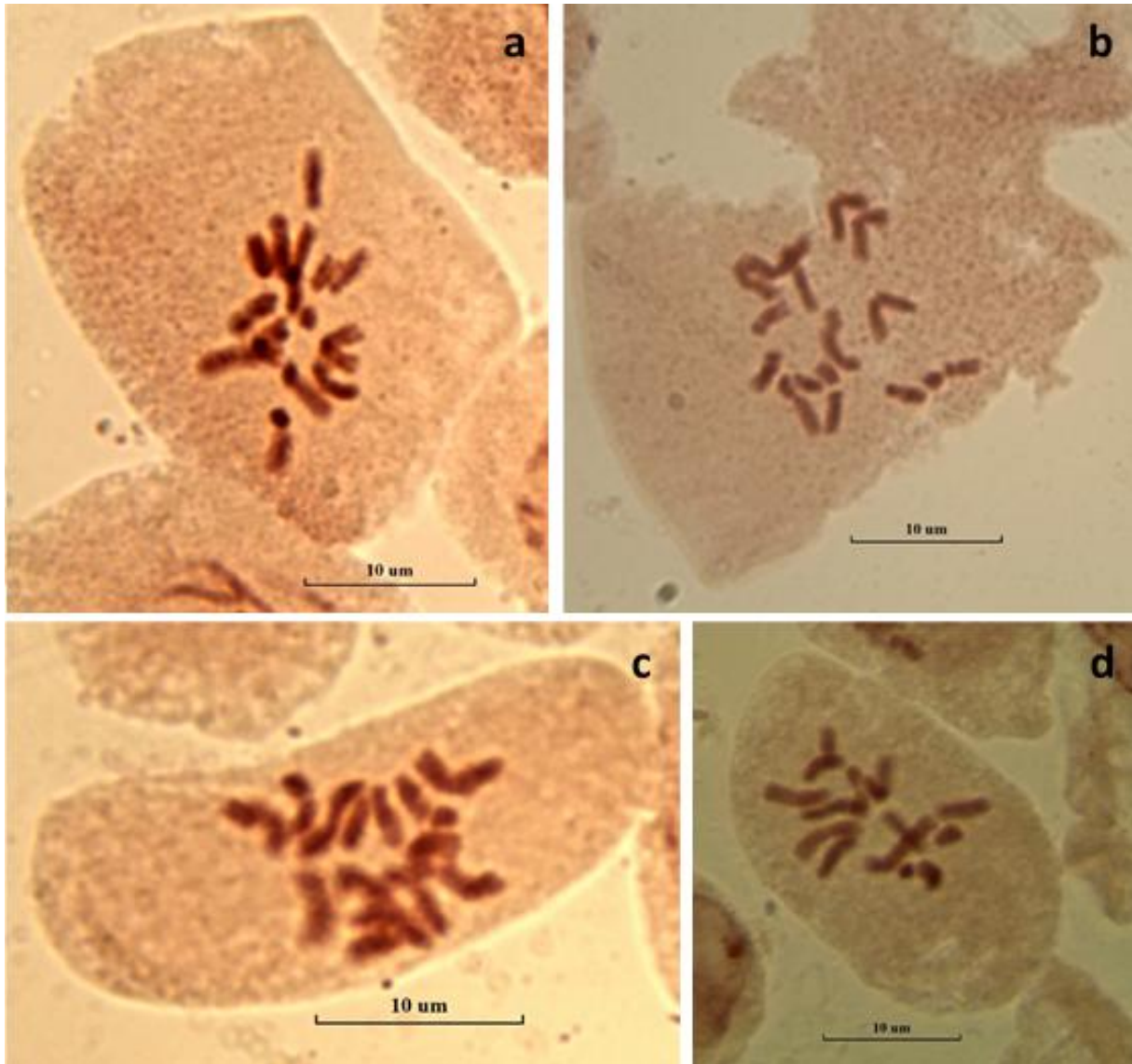


Figure 15 : Dénombrement chromosomique en mitose chez *Ebenus pinnata*. **a-b** : Population de Kherrata (fleur rose) ; **c**- Population de Kherrata (fleur blanche) ; **d**- Population de Afra (fleur rose). [GX100. La barre d'échelle correspond à 10 μm] (Hadawat et Madani, 2022).

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Distribution géographique

Pour réaliser la carte de distribution d'*E. pinnata*, nous avons eu recours aux fiches d'herbiers via le site <https://www.recolnat.org/fr/> consulté le 13 août 2018 (e-Recolnat, 2013). Nous avons téléchargé 454 spécimens numériques d'herbiers. Après avoir écarté les spécimens mal identifiés ou doubles, il restait un total de 433 herbiers. Les localités mentionnées sur les fiches d'herbiers et celles rapportées dans la littérature ont été repérées sur une carte à l'aide de Google Earth Pro 7.3.

II.2. Échantillonnage du matériel végétal

Trente-quatre populations du Nord-Est algérien ont été échantillonnées (Figure 16). Les caractéristiques et les points de repères de ces populations sont donnés dans le Tableau 2. La Figure 17 représente une population d'*Ebenus pinnata* à l'état naturel. L'échantillonnage a été réalisé durant les périodes de mai-août 2015 et mai-août 2016 (Tableau. 2). 10 à 30 individus matures frais par population (639 plantes au total), destinés à l'analyse multivariée, ont été récoltés avec racines, tiges, feuilles, fleurs et fruits. Les plantes ont été collectées de manière à couvrir toute la variabilité morphologique de la population, telle qu'exprimée par la hauteur des plantes et le nombre de tiges par plante. Les plantes ont été déterrées en creusant autour de leur base à l'aide d'un pic en fer (25 cm de long), puis en tirant soigneusement la plante hors du sol. Les plantes ont ensuite été regroupées, les racines recouvertes de papier humide, et la gerbe a été transportée dans un sac en plastique jusqu'au laboratoire. En outre, des fruits mûrs (graines) et des boutons floraux ont également été collectés. Les fruits mûrs (calices renfermant les gousses et les graines) ont été collectés dans des sacs en papier. Les boutons floraux à différents stades de développement ont été fixés *in situ* dans des tubes de 10 ml avec une solution de Carnoy II (6:3:1 éthanol absolu/ chloroforme/ acide acétique glacial), transportés à température ambiante et ensuite stockés à 3°C. En outre, les jeunes feuilles ont été collectées et conservées dans du gel de silice pour l'extraction d'ADN. Les pièces justificatives ont été déposées dans l'herbier de l'ENSA (École Nationale Supérieure Agronomique, Avenue Hassan Badi, El Harrach, Alger 16200, Algérie ; Correspondants: Salima Benhouhou, s.benhouhou@ensa.dz).

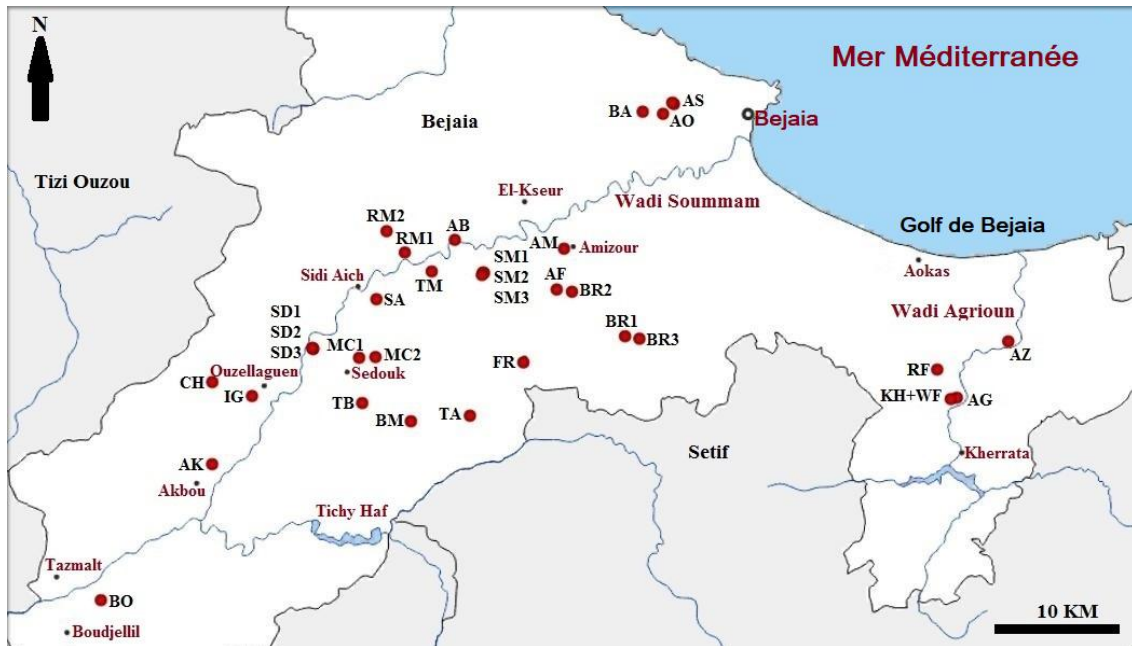


Figure 16: Localisation géographique des populations étudiées.



Figure 17 : *Ebenus pinnata* à l'état naturel, station de kherrata (codes KH et FB).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Tableau 2: Caractéristiques des populations, dates d'échantillonnage, tailles des échantillons et codifications. Dans la dernière colonne, SA : Semi-aride, SH : Subhumide. H : Humide.

N°	Nom de population	Code de la population	Nombre de plantes	Date d'échantillonnage	Codes des Plantes	Localisation GPS	Altitude/ Exposition	Sol	Formation végétale	Précipitation ¹
1	Semaoun 1	SM1	25	20/05/2015 09/06/2015	SM101-SM115 SM116-SM125	36°37'32.85"N 4°49'14.72"E	168m Ouest	Argile rouge	Garrigue, Prairie	400-600 SA
2	Semaoun 2	SM2	10	09/06/2015	SM201- SM210	36°37'27.16"N 4°49'7.20"E	195m Ouest	Argile brune	Bord des routes	400-600 SA
3	Semaoun 3	SM3	20	20/05/2015 28/06/2016	SM301-SM310 SM311-SM320	36°37'34.25"N 4°49'10.99"E	159m Ouest	Argile brune	Garrigue	400-600 SA
4	Abadou	AB	21	15/07/2016	AB01-AB21	36°39'7.32"N 4°47'31.90"E	82m Plateau	Argile rouge	Champ non cultivé, Les oliviers	400-600 SA
5	Mcisna 1	MC1	20	24/05/2016 02/07/2016	MC101-MC111 MC112-MC120	36°33'36.50"N 4°42'56.15"E	708m Ouest	Argile jaune	Garrigue, arbres de pins	400-600S A
6	Mcisna 2	MC2	20	24/05/2016 02/07/2016	MC201-MC211 MC212-MC220	36°33'34.43"N 4°41'58.19"E	567m Sud Ouest	Argile blanche	Prairie, Les oliviers	400-600S A
7	Ighzer Amokrane	IG	10	03/06/2015 02/07/2015	IG01-IG07 IG08-IG10	36°31'47.23"N 4°35'38.5"E	239m Est	Argile rouge	Bord des routes	400-600S A
8	Afra	AF	15	07/07/2015	AF01-AF15	36°36'44.94"N 4°53'29.80"E	352m Sud Est	Schistes	Champ cultivé, Les oliviers	600-800 SH
9	Aïn Skhoune	AS	20	09/05/2015 30/05/2015	AS01-AS13 AS14-AS20	36°45'32"N 5°00'20"E 36°45'28"N 5°00'26"E	150- 180m Sud- Ouest	Schistes	Garrigue	600-800 SH
10	Amizour	AM	21	23/06/2015	AM01-AM21	4°53'55.95"E	119m Sud-Est	Schistes	Garrigue, Les oliviers	600-800 SH
11	Ath Ousalah	AO	20	06/05/2015 30/05/2015	AO01-AO12 AO13-AO20	36°44'59.93"N 4°59'47"E	172m Sud	Schistes	Garrigue	600-800 SH
12	Barbacha 1 (Tiazibine)	BR1	10	30/06/2015	BR101-BR110	36°34'24.60"N 4°58'17.72"E	789m North Ouest	Schistes	Bord des chemins, haute herbe	600-800 SH
13	Barbacha 2 (Berri)	BR2	15	30/06/2015	BR201-BR215	36°36'38.34"N 4°54'23.28"E	354m Ouest	Schistes	Bord des routes	600-800 SH

Chapitre II : Matériel et méthodes

14	Barbacha 3	BR3	15	30/06/2015	BR301-BR315	36°34'31.73"N 4°57'27.52"E	812m Plateau	Schistes	Bord des routes	600-800 SH
15	Beni Maouche	BM	20	25/06/2015	BM01-BM20	36°30'36.21"N 4°45'1.18"E	1000m Est	Schistes	Prairie rocheuse	400-600 SA
16	Boudjellil	BO	27	13/05/2015 07/06/2015	BO01-BO13 BO14-BO27	36°22'11"N 4°26'48.30"E	270m Est	Terre blanche	Prairie, Garrigue clairsemée	300-400 SA<
17	Cherfa	CH	17	03/06/2015	CH01-CH17	36°32'27.23"N 4°33'26"E	785m Sud-Est	Argile blanche	Nouveau bord des routes (Chênes verts)	400-600 SA
18	Feraoun	FR	15	07/07/2015	FR01-FR15	36°33'19.75"N 4°51'32.50"E	710m Sud	Argile jaune	Bord des routes	600-800 SH
19	Bouassa	BA	17	06/06/2015	OG01-OG17	36°45'04.90"N 4°58'35.02"E	357m Est	Schistes	Garrigue	600-800 SH
20	Rmila 1	RM1	24	21/06/2016	RM101-RM124	36°38'32.09"N 4°44'35.93"E	106m Sud-Est	Argile jaune	Bord des routes, Prairie, Eucalyptus	400-600 SA
21	Rmila 2	RM2	15	21/06/2016	RM201-RM215	36°39'31.91"N 4°43'32.95"E	247m Sud-Ouest	Argile jaune	Bord des routes, Prairie, Les oliviers	400-600 SA
22	Takeriet1	TK1	20	20/06/2015	SD101-SD120	36°34'03"N 4°39'09.60"E	155m Est	Argile rouge	Prairie claire	400-600 SA
23	Takeriet2	TK2	11	20/06/2015	SD201-SD211	36°34'00.65"N 4°39'12.43"E	151m Sud-Ouest	Argile bleu	Prairie riche , Les oliviers	400-600 SA
24	Takeriet3	TK3	11	20/06/2015	SD301-SD311	36°34'00"N 4°39'13"E	152m Sud-Ouest	Argile bleu	Prairie dense , Les oliviers	400-600 SA
25	Sidi Ayad	SA	20	05/07/2015	SA01-SA20	36°36'19.38"N 4°42'58.70"E	520m Ouest	Argile bleu	Forêt de pins	600-800 SH
26	Akbou	AK	27	13/05/2015 03/06/2015	AK01-AK16 AK17-AK27	36°28'35"N 4°33'19"E	213m Est	Argile rouge	Les oliviers, Prairie claire	400-600 SA
27	Thibouamouchine	TB	20	27/06/2015	TB01-TB20	36°31'27.05"N 4°42'7.76"E	485m Ouest	Argile jaune	Prairie, pins	400-600 SA
28	Thimezrith	TM	27	09/06/2015	TM01-TM27	36°37'37.82"N 4°46'10.73"E	176m Ouest	Argile brune	Prairie, Les oliviers	400-600 SA
29	Tizi Adjissa	TA	19	20/07/2016	TA01-TA19	36°30'50.73"N 4°48'25.32"E	716m Est	?	Garrigue	400-600 SA

Chapitre II : Matériel et méthodes

30	Riff	RF	16	12/06/2016	RF01-RF16	36°32'51.75"N 5°15'43.58"E	238m Est	Red sandysoil	Bord des routes	800-1000 H
31	Amtik Ouzeboch	AZ	20	11/05/2015 0/05/2015	AZ01-AZ13 AZ14-AZ20	36°34'9.38"N 5°19'54.99"E	155m Sud-Est	Argile jaune	Bord des routes	800-1000 H
32	Aguelmim	AG	20	08/06/2015	AG01-AG20	36°31'28.51"N 5°16'25.19"E	612m Est	Argile rouge	Bord des routes	800-1000 H
33	Kherrata (Fleur pourpre)	KH	24	03/06/2015 15/07/2015	KH01-KH15 KH16-KH24	36°31'33.30"N 5°16'49.73"E	403m Est	Sol sablonneux rouge	Garrigue	800-1000 H
34	Kherrata (Fleur blanche)	FB	27	08/05/2015 01/06/2015 20/06/2016	FB01-FB15 FB16-FB20 FB21-FB27	36°31'33.30"N 5°16'49.73"E	403m Est	Sol sablonneux rouge	Garrigue	800-1000 H

¹Mebarki (2005).

II.3. Analyse morphologique

Les 639 plantes fraîches ont été étudiées pour 58 caractères morphologiques (Tableau 3) couvrant les racines, les tiges, les feuilles, les inflorescences et les fleurs fraîches, ainsi que les gousses et les graines matures. Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un ruban gradué (hauteur de la tige), d'un pied à coulisse (diamètre de la tige), d'une règle (entre-nœuds, feuilles, inflorescences...), de papier millimétré (petits éléments tels que les poils, les pièces florales, les gousses et les graines). Une loupe binoculaire a été utilisée pour les mesures et les observations des caractères minuscules.

Les 433 spécimens numériques d'herbiers ont également été étudiés pour 15 traits morphologiques (Tableau 4).

II.4. Analyse multivariée

La matrice de données (639 individus x 58 traits morphologiques), après avoir écarté les caractères invariables, a été traitée par l'analyse des coordonnées principales (PCoA) telle qu'implémentée sur MVSP 3.1 (Kovach, 2007) en utilisant le coefficient de similarité général de Gower. Pour chaque population, les valeurs moyennes des coordonnées PCoA ont été calculées ; après normalisation, elles ont été utilisées pour effectuer une analyse en grappes UPGMA basée sur une matrice de distance euclidienne. De même, une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée sur tous les caractères quantitatifs, en utilisant la matrice de corrélation de Pearson, après élimination des caractères invariants, transformation de Cox-Box pour adaptation des variables à la normalité, et en s'assurant qu'aucune variable n'est fortement corrélée ($R > 0,9$). Une analyse factorielle des correspondances (AFC) a été utilisée pour traiter les caractères qualitatifs. Les valeurs moyennes des caractères des groupes taxonomiques ont été comparées à l'aide d'une Anova, suivie d'un test de différence hautement significative (HSD) à N inégaux. La transformation de Cox-Box a été effectuée en utilisant la version en ligne de Box-Cox Normality Plot v1.1.12 (Wessa, 2016). Le calcul des corrélations, l'ACP, l'AFC, l'UPGMA, l'Anova, le test HSD, les nuages de points et les dendrogrammes ont été réalisés à l'aide de Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Tableau 3 : Caractères morphologiques utilisés dans l'étude/ C : Continu ; D : Discret (dénombrement) ; O : Ordinal ; B : Binaire.

N°	Codes	Caractères morphologiques	Types	Unités/ Catégories
01	DB	Diamètre à la base de la plante	C	cm
02	LT	Longueur de la plus longue tige	C	cm
03	NT	Nombre de tiges	D	tiges
04	DT	Diamètre de la plus grande tige	C	mm
05	LIN	Longueur du 3eme entre nœud	C	cm
06	NI	Nombre d'inflorescences	D	Inflorescences
07	DP	Densité des poils sur les tiges	O	1 : Présent 2 : Abondant 3 : Très abondant
08	LS	Longueur des stipules	C	mm
09	IS	Largeur des stipules	C	mm
10	CS	Couleur des stipules	B	1 : Pourpre 2 : Vert
11	LF	Longueur de la feuille sur le 3eme nœud	C	cm
12	IF	Largeur de la feuille le 3eme nœud	C	cm
13	PP	Pilosité du pétiole	O	0 : Absent 1 : Présent 2 : Abondant
14	PR	Pilosité du rachis	O	0 : Absent 1 : Présent 2 : Abondant
15	PNR	Pilosité des nervures de la foliole	O	0 : Absent 1 : Présent 2 : Abondant
16	PLF	pilosité du limbe de la foliole	O	1 : Présent 2 : Abondant
17	LP	Longueur du pétiole	C	cm
18	NPF	Nombre de pair de folioles (3eme nœud)	D	Paires
19	NPM1	Nombre de pair de folioles minimal	D	Paires

Chapitre II : Matériel et méthodes

20	NPM2	Nombre de pair de folioles maximal	D	Paires
21	LFO	Longueur du limbe de la foliole	C	cm
22	IFO	Largeur du limbe de la foliole	C	mm
23	LPI	Longueur du pédoncule de l'inflorescence sur le 3eme nœud	C	cm
24	PPI	Pilosité des pédoncules de l'inflorescence	O	0 : Absent 1 : Présent 2 : Abondant
25	LI	Longueur de l'inflorescence	C	cm
26	II	Largeur de l'inflorescence	C	cm
27	NFM1	Nombre minimal de fleurs	D	Fleurs
28	NFM2	Nombre maximal de fleurs	D	Fleurs
29	LB	Longueur de la bractée	C	mm
30	IB	Largeur de la bractée	C	mm
31	CB	Couleur de la bractée	B	1 : Pourpre 2 : Vert
32	LC1	Longueur du calice	C	mm
33	CC1	Couleur du calice	B	1 : Pourpre 2 : Vert
34	PC1	Pilosité du calice	B	1 : Present 2 : Abundant
35	LC2	longueur de la corole	C	mm
36	CC2	Couleur de la corole	B	1 : Rose 2 : Blanche
37	OC	Ouverture de la carène	B	1 : Indéhiscent 2 : Déhiscent
38	LTA	Longueur totale de l'aile	C	mm
39	LLA	Longueur du limbe de l'aile	C	mm
40	LLB	Largeur à la base de l'aile	C	mm
41	LLC	Largeur au centre de l'aile	C	mm
42	HPC	Hauteur de la partie large de la carène	C	mm
43	PLC	Longueur de la partie large de la crène	C	mm
44	LTC1	Longueur totale de la carène	C	mm

Chapitre II : Matériel et méthodes

45	EC	Engel de la carène	C	Degrés
46	FE	Forme de l'étendard	B	1 : obovale 2 : elliptique
47	LTE	Longueur totale de l'étendard	C	mm
48	LLE	Longueur du limbe de l'étendard	C	mm
49	ILE	Plus grande largeur du limbe de l'étendard	C	mm
50	LPE	Longueur de la pétiollule de l'étendard	C	mm
51	LCM	Longueur du calice à maturité	C	mm
52	LTC	Longueur du tube du calice	C	mm
53	LPC	Longueur des poils à la base des dents du calice	C	mm
54	LGM	Longueur de la gousse	C	mm
55	IGM	Largeur de la gousse	C	mm
56	LG	Longueur de la graine	C	mm
57	IG	Largeur de la graine	C	mm
58	LR	Longueur de la radicule	C	mm
Variables transformées (non incluses dans les analyses multivariées)				
59	RCC	Rapport LGM/LTC	C	
60	RPC	Rapport LS/LGM	C	
61	RSP	Rapport LR/LS	C	
62	RRS	Rapport LGM/LTC	C	
Autres variables (non incluses dans les analyses multivariées)				
63	P	Diamètre polaire des grains de pollen	C	µm
64	E	Diamètre équatorial des grains de pollen	C	µm
65	P/E	Rapport des diamètres P et E des grains de pollen	C	
66	TGG	Taux de germination des graines	C	%

Les caractères pouvant prêter à ambiguïté sont représentés dans la Figure 18.

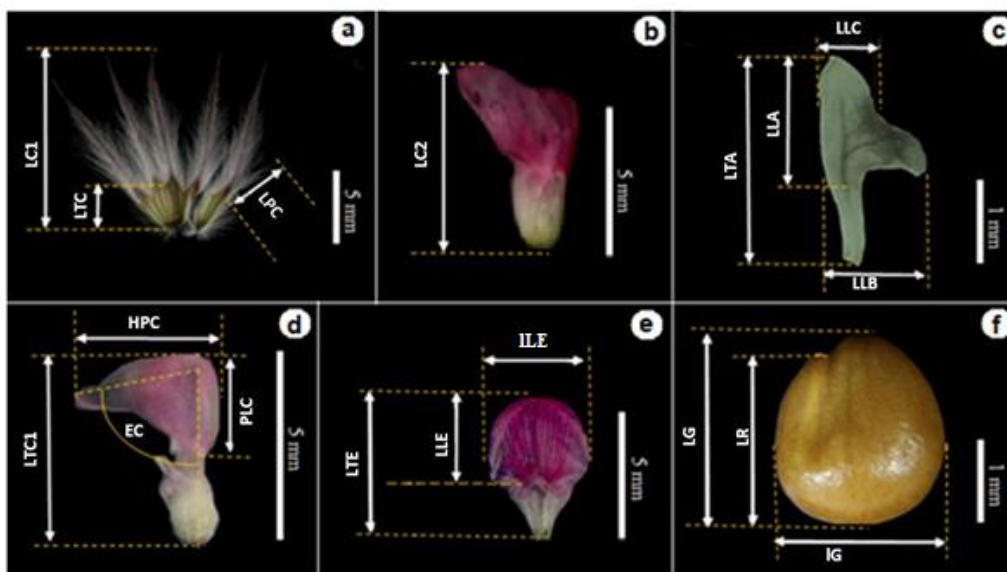


Figure 18 : Précision des caractères des parties florales et des graines d'*Ebenus pinnata*. LC1 : Longueur du calice, LTC : Longueur du tube du calice, LPC : Longueur des poils à la base des dents du calice, LC2 : longueur de la corolle, LTA : Longueur totale de l'aile, LLA : Longueur du limbe de l'aile, LLC : Largeur au centre de l'aile, LLB : Largeur à la base de l'aile, LTC1 : Longueur totale de la carène, PLC : Longueur de la partie large de la crène, HPC : Hauteur de la partie large de la carène, EC : Engrel de la carène, LTE : Longueur totale de l'étendard, LLE : Longueur du limbe de l'étendard, ILE : Plus grande largeur du limbe de l'étendard, LG : Longueur de la graine, LR : Longueur de la radicule, IG : Largeur de la graine

En outre, la matrice de données des herbiers (433 spécimens d'herbiers x 15 caractères morphologiques, Tableau 4) a été traitée par PCoA. Une matrice de données similaire de matériel frais (639 plantes fraîches x 15 caractères) a également été traitée pour comparaison avec les données d'herbiers.

Tableau 4 : Caractères morphologiques utilisés dans l'étude morphométrique des herbiers.

N°	Codes	Caractères morphologiques	Unités/ Catégories
1	DB	Diamètre de la base	mm
2	LTP	Longueur totale de la plante	cm
3	DBT	Diamètre à la base de la tige	mm
4	LEN	Longueur de l'entre-nœud	cm
5	PT	Pilosité de la tige	0: Absent 1: Présent 2: Abondant
6	LTF	Longueur totale de la feuille, foliole apicale non comprise	cm
7	LP	Longueur du pétiole	cm

8	NMF	Nombre maximal de paires de folioles	Paires
9	LF	Longueur de la foliole	cm
10	IF	Largeur de la foliole	cm
11	LPI	Longueur du pédoncule de l'inflorescence	cm
12	PPI	Pilosité du pédoncule de l'inflorescence	0 : Absent 1 : Présent 2 : Abondant
13	DPI	Diamètre du pédoncule de l'inflorescence	mm
14	LI	Longueur de la plus grande inflorescence	cm
15	DI	Diamètre à la base de la plus grande inflorescence	cm

II.5. Mesures des grains de pollen

Les axes polaire (P) et équatorial (E) des grains de pollen ont été mesurés pour 15 populations sélectionnées parmi les principaux groupes taxonomiques générés par les analyses multivariées (groupe C1, groupe C2 et groupe C3). Ces populations sont : FB (n = 40), AZ (n = 35) et AG (n = 64) pour le groupe C1 ; AK (n = 30), BO (n = 41), TB (n = 43) et AB (n = 40) pour le groupe C2 ; AO (n = 34), BR2 (n = 33), KH (n = 54), SM1 (n = 40), SM3 (n = 37), TK1 (n = 44), TK2 (n = 43) et RM2 (n = 45) pour le groupe C3 (voir le Tableau 2 pour les codes des populations). Les grains de pollen ont été prélevés sur les fleurs d'au moins trois individus différents de chaque population. Les grains de pollen ont été colorés avec de l'orcéine lactopropionique et mesurés sous le microscope optique Optica B-353A.

II.6. Cultures expérimentales

Des tests de germination ont été réalisés sur des graines matures collectées entre fin juin et juillet 2014 à partir de dix populations représentant les principaux groupes taxonomiques révélés par les analyses multivariées : FB, AG et AZ (groupe C1) ; BO, MC1, AK (groupe C2) ; SM1, KH, IG, AO, AS, RM1 (groupe C3) (voir Tableau 2 pour les codes des populations). 100 graines de chaque population ont été étalées dans une boîte de Pétri de 10 cm de diamètre, sur du papier filtre humidifié avec de l'eau distillée, sans scarification préalable ni autre traitement. Après trois jours à l'obscurité et à température ambiante (environ 20 °C), le nombre de germinations a été compté et les taux de germination ont été calculés pour chaque population. Vingt plantules de 1 cm de long provenant de chaque boîte de Pétri ont été transplantées dans un sol fertile dans des pots de 20 cm de diamètre et régulièrement arrosées. Les plantules restantes ont été fixées pour les observations

chromosomiques. Pour évaluer l'évolution du pouvoir germinatif, des graines récoltées sur les populations FB, AS et MC3 en 2014 ont été utilisées pour comparer les taux de germination entre 2015 et 2021. Les expériences ont été réalisées dans des boîtes de Pétri comme décrit plus haut.

Le comportement des germinations a également été étudié dans des conditions naturelles pour les populations suivantes : FB, KH, SM1, AO et TK2. La station de Kherrata (36°31'33.30 "N, 5°16'49.73 "E, orientation est, sol sableux rouge, station d'origine des populations FB et KH) a été utilisée pour ces expériences de terrain. Les semis ont été effectués dans des sillons de 5 cm de profondeur avec une distance de 50 cm les uns des autres. Les graines ont été semées à 20 cm d'intervalle, en recouvrant les graines libres d'une fine couche de terre (environ 0,5 cm) et sans recouvrir les graines enfermées dans le calice. Trois semis expérimentaux ont été effectués. Le premier a été lancé le 22 septembre 2017 dans un endroit à 10% de pente où 40 graines libres/population ont été semées. La deuxième et la troisième expériences ont été lancées respectivement le 13 décembre 2018 et le 7 avril 2018 sur des parcelles de 60% de pente où 25 graines libres et 25 fruits entiers (graines enfermées dans le calice) ont été semés séparément pour chaque population. Les cultures ont été régulièrement contrôlées, sans arrosage ni autre soin aux plantes.

II.7. Analyse cytogénétique

II.7.1. Choix du matériel végétal

Les populations impliquées dans l'analyse cytogénétique ont été sélectionnées de manière à représenter tous les principaux groupes taxonomiques générés par les analyses multivariées. Ces populations sont AG et FB pour le groupe C1 ; BM, BO, AK, TB et TA pour le groupe C2 ; SM1, SM2, SM3, AS, AM, AO, BA, KH pour le groupe C3 (voir Tableau 2 pour les codes des populations).

II.7.2. Préparations des solutions

II.7.2.1. Les solutions de prétraitement

Deux solutions de prétraitement ont été préparées à savoir :

- 8-Hydroxyquinoléine 0.002 M :

Elle se prépare en dissolvant par agitation 0.03 g de 8-hydroxyquinoléine dans 100 ml d'eau distillée (à conserver à l'abri de la lumière).

- Colchicine 0.5% (p/v):

Correspond à 0.5 g de colchicine dans 100 ml d'eau distillée.

II.7.2.2. Le fixateur

- Carnoy I composé de 3 volumes d'éthanol et d'1 volume d'acide acétique (Löve et Löve, 1975; Jahier et al., 1992).
- Carnoy II, qui est un mélange d'éthanol, chloroforme et d'acide acétique glacial (6:3:1).

Le fixateur assure un arrêt rapide des divisions cellulaires, sans léser ou détruire la structure chromosomique et une bonne conservation du matériel végétal par son rôle aseptisant (Jahier et al., 1992).

II.7.2.3. Le colorant

Le colorant utilisé est l'orcéine lactopropionique préparé selon Dyer (1963) modifié selon Löve et Löve (1975). Les étapes suivies sont :

- Dissolution de 2 g de la poudre d'orcéine dans un mélange de 23 ml d'acide propionique et 23 ml d'acide lactique.
- Ajustement avec de l'eau distillée jusqu'à 100 ml.
- Agitation de la préparation sur une plaque agitatrice.
- Filtration de la solution.

Les solutions préparées doivent être conservées dans des bouteilles fumées pour éviter leur dégradation éventuelle par la lumière.

II.7.2.4. Solutions d'hydrolyse (HCl 1N)

Pour préparer une solution d'HCl 1N, verser 90 ml d'HCl fumant (35 %, $d=1.17$) dans 910 ml d'eau distillée jusqu'à 1 L. **Remarque** : Attention, lors de ces préparations, pour éviter l'explosion, toujours verser l'eau distillée en premier puis ajouter la quantité d'HCl.

II.7.2.5. Bleu de coton

Le bleu de coton est préparé avec un mélange de :

- 8 volumes de glycérine,
- 4 volumes d'acide lactique à 85%,
- 4 volumes de solution de phénol (1g de cristaux de phénol + 4 ml d'eau distillée),
- 2 volumes d'eau distillée,
- 1 volume de bleu d'Aniline à 1% (0,05 ml + 100 ml d'eau distillée).

II.7.3. Etude des mitoses

Pour l'étude des chromosomes somatiques, des graines ont été mises à germer à l'obscurité à température ambiante (environ 20 °C) sur du papier filtre humide dans des boîtes de Pétri. Les extrémités des racines, d'une longueur de 1 cm, ont été excisées des graines en germination et prétraitées pendant la nuit dans de la 8-hydroxyquinoline (0,002M) pendant 3h 30mn à 20°C. Le prétraitement a été suivi d'une vibration vortex (40 Htz pendant 7mn) pour améliorer la séparation des chromosomes. Le matériel est ensuite fixé dans la solution de Carnoy I pour au moins 24h à 4°C. Les racines ont été hydrolysées dans du HCl 1N à 60°C pendant 10mn et colorées avec de l'orcéine lactopropionique. Enfin, les extrémités des racines ont été écrasées entre lame et lamelle. Les observations sont faites à l'aide du microscope optique Optica B-350A. Les nombres de plaques métaphasiques sur lesquels le nombre de chromosomes sont comptables ont été notés pour chaque population. Les meilleures plaques de métaphases ont été photographiées et les longueurs et largeurs des chromosomes ont été mesurées. Afin d'éliminer le biais des longueurs des chromosomes engendré par les différences dans le degré de contraction des ceux-ci, nous avons proposé de réajuster celles-ci en utilisant les valeurs moyennes des largeurs des chromosomes. Les rapports entre les largeurs moyennes des chromosomes pour les différents caryotypes ont été calculés pour les utiliser à réajuster les longueurs des chromosomes en utilisant le caryotype le plus contracté (chromosomes plus larges) comme référence.

II.7.4. Etude des méioses

Pour l'étude des chromosomes en haplophase, les anthères ont été récupérées à partir des boutons floraux fixés *in situ* (voir plus haut) et écrasées dans une goutte d'orcéine lactopropionique entre lame et lamelle et observées à l'aide du microscope optique Optica B-353A pour rechercher les cellules mères de pollen en cours de division. Les cellules en division ont été photographiées et les nombres de métaphases I et II sur lesquelles les chromosomes sont comptables ont été notés pour les populations étudiées.

II.7.5. Etude du pollen

La fertilité pollenique a été évaluée sur des grains de pollen colorés au bleu de coton (Mertens et Hammersmith 1998) observés entre lame et lamelle sous un microscope optique. Le taux de fertilité du pollen a été estimé en divisant le nombre de grains fertiles par le nombre total de grains observés par fleur. Les grains de pollen de couleur sombre et aux contours uniformes ont été comptés comme fertiles, tandis que les grains de couleur claire,

aux contours irréguliers et de taille relativement petite, ont été considérés comme stériles. 700-900 grains ont été comptés par fleur. La topographie des grains de pollen a été étudiée en utilisant des grains matures colorés à l'orcéine lactopropionique sous le microscope optique Optica B-353A.

En étudiant la morphologie des fleurs, il a été remarqué que la colonne staminale et les anthères ne sortent jamais de la carène transformée en loge fermée, ce qui suggère une cléistogamie. Afin de vérifier à quel stade de développement de la fleur se produit la germination du pollen, les grains de pollen sur le stigmate ont été observés à différents stades avant l'anthèse au microscope optique en utilisant la coloration au bleu de coton. Les populations étudiées pour la germination du pollen avant anthèse sont FB, AZ et AG pour le groupe C1 ; AB, AK, BO, TB et MC1 pour le groupe C2 ; KH, RF, AO, SM1, SM3, AF, BR2, BR3, TK1, TK3 et RM1 pour le groupe C3 (Voir Tableau 2 pour les codes des populations).

II.8. Phylogénie

II.8.1. Matériel utilisé pour l'analyse phylogénétique

Le matériel foliaire séché à la silice utilisé pour la présente analyse phylogénétique provient des populations suivantes : FB (groupe C1), BO (groupe C2) et SM1 (groupe C3). L'extraction de l'ADN n'a pas fonctionné sur le matériel foliaire séché à la silice pour BO et SM1, donc des plantules de 12 jours ont été utilisées à la place. L'extraction de l'ADN et le séquençage ont été réalisés au « Laboratory of Molecular Epigenetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Institute of Biophysics, Brno, Czech Republic ».

Outre les 10 séquences nouvellement obtenues dans le cadre de la présente étude, les séquences GenBank ITS1-5.8S-ITS2 ont également été incluses dans l'analyse phylogénétique (*E. pinnata* 1-4 : KY366152.1, AB854483.1, KP338141.1, KY366152.1 respectivement ; *E. armitagei* : AB854480.1 ; *E. barbiger* : AB854481.1 ; *E. cappadocica* : AB374182.1 ; *E. cretica* : GQ246067.1 ; *E. laguroides* : AB374183.1 ; *E. longipes* : GQ246071.1 ; *E. reesei* : GQ246070.1 ; *E. sibthorpii* : KP338142.1 ; *E. stellata* : AB329691.1 ; *Taverniera aegyptiaca* et *T. multinoda* comme outgroup : AB854516.1 et GQ246086.1 respectivement). Les séquences nouvellement obtenues sont en cours de dépôt dans la GenBank.

Les séquences de matK utilisées dans la Genbank sont les suivantes : *E. pinnata* : AB854571.1, KP338519.1 ; *E. armitagei* : AB854568.1 ; *E. barbiger* : AB854569.1,

LC085334.1 ; *E. boissieri* : LC085335.1 ; *E. cappadocica* : LC085336.1 ; *E. cretica* : JQ619960.1, AB854570.1, KP338518.1 ; *E. laguroides* : JQ669623.1 ; *E. longipes* : JQ619961.1 ; *E. sibthorpii* : KP338520.1 ; *E. stellata* : AB854572.1 ; *Taverniera aegyptiaca* et comme outgroup : AB854610.1 et JQ669585.1 respectivement)

II.8.2. Extraction et séquençage d'ADN

L'ADN foliaire a été isolé selon une méthode standard au bromure de cetyltriméthylammonium (CTAB) (Saghai-Marooof et al., 1984) après des modifications mineures décrites dans Fojtova et al. (1998). L'ADN final a été délué dans 200 µl de tampon Tris-EDTA.

Dans un mélange réactionnel de 25 µl, nous avons utilisé 0,1-1 ng d'ADN génomique comme matrice, 4 pmol de chaque amorce, 2,4 nmol de chaque dNTP et 0,4 unité d'ADN polymérase DyNAzyme II (Finnzymes, Espoo, Finlande) et 20 pmol de chaque amorce (Forwaed: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' ; Reverse : 5'-TCCTCCGCTTATTG-ATATGC-3'. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 180 s à 95°C, suivi de 28 cycles de 30 s à 95°C, 60 s à 52°C, et 120 s à 72 °C; puis une extension finale de 180 s à 72°C.

Ensuite, les produits PCR ont été vérifiés par électrophorèse dans des gels d'agarose 0.8%. Dans tous les échantillons, une bande unique d'environ 750 pb a été observée. Le fragment a été excisé, purifié par un kit (Nucleospin Gel et PCR, Macherey Nagel, Allemagne) et cloné dans le vecteur pDrive (Qiagen, Allemagne). Les clones positifs ont été criblés par une PCR de colonie utilisant les amorces du vecteur SP6/T7 selon les conditions décrites dans Kovarik et al. 2008. Les produits PCR purifiés (Nucleospin Gel et PCR, Macherey Nagel, Allemagne) ont été séquencés par la méthode de terminaison de chaîne didésoxy au BioTEch Vienna, Autriche. Pour l'analyse en aval, les séquences ont été coupées pour éliminer les séquences de vecteur et les nucléotides non ambigus.

II.8.3. Analyse phylogénétique

Les séquences ont été assemblées et éditées manuellement à l'aide de la fenêtre du logiciel Wisconsin GCG (version 10.3. Accelrys Inc., San Diego, CA, USA). Les alignements ont été réalisés à l'aide du PILE UP (mis en œuvre dans le GCG) ou du CLUSTAL W du serveur de l'Institut européen de bioinformatique (EMBL-EBI).

L'alignement multiple de séquences (MSA) a été réalisé à l'aide du service en ligne MAFFT v7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato et al., 2019) avec un paramètre

par défaut. L'alignement a été visualisé et examiné à l'aide d'Aliview version 1.27 (Larsson, 2014). GTR+I était le meilleur modèle sélectionné par Jmodeltest 2.1.10 (Posada, 2008).

Toutes les inférences d'arbres ont été exécutées à l'aide de la passerelle scientifique du CIPRES (<http://www.phylo.org/> ; Miller et al., 2010). L'estimation du maximum de vraisemblance (ML) a été réalisée à l'aide de RAxML version 8.2.9 (Stamatakis, 2014) en effectuant 20 recherches avec le modèle GTR avec modèle de substitution à taux invgamma et a évalué le support de branche à l'aide de la fonction bootstrap implémentée dans RAxML (Pattengale et al., 2010). L'analyse bayésienne a été réalisée à l'aide de MrBayes V3.2 (Ronquist et al., 2012) avec 20 millions de générations de Monte Carlo par chaîne de Markov (MCMC). Quatre chaînes distinctes ont été exécutées, les arbres et les valeurs des paramètres étant sauvegardés toutes les 2000e générations dans deux exécutions parallèles. Nous avons écarté les premiers 25 % de la MCMC pour les annuler et les arbres restants ont été utilisés pour construire un arbre de consensus avec des valeurs de probabilité postérieure (PP). La visualisation de l'arbre et l'enracinement au point central ont été effectués à l'aide de FigTree version 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). La matrice de distance entre les séquences a été calculée sur l'alignement Clustalx V2.1 (Larkin et al., 2014) à l'aide du logiciel Mega 5.0 (Tamura et al., 2011) avec suppression complète des lacunes.

II.9. Analyse phytochimique

II.9.1. Préparation de l'extrait végétal

Le matériel végétal séché et finement moulu (5 g pour chaque essai) a été extrait avec 100 ml d'éthanol absolu pendant 6 heures, ou jusqu'à ce que l'extrait ne soit plus coloré, à l'aide d'un Soxhlet. L'extrait liquide final a été filtré et évaporé sous vide à 40 °C jusqu'à siccité complète, à l'aide d'un rotavapor. Le rendement de l'extraction a été calculé avec l'équation suivante :

$$\text{Rendement d'extraction(\%)} = \frac{\text{masse de l'extrait(g)}}{\text{masse du materiel végétal sec(g)}} \times 100$$

II.10. Détermination de l'activité antioxydante

II.10.1. Teneur phénolique totale

La teneur phénolique totale des extraits de plantes a été mesurée par le test de Folin-Ciocalteu rGAEent, en utilisant la méthode décrite par Singleton et al (De Abreu et Mazzafera, 2005) avec quelques modifications. Une solution diluée de chaque extrait (200 μ L) a été mélangée à 750 μ L de rGAEent de Folin-Ciocalteu (préalablement dilué avec de l'eau 1:10 v/v). Ce mélange a été maintenu à température ambiante pendant 5 minutes, après quoi 400 μ L de solution de carbonate de sodium (75 g/L dans l'eau) ont été ajoutés. Le mélange a été laissé pendant 1 heure à température ambiante. L'absorption a été mesurée à 765 nm par rapport à un blanc d'eau. La teneur totale en phénols des extraits a été calculée à l'aide de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique standard. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique (GAE)/g d'extrait sec.

II.10.2. Essai de piégeage des radicaux libres DPPH

L'activité de piégeage des radicaux libres a été déterminée à l'aide de la méthode du radical libre 2, 2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) (Al-Huqail et al., 2020) avec quelques modifications. 25 μ L de chaque extrait ont été ajoutés à 975 μ L d'une solution méthanolique de DPPH de 100 μ M. Le mélange a été agité et laissé dans l'obscurité à température ambiante. Après 30 minutes, l'absorbance a été enregistrée à 517 nm et comparée à l'absorbance d'un échantillon vierge contenant 25 μ L de méthanol et la même quantité de solution de DPPH. Une courbe d'étalonnage standard a été obtenue en utilisant différentes concentrations d'acide gallique. L'activité antioxydante a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE)/g d'extrait sec.

II.10.3. Dosage du pouvoir réducteur

La méthode est basée sur les procédures d'Oyaizu (1986) avec des modifications. 0,125 ml de chaque échantillon d'extrait a été mélangé à 2,5 ml de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et à 2,5 ml de ferricyanure de potassium [K₃Fe (CN)₆] (1 %). Le mélange a été incubé au bain-marie à 50°C pendant 10 minutes, puis 2,5 ml d'acide trichloracétique (10 %) ont été ajoutés, avant d'être centrifugés à 1500 tours/minute pendant 10 minutes. Enfin, 2,5 ml de la solution de la couche supérieure ont été mélangés avec de l'eau distillée (2,5 ml) et du FeCl₃ (0,5 ml, 0,1 %). L'absorbance a été enregistrée à 700 nm. Le pouvoir réducteur a été exprimé en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE)/g d'extrait sec.

II.11. Criblage de l'activité antibactérienne

II.11.1. Souches bactériennes

Le test d'activité antibactérienne des extraits d'*E. pinnata* a porté sur six bactéries pathogènes d'origine alimentaire fournies par l'Institut Pasteur (Alger, Algérie) et identifiées par le numéro ATCC (American Type Culture Collection). Les bactéries Gram-négatives : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Vibrio cholerae* ATCC 14035, *Salmonella typhi* ATCC 14028 et les bactéries Gram-positives : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *S. aureus* résistant à la méthicilline ATCC 43300 (MRSA). Toutes les souches ont été cultivées dans une gélose nutritive (NA) et incubées à 37°C pendant 18-24 h jusqu'à ce que la phase de croissance stationnaire soit atteinte.

II.11.2. Test antibactérien

L'activité antibactérienne a été réalisée à l'aide de la méthode de diffusion en gélose conformément au National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1993). Des inoculums contenant 10⁶ UFC/mL de chaque culture bactérienne à tester ont été répartis uniformément sur la surface des plaques d'agar Mueller Hinton à l'aide d'écouvillons stériles. Ensuite, des puits de 6 mm de diamètre ont été creusés dans le milieu gélosé et remplis de 40 µL (5 mg/mL) d'extrait végétal dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et laissés à diffuser à température ambiante pendant 2 h. Les plaques ont ensuite été incubées en position verticale à 37°C pendant 24 h. Les puits contenant le même volume de DMSO ont servi de contrôle négatif. Après incubation, les diamètres (mm) des zones d'inhibition de la croissance ont été mesurés. Tous les tests ont été répétés trois fois.

Chapitre III : Résultats

III. Résultats

III.1. Distribution géographique et écologie

Ebenus pinnata est présent dans toute l'Afrique du Nord, du Maroc jusqu'à la Libye où il est peu abondant (absent en Égypte) (Figure 19). Il se répartit du bord de mer méditerranéen jusqu'à la limite sud de l'Atlas saharien, du niveau de la mer jusqu'à 1500 m d'altitude, sur toutes les expositions sauf le nord. D'après les relevés d'herbiers (Figure 19), il est absent des zones de forêts de chêne-liège (*Quercus suber* L.), des Hauts Plateaux et du Sahara, sauf à Ouargla où il a été mentionné dans un fourré de *Pinus halepensis*. Il se rencontre sur différents sols argileux, calcaires, schisteux et sablonneux (Tableau 2), dans les champs non cultivés, les berges des rivières et des routes, les clairières des forêts et des garrigues. Il ne semble pas supporter le gel.

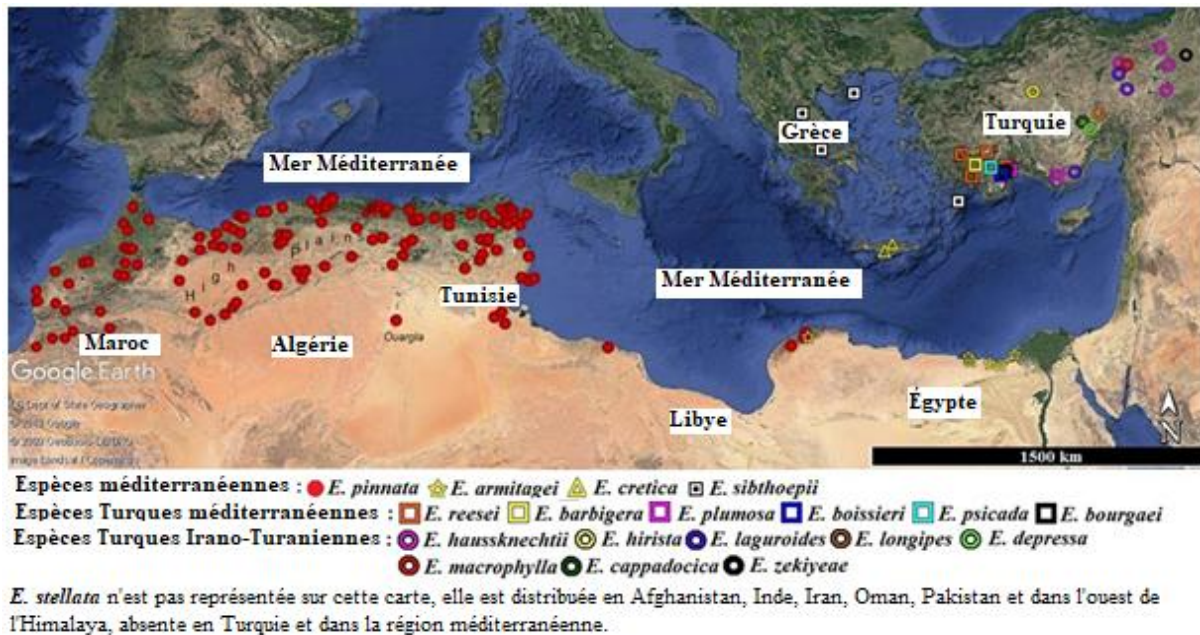


Figure 19: Répartition géographique d'*Ebenus pinnata* Ait. et des autres espèces du genre *Ebenus*. (Pampanini, 1930; Hegazy et al., 2010; Hegazy et Eesa, 1991; e-Recolnat, 2013; MNHN, 2018; Miara, 2016; Madoui et al, 2006; Gandoger, 1908; Debeaux, 1894; Cosson, 1857; Mukassabi et al., 2012; Bekdouche et al., 2011; Chermat et al., 2012; Bayrakdar et al., 2010; Aytaç et Yildirim, 2017; Azcan et al., 2001; Hayta et al., 2014 et Sibthorp, 1833).

III.2. Traitement multivarié des données morphométriques

L'analyse des coordonnées principales (PCoA) de la matrice des données morphométriques (639 individus x 58 caractères) a donné les résultats illustrés dans la Figure 20A. Six groupes significativement discriminés peuvent être reconnus : C1 avec trois sous-groupes (C11, C12, C13), C2 sans sous-groupe majeur, et C3 avec deux sous-groupes (C31 et C32). Les individus d'une même population se projettent ensemble à quelques exceptions près (Figure 20B), ce qui suggère une faible migration inter-population. Le groupe C2 est bien séparé sur l'axe 1 de la PCoA (représentant 14,81% de la variance totale) (Figure 20A) principalement en raison des caractères HPC, PLC, LTC1, LTE, ILE, LGM, LR (Tableau 5) pour lesquels il a les valeurs les plus élevées. Le groupe C32 est intermédiaire entre C2 et le reste des groupes pour la plupart de ces caractères (Tableau 5). Sur l'axe 2 de la PCoA (représentant 12,24% de la variance totale) (Figure 20A), les groupes C11, C12 et C13 se sont séparés les uns des autres et des autres groupes principalement en raison des caractères qualitatifs DP, CS, PR, PPI, CB, CC1, CC2 et également pour le caractère quantitatif LTA (Longueur totale de l'aile) (Tableau 5). Aucune nouvelle discrimination n'a été révélée sur d'autres axes du PCoA (non montré). Il est intéressant de noter qu'il existe une corrélation entre les étages climatiques et la distribution taxonomique : C1 est associé à l'étage humide, C2 au semi-aride et C3 au sub-humide (Figure 21 et Tableau 2).

La Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) basée sur les valeurs moyennes des coordonnées des individus de chaque population par rapport à l'axe 1 et l'axe 2 de la PCoA (Figure 20A) a donné le dendrogramme Figure 21. On y voit bien la répartition en trois groupes C1, C2 et C3 avec leurs sous-groupes. Ces trois groupes sont parfaitement corrélés avec les étages climatiques comme le montre la Figure 21.

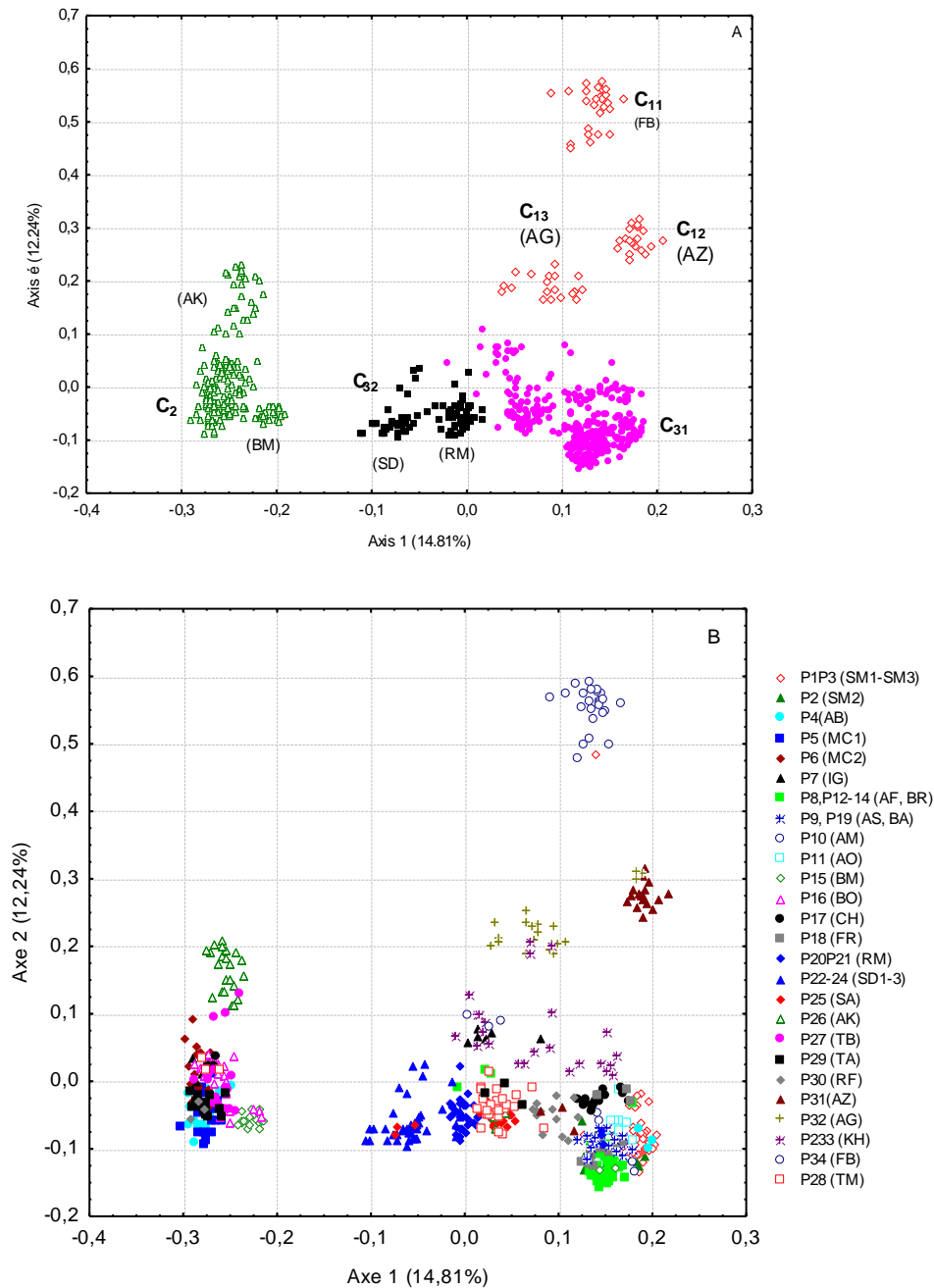


Figure 20 : Nuage de points PCoA de 639 plantes d'*Ebenus pinnata* basé sur 52 caractères morphologiques. A : Les principaux groupes et sous-groupes discriminés (C11, C12, C13 ; C2 ; C31 C32). B : Relations entre les populations (chaque symbole coloré correspond à la population Pi) avec une tendance des individus d'une même population à se regrouper, sauf dans certains cas. Les codes des populations sont indiqués entre parenthèses. Voir les figures 5-6 pour la comparaison et le tableau 1 pour la signification des codes de population. Les valeurs moyennes des coordonnées par rapport aux axes 1 et 2 sont significativement différentes pour tous les groupes et sous-groupes (HSD à N inégaux, P=0,05).

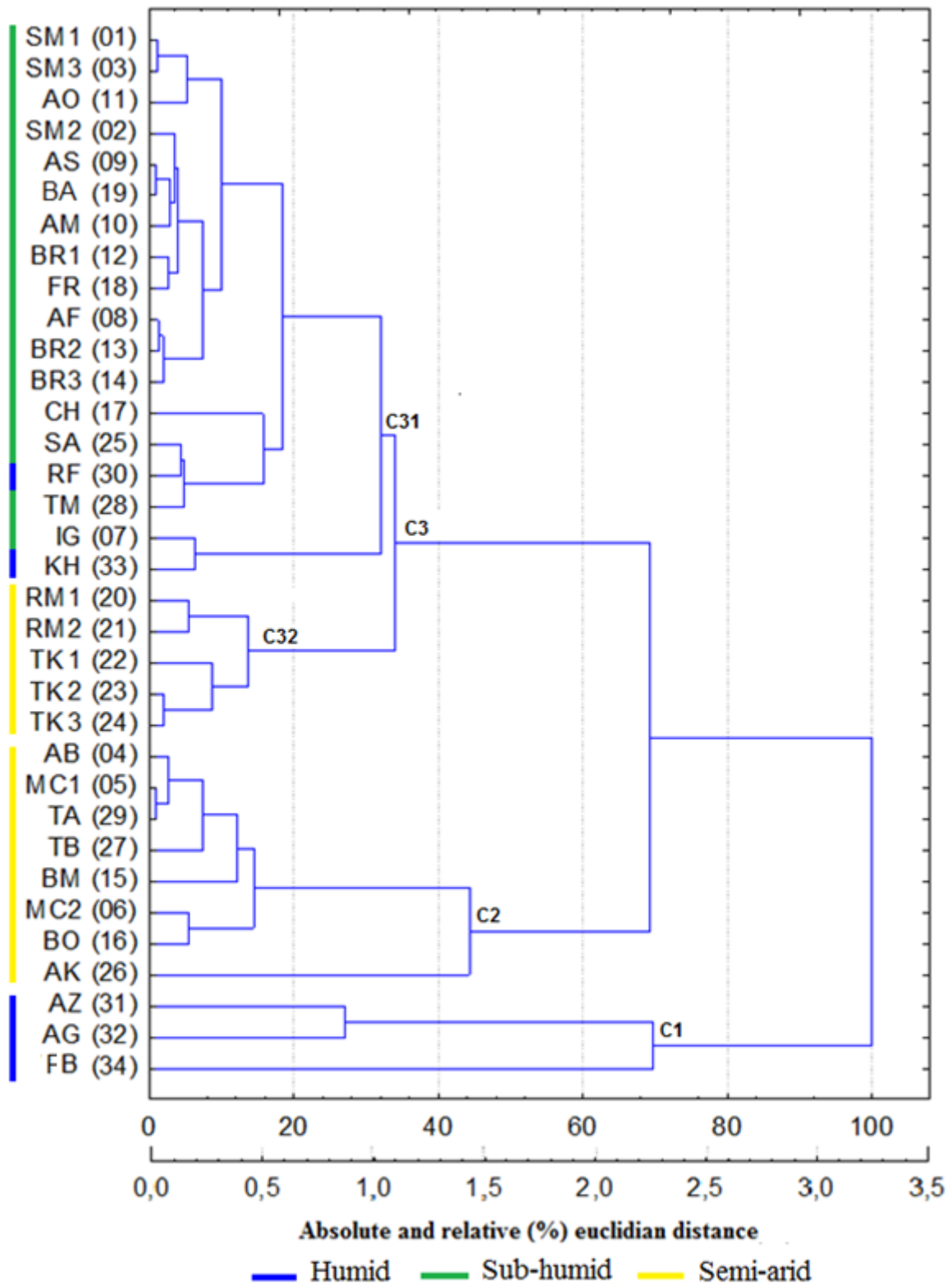


Figure 21: Dendrogramme UPGMA montrant les relations entre les 34 populations. Trois groupes principaux peuvent être reconnus (C1, C2 et C3), avec plus ou moins de sous-groupes. Voir le Tableau 2 pour les codes des populations et la Figure 20 pour la comparaison.

L'analyse en composantes principales (ACP) des caractères quantitatifs a montré un continuum parfait sur l'axe 1 (représentant 20,55% de la variance totale) qui est expliqué essentiellement par les caractères LT, DT, LIN, NI, LS, IS, LF, IF, LP et NFM2 (Tableau 5). L'axe 2 de l'ACP (représentant 16,40% de la variance totale) confirme la discrimination de C2, la démarcation de C32 par rapport à C31 et la similitude de C1 et C3 quant à leurs caractères quantitatifs (Figure 22). Les caractères responsables de cette discrimination sur l'axe 2 de l'ACP sont HPC, PLC, LTC1, LTE, ITE, LGM et LR (Tableau 5), les mêmes que ceux qui expliquent l'axe 1 de la PCoA (Figure 20A). Sur d'autres axes de l'ACP (non montrés), seuls des continuums ont été révélés. LTA a apporté une contribution importante sur l'axe 4, mais sans tendance à une séparation nette entre les groupes.

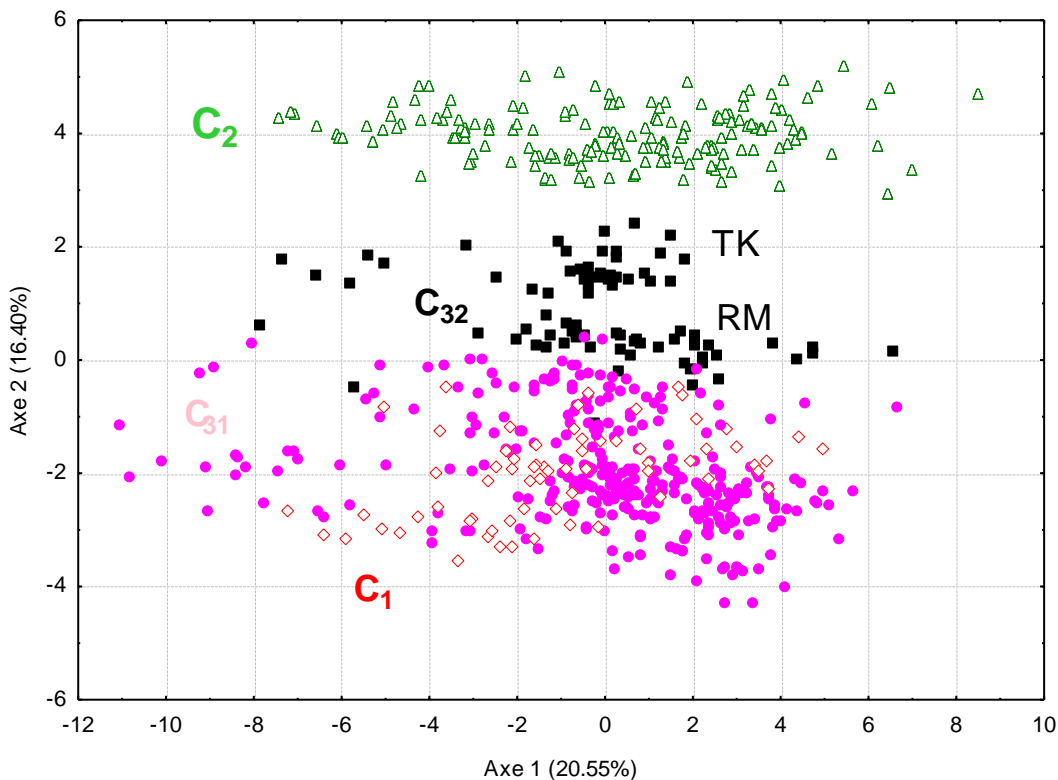


Figure 22 : Nuage de points de l'ACP basé sur les caractères quantitatifs. Voir Figure 21 pour la comparaison et le Tableau 5 pour la contribution des variables.

Tableau 5 : Comparaison des caractères morphologiques entre les groupes d'*Ebenus pinnata*. Les valeurs sont exprimées en moyenne±ET (ligne supérieure) et en valeurs min-max (ligne inférieure). Les valeurs avec des lettres différentes sont significativement différentes à p=0.05 (HSD à N inégaux). FL1 : Poids factoriels pour l'axe 1 de la PCoA (ligne supérieure) et de l'ACP (ligne inférieure) ; FL2 : Poids factoriels pour l'axe 2 de la PCoA (ligne supérieure) et de l'ACP (ligne inférieure). Les poids factoriels sont calculés en tant que coefficient de corrélation de Pearson. L'ACP n'est pas concernée par les traits qualitatifs. Les poids factoriels des traits qualitatifs pour l'axe 1 et l'axe 2 de la PCoA sont données comme coefficient de Pearson R (ligne supérieure) et comme coefficient Gamma (ligne inférieure). Les résultats de la PCoA et de l'ACP figurent respectivement dans les figures 20 et 22. NA : Non attribué (état constant du caractère). Voir Tableau 3 pour la signification des codes des caractères.

#	Code	FL1	FL2	C ₁₁ (FB) N=27	C ₁₂ (AZ) N=20	C ₁₃ (AG) N=20	C ₂ N=174	C ₃₁ (N=317)	C ₃₂ (N=81)
1	DB	-0,04 0,43	-0,12 -0,05	0,59±0,29AB 0,22-1,23	0,44±0,14A 0,23-0,73	0,81±0,19B 0,31-1,08	0,71±0,49B 0,09- 4,16	0,68±0,31B 0,09-1,98	0,63±0,47AB 0,10- 4,18
2	LT	0,00 0,85	-0,31 -0,05	63,69±22,24AB 30,90-107,80	40,17±15,32A 17,40-70,60	60,83±18,40AB 34,80-101,20	70,28±27,36B 19,50- 147,50	72,19±28,22B 10,4- 165,7	71,0±25,81B 20,70- 132,00
3	NT	-0,03 0,52	0,02 -0,07	3,96±2,24AB 1,00-9,00	2,95±1,47A 1,00-7,00	14,40±5,74C 4,00-27,00	5,00±4,95B 1,00- 34,00	4,52±5,39AB 1,00-29,00	3,13±1,78A 1,00-15
4	DT	0,09 0,73	-0,19 -0,14	3,73±1,40aAB 2,10-6,50	3,20±0,74A 1,90-4,80	4,65±1,29B 2,80-7,20	3,71±1,41AB 0,90- 8,30	3,98±1,4AB 0,9- 8,5	3,82±1,23AB 1,00-7,00
5	LIN	0,03 0,69	-0,12 -0,09	5,53±0,84A 3,80-6,80	4,49±1,43A 2,30-6,40	4,58±0,85A 3,40-6,10	5,25±1,57A 1,70- 9,50	5,29±1,75A 0,0- 9,9	4,90±1,40A 1,70-7,80
6	NI	-0,03 0,82	-0,16 -0,04	36,70±42,95AB 5-135	10,20±6,49A 3-28	77,90±26,98B 24-123	48,99±46,23AB 2- 244	49,29±50,19AB 2- 513	40,41±37,84AB 3- 200
7	DP	0,16 0,23	0,91 0,99	TrèsAbondant	Très Abondant	Abondant	84,5% Présent 15,5% Abondant	Présent	Présent
8	LS	0,01 0,74	-0,26 -0,07	12,24±2,34ABC 9,00-16,80	9,63±1,13A 8,20-12,50	11,49±1,59AB 7,30-15,20	12,76±3,30BC 6,00-20,20	13,13±3,46C 4,2-23,5	11,49±3,72AB 6,20-17,90

9	IS	0,14 0,69	-0,19 -0,19	4,29±1,06aAB 2,80-6,20	3,58±0,56A 2,70-4,90	4,44±0,81B 2,90-6,50	4,12±0,84AB 2,10-6,50	4,39±1,01AB 1,9-8,2	4,31±0,81AB 2,10-5,60
10	CS	0,17 0,20	0,76 1,00	Vert	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose
11	LF	-0,04 0,81	-0,11 -0,00	10,42±1,18B 7,90-12,50	7,38±1,13A 5,30-9,70	9,35±1,55AB 6,30-11,80	9,71±2,63B 3,70- 15,80	9,41±2,51AB 3,2- 17,2	9,13±2,56AB 3,70- 17,40
12	IF	0,01 0,69	0,00 -0,04	6,17±0,59C 4,40-7,20	4,24±0,53A 3,30-5,20	5,31±0,73B 3,80-6,30	5,19±0,94B 3,10- 7,70	5,21±0,95B 2,4- 7,70	5,48±0,97BC 2,70- 7,10
13	PP	NA	NA	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent	Présent
14	PR	0,02 0,23	0,82 0,98	Abondant	Abondant	Présent	84,5% Présent 15,5% Abondant	Présent	Présent
15	PNR	NA	NA	Abondant	Abondant	Abondant	Abondant	Abondant	Abondant
16	PLF	0,11 0,04	-0,42 -0,88	Abondant	Présent	Abondant	15,5% Présent 84,5% Abondant	Abondant	Abondant
17	LP	-0,12 0,72	-0,13 0,07	4,72±1,18B 3,00-6,50	3,44±0,50A 2,70-4,50	4,13±1,03AB 1,80-5,80	4,78±1,50B 1,60- 8,60	4,37±1,4AB 1,8- 9,4	4,36±1,39AB 1,90- 10,20
18	NPF	-0,09 0,54	-0,26 0,06	4,52±0,51AB 4-5	4,05±0,69A 3-5	4,55±0,60AB 3-5	4,76±0,59B 3- 6	4,70±0,70B 2- 6	4,78±0,50B 3-5
19	NPM 1	0,11 -0,17	0,39 -0,13	2,63±0,49B 2-3	3,20±0,41C 3-4	3,15±0,37C 3-4	2,34±0,59B 1-4	2,32±0,48B 2-4	2,05±0,22A 2-3
20	NPM 2	-0,08 0,59	-0,10 0,05	4,89±0,32A 4-5	4,75±0,44A 4-5	5,00±0,00A 5-5	4,93±0,47A 3- 6	4,84±0,61A 2- 6	4,91±0,32A 3- 5
21	LFO	-0,07 0,65	-0,07 0,04	2,86±0,26C 2,10-3,20	1,99±0,20A 1,60-2,40	2,40±0,31B 1,70-3,00	2,57±0,44AB 1,50- 3,70	2,52±0,43B 1,2- 4,3	2,70±0,41AB 1,20- 3,40

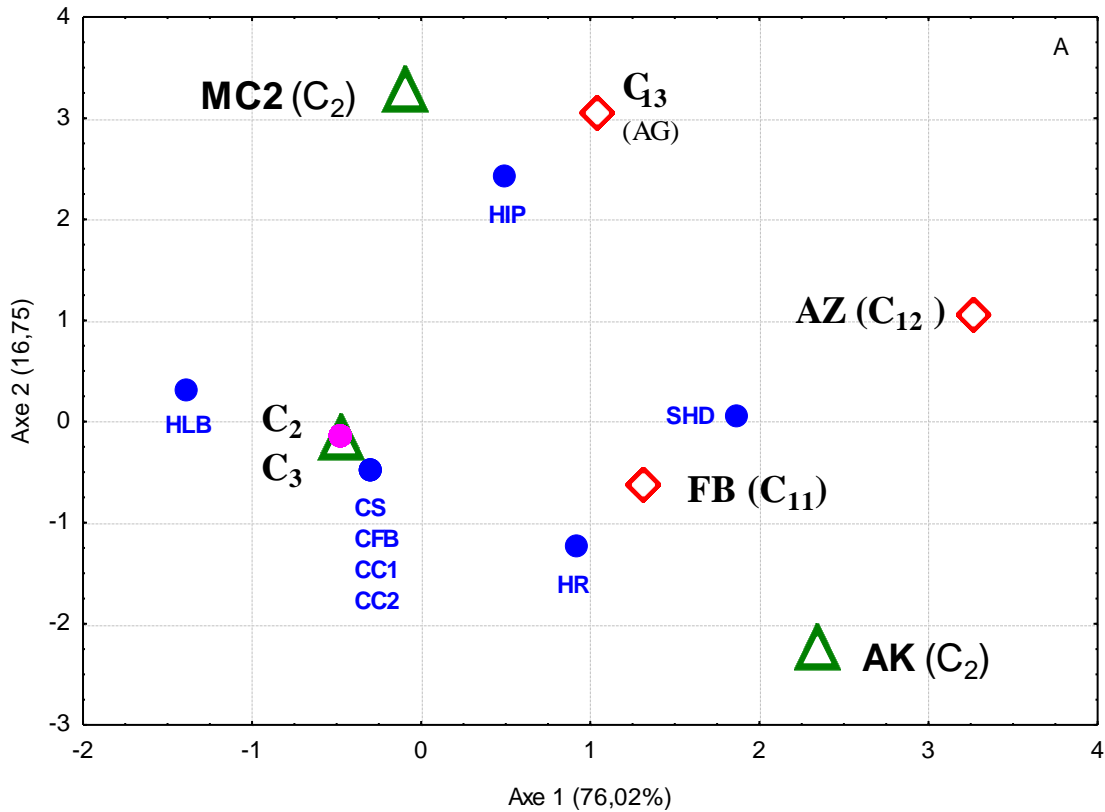
22	IFO	0,13 0,45	0,25 -0,16	8,02±0,83B 5,50-9,50	6,82±1,12A 4,90-9,00	8,70±1,20B 6,80- 11,50	6,40±1,07A 3,40- 9,50	6,5±1,16A 3,5- 10,2	6,49±0,99A 3,50-8,100
23	LPI	-0,03 0,66	-0,21 -0,02	18,07±3,30A 12,70-24,00	18,25±3,74A 11,20-23,70	21,3±3,05A 17,00-27,50	20,28±3,44A 12,20- 33,50	20,01±3,59A 7,3- 32,7	19,24±4,43A 10,90- 30,90
24	PPI	0,10 0,20	0,76 0,94	Abondant	Abondant	Abondant	88,5% Présent 11,5% Abondant	Présent	Présent
25	LI	-0,00 0,68	-0,16 -0,02	4,23±1,40A 1,60-6,70	3,73±1,17A 1,50-5,90	5,41±1,42B 3,20- 8,60	4,35±1,37AB 1,30- 8,10	4,39±1,24AB 1,1- 8,4	4,66±1,05AB 1,90-6,50
26	II	-0,05 0,55	-0,24 0,02	2,13±0,31A 1,50-2,70	2,20±0,39A 1,50-3,10	2,31±0,22A 1,90-2,80	2,36±0,36A 1,10-3,20	2,35±0,38A 0,4-3,2	2,29±0,22A 1,5-2,70
27	NFM 1	0,11 0,25	-0,09 -0,12	18,07±6,96B 5-31	14,00±6,98AB 4-30	8,20±4,48A 2-17	14,06±7,79AB 2- 38	15,88±7,42B 2- 47	13,63±5,04AB 6- 31
28	NFM 2	-0,07 0,78	-0,20 0,05	50,15±18,04B 26-87	35,75±13,46A 9-59	53,10±12,03B 29-71	51,21±18,90B 7- 93	49,72±3,66B 4- 75	51,49±14,45B 14- 75
29	LB	-0,31 0,39	-0,51 0,30	7,30±0,62A 5,60-8,10	8,48±0,87BC 7,00-10,00	7,76±0,53AB 7,00-8,50	10,05±1,44D 5,50- 12,50	9,44±1,3C 7- 12,7	9,36±0,77C 7,90- 11,50
30	IB	0,24 0,06	0,25 -0,25	3,46±0,31C 2,80-3,90	3,27±0,23BC 3,00-3,80	3,31±0,33BC 2,50-3,90	3,02±0,34A 2,30- 4,00	3,12±0,3B 2,3- 4,2	3,04±0,18AB 2,20- 3,50
31	CB	0,17 0,51	0,76 1,00	Vert	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose
32	LC1	-0,15 0,23	-0,31 0,16	11,57±2,26A 1,27-13,00	12,77±0,96AB 11,00-15,00	12,90±0,63AB 12,10-14,30	14,09±1,30B 10,50- 16,70	13,84±1,88B 7,80- 17,9	13,89±0,51B 12,20- 15,50
33	CC1	0,17 0,51	0,76 1,00	Vert	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose

34	PC1	NA	NA	Cilié Abondant	Cilié Abondant	Cilié Abondant	Cilié Abondant	Cilié Abondant	Cilié Abondant
35	LC2	-0,06 0,21	-0,21 0,06	7,70±0,37A 7,00-8,20	7,83±0,87AB 7,00-10,00	8,35±0,35AB 7,90-9,20	8,59±1,01B 0,20- 10,20	8,49±1,43AB 7- 15,5	8,25±0,29AB 7,50- 8,70
36	CC2	0,17 0,51	0,76 1,00	White	Rose	Rose	Rose	Rose	Rose
37	OC	NA	NA	Indéhiscant	Indéhiscant	Indéhiscant	Indéhiscant	Indéhiscant	Indéhiscant
38	LTA	-0,16 0,09	-0,60 0,12	1,23±0,11A 1,00-1,40	2,34±0,05C 2,30-2,40	1,79±0,06B 1,70-1,90	2,71±0,25D 2,20-3,20	2,67±0,49CD 1,7-3,7	2,77±0,13D 2,60-3,00
39	LLA	-0,01 0,13	-0,47 0,04	1,03±0,09A 0,90-1,10	1,26±0,05AB 1,20-1,30	1,38±0,09B 1,30-1,50	1,70±0,27C 1,30-2,30	1,8±0,39C 1,2-2,6	1,71±0,31C 1,30-2,10
40	LLB	-0,00 -0,01	-0,57 -0,02	0,95±0,05A 0,90-1,00	0,87±0,05A 0,80-0,90	1,08±0,10B 1,00-1,30	1,20±0,15C 0,90-1,40	1,23±0,13C 1-1,5	1,20±0,09C 1,10-1,30
41	LLC	-0,08 -0,02	-0,19 0,16	0,33±0,05A 0,30-0,40	0,30±0,02A 0,30-0,40	0,44±0,05AB 0,40-0,50	0,52±0,17B 0,30-0,90	0,50±0,21B 0,3-1,00	0,37±0,07A 0,30-0,50
42	HPC	-0,93 0,04	-0,08 0,89	3,01±0,09A 2,90-3,10	3,44±0,08B 3,30-3,50	4,21±0,17C 3,90-4,50	4,97±0,10D 4,70- 5,20	3,65±0,34B 3,3- 4,6	4,41±0,15C 4,20- 4,70
43	PLC	-0,82 0,09	0,32 0,79	3,83±0,09E 3,70-3,90	2,92±0,04A 2,90-3,00	3,58±0,18D 3,20-3,80	4,04±0,28F 3,20- 4,30	3,19±0,13B 2,8- 3,9	3,32±0,13C 3,10- 3,50
44	LTC1	-0,89 0,05	0,14 0,86	6,16±0,05B 6,10-6,20	5,71±0,15A 5,50-5,90	6,42±0,27B 5,90-6,90	6,99±0,09C 6,70- 7,20	5,9±0,28A 4,9-6,9	6,44±0,19B 6,10-6,80
45	EC	NA	NA	<90°	<90°	<90°	<90°	<90°	<90°
46	FE	NA	NA	Obovale	Obovale	Obovale	Obovale	Obovale	Obovale

47	LTE	-0,90 0,01	0,16 0,88	6,95±0,13D 6,70-7,10	6,17±0,08A 6,10-6,30	6,59±0,37BC 6,00-7,10	8,05±0,11E 7,80- 8,40	6,47±0,5AB 5,3- 7,9	6,87±0,30CD 5,60- 7,30
48	LLE	-0,73 0,04	0,49 0,73	6,46±0,12E 6,30-6,60	4,10±0,11A 4,00-4,30	5,28±0,19C 4,90-5,50	6,03±0,08D 5,90- 6,20	4,46±0,47B 3,8- 5,6	4,40±0,17AB 4,10- 4,70
49	ILE	-0,51 -0,00	0,19 0,88	4,08±0,14BC 3,90-4,30	3,46±0,08A 3,30-3,50	4,79±0,22ABC 4,30-5,10	6,02±0,12C 5,70- 6,20	3,8±0,70A 3,2- 5,2	4,43±0,22AB 4,00- 5,00
50	LPE	-0,22 -0,01	-0,68 0,21	0,51±0,05A 0,40-0,60	2,06±0,11C 1,80-2,30	1,31±0,29B 0,70-1,80	2,04±0,13C 1,70-2,30	2,4±0,21C 1,2-2,7	2,41±0,23D 1,90-2,80
51	LCM	-0,25 0,14	-0,54 0,23	13,39±0,49A 12,50-14,10	14,35±0,26B 14,00-14,70	13,24±0,35A 12,70-13,80	15,37±0,70C 13,70- 17,00	15,05±1,02B 11,9- 17,5	14,97±0,27B 14,30- 15,70
52	LTC	0,11 0,06	-0,44 -0,16	2,85±0,18A 2,50-3,10	3,06±0,05BC 3,00-3,10	2,81±0,11A 2,60-2,90	3,14±0,13C 2,00- 3,30	3,2±0,27C 2,1- 3,5	3,02±0,15B 2,70- 3,30
53	LPC	-0,23 0,14	-0,01 0,25	3,28±0,04A 3,20-3,30	3,31±0,05AB 3,20-3,40	3,27±0,04A 3,20-3,30	3,35±0,18B 3,20- 3,90	3,30±0,05A 3,2- 3,5	3,29±0,04A 3,20- 3,40
54	LGM	-0,81 0,03	-0,06 0,83	5,05±0,08A 4,90-5,20	5,17±0,05A 5,10-5,20	5,08±0,07A 5,00-5,20	5,89±0,12C 5,50- 6,10	5,14±0,11A 4,9- 5,4	5,46±0,62B 2,90- 6,10
55	IGM	-0,47 0,01	-0,31 0,46	3,09±0,16A 2,80-3,30	3,15±0,05AB 3,10-3,20	3,04±0,08A 2,90-3,20	3,40±0,08C 3,30- 3,50	3,25±0,14B 2,8- 3,5	3,21±0,16B 3,00- 3,40
56	LG	-0,84 0,00	-0,04 0,79	2,35±0,08A 2,30-2,50	2,38±0,06A 2,30-2,50	2,34±0,05A 2,30-2,40	2,99±0,08B 2,80- 3,10	2,34±0,15A 2- 2,7	2,99±0,10B 2,80- 3,20
57	IG	-0,87 -0,01	0,05 0,85	2,06±0,05A 2,00-2,10	2,16±0,07B 2,00-2,20	2,04±0,05A 2,00-2,10	2,36±0,06C 2,20- 2,50	2,05±0,06A 1,9- 2,2	2,21±0,14B 2,00- 2,40
58	LR	-0,60 -0,00	0,02 0,60	2,13±0,05A 2,10-2,20	2,11±0,04A 2,10-2,20	2,14±0,05AB 2,10-2,20	2,24±0,05C 2,10- 2,30	2,11±0,1A 1,90- 2,30	2,21±0,05B 2,10- 2,30

59	RCC	0,08 -0,00	0,05 -0,08	0,85±1,06B 0,58-6,14	0,61±0,05A 0,54-0,77	0,65±0,04AB 0,56-0,71	0,61±0,07A 0,5-0,75	0,64±0,28AB 0,42-1,99	0,59±0,02A 0,54-0,63
60	RPC	-0,66 -0,02	0,28 0,70	1,78±0,13B 1,61-2,08	1,69±0,03AB 1,64-1,73	1,81±0,07B 1,72-1,96	1,88±0,10C 1,72-2,85	1,62±0,14A 1,43- 2,43	1,80±0,18B 0,88- 2,03
61	RSP	-0,44 -0,01	-0,01 0,43	0,47±0,02A 0,44-0,51	0,46±0,01A 0,44-0,49	0,46±0,01A 0,44-0,48	0,50±0,02B 0,47-0,56	0,45±0,02A 0,39-0,52	0,54±0,04C 0,46-0,62
62	RRS	0,80 -0,02	0,06 -0,79	0,91±0,03B 0,84-0,96	0,89±0,03B 0,84-0,96	0,92±0,03B 0,87-0,96	0,75±0,02A 0,70-0,79	0,90±0,04B 0,78-1,00	0,74±0,03A 0,68-0,82
63	P	NA	NA	20,54±0,96C 17,78-23,04	20,15±0,86C 18,57-21,94	18,38±0,98A 16,29-20,39	19,22±1,26B 16,27-22,76	18,34±1,52A 15,18-23,26	18,69±1,36A 15,68-21,96
64	E	NA	NA	13,91±0,72BC 12,33-15,51	12,74±0,76A 11,32-14,59	13,50±0,82B 10,41-14,90	13,47±1,21B 10,40-15,78	12,91±1,12A 10,25-15,51	14,31±0,97C 10,97-17,13
65	P/E	NA	NA	1,48±0,10B 1,27-1,64	1,58±0,10C 1,37-1,92	1,36±0,09A 1,19-1,56	1,43±0,13B 1,13-1,85	1,43±0,13B 1,09-1,79	1,31±0,08A 1,14-1,58
66	SGR	NA	NA	95% A	98% A	97% A	90-97% A	92-98% A	92-96% A

L'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) des caractères qualitatifs est illustrée par la Figure 23A. Les caractères qualitatifs distinguent les populations du groupe C1 (FB, AZ et AG), la population AK et la population MC2 ; les groupes C2 et C3 se sont révélés complètement identiques en ce qui concerne leurs caractères qualitatifs (Figure 23B).



	DP	CS	PR	PLF	PPI	CB	CC1	CC2
C2	1	1	1	2	1	1	1	1
C3	1	1	1	2	1	1	1	1
MC2	1	1	1	2	2	1	1	1
AK	2	1	2	1	1	1	1	1
AZ	3	1	2	1	2	1	1	1
AG	2	1	1	2	2	1	1	1
FB	3	2	2	2	2	2	2	2

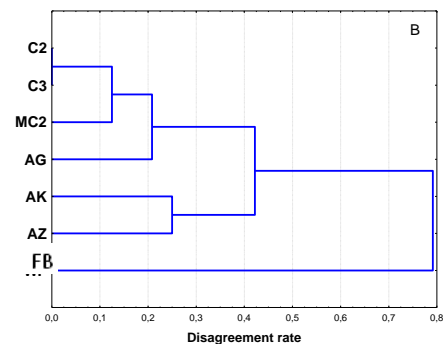


Figure 23 : Traitement multivarié des caractères qualitatifs. A : Nuage de points AFC comparant les 34 populations sur la base de 8 caractères qualitatifs (points bleus) ; B : CAH sur les mêmes données qu'en A (résumées dans le tableau de gauche). Voir les tableaux 1 et 2 pour les populations et les codes de caractères. Les variables discriminantes et la caractérisation morphologique détaillée des six groupes sont présentées dans le Tableau 5. Les six groupes sont significativement discriminés pour la plupart des caractères (Tableau 5).

Le traitement multivarié des 433 spécimens d'herbiers numériques basé sur 15 caractères morphologiques (Tableau 4) a révélé deux groupes discriminés par la pilosité des tiges (Figure 24A). La même tendance a été montrée en utilisant les 639 plantes fraîches avec les mêmes 15 caractères (Figure 24B). Les différences entre les six groupes taxonomiques (Figure 20 et 21) étaient principalement dues à des caractères cachés des fleurs et des fruits non visibles sur le matériel herbier.

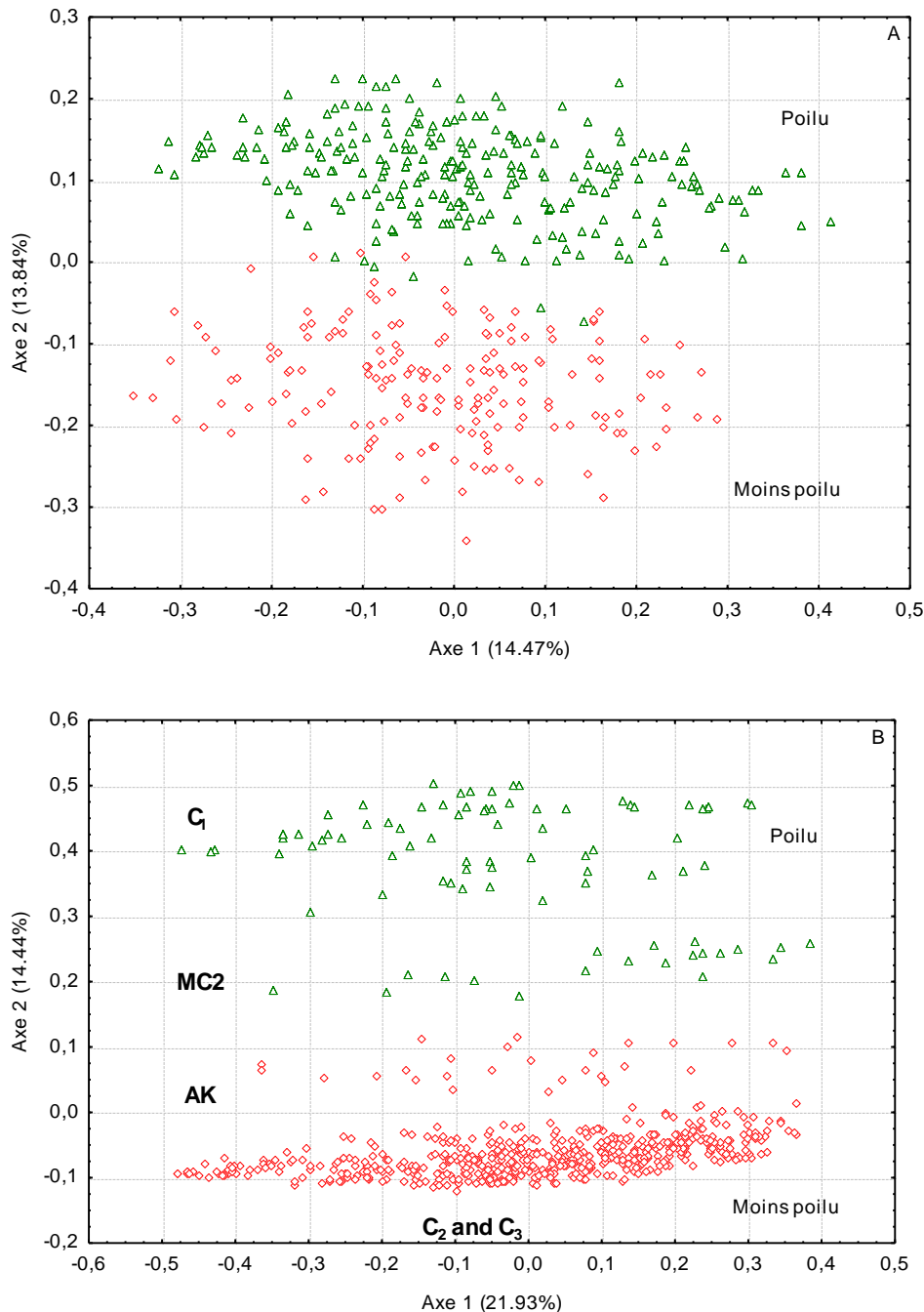


Figure 24: Nuage de points PCoA de spécimens d'herbiers numériques (A) en comparaison avec des plantes fraîches (B). L'axe 1 est expliqué par les traits quantitatifs des tiges et des feuilles, l'axe 2 par la pilosité des tiges.

III.3. Morphologie, pollinisation, dispersion des graines et pouvoir germinatif

Outre l'hétérogénéité taxonomique exposée plus haut, il est important de noter la pilosité assez épaisse des plantes (feuilles, tiges, calices et gousses) (Figure 25A, B et L) ; la forte réduction des parties de la corolle (Figure 25D, G-I, K), en particulier les ailes ; l'indéhiscence de la carène dont les marges sont collées l'une contre l'autre et complètement fusionnées à l'apex, emprisonnant ainsi le style et la colonne staminale fortement recourbés (caractéristique sans variabilité intra-populationnelle ou intra-individuelle, suggérant une cleistogamie complète) (Figure 25H, J ; Figure 26A, B) ; la germination du pollen a lieu longtemps avant l'anthèse (cleistogamie des bourgeons) (Figure 26C) ; la réduction du tube du calice (2,5-3,3 mm de long) renfermant la gousse monosperme spongieuse et velue ; les dents du calice relativement longues (9-14 mm) et épaisses (Figure 25D, F), et les calices matures caducs (suggérant l'anémochorie). *E. pinnata* est une plante à floraison relativement tardive (fin mai-début juillet). Ses fleurs ne sont visitées par les insectes que vers la fin de la saison de floraison (juillet), lorsque les fleurs d'autres espèces végétales deviennent rares.

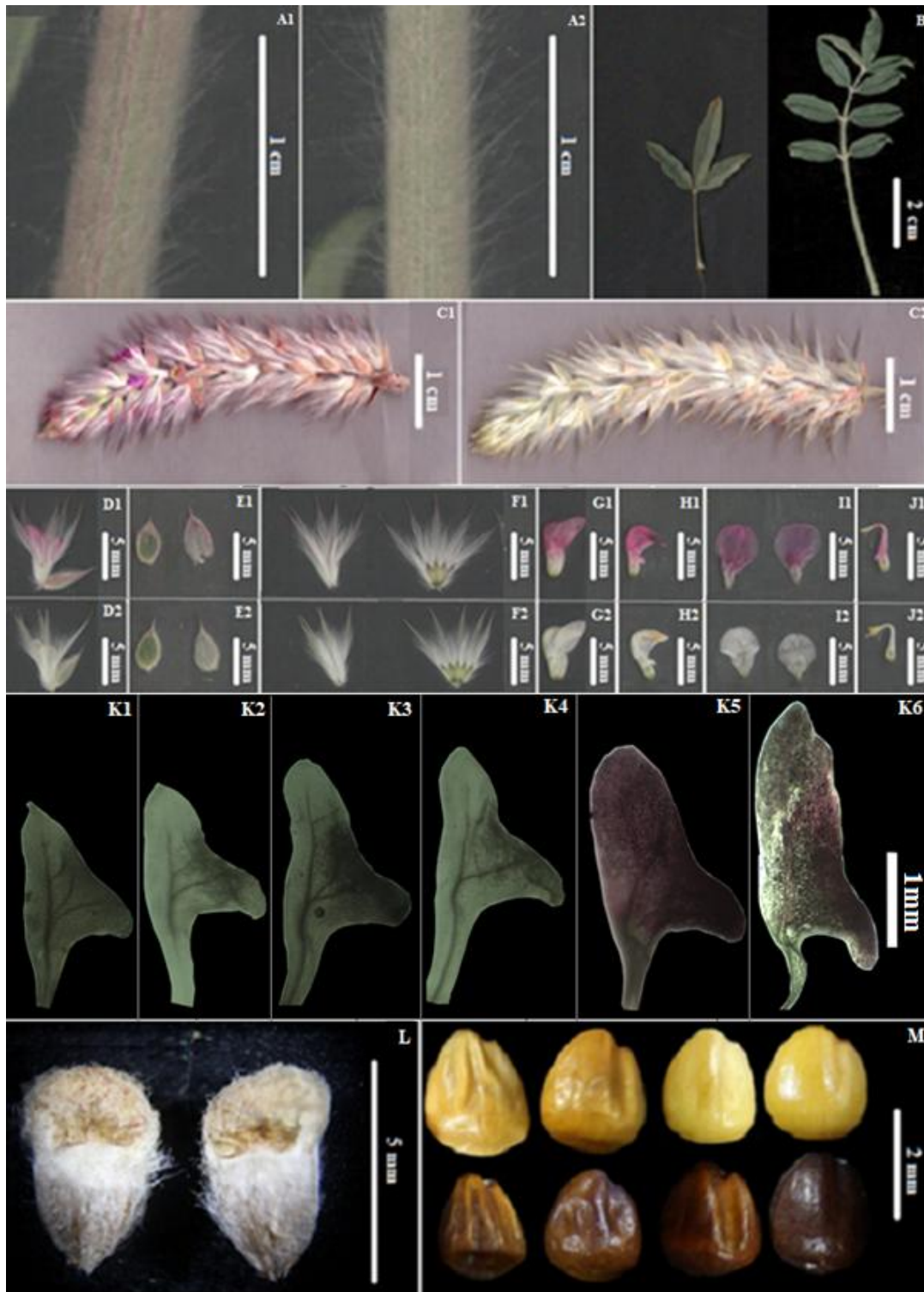


Figure 25: Sélection de caractères morphologiques chez *Ebenus pinnata*. A. Poils de la tige chez les plantes à fleurs pourpres (A1) et les plantes à fleurs blanches (A2) ; B : Feuilles et folioles chez *E. pinnata* ; C : Inflorescence des plantes à fleurs pourpres (C1) et à fleurs blanches (C2) ; D-k : Caractères floraux des plantes à fleurs pourpres (D1-K1) et des plantes à fleurs blanches (D2-K2) (D : Fleur entière ; E : Stipule supérieure à gauche et Stipule inférieure à droite ; F : Calice entier à gauche, calice ouvert à droite ; G : Corolle entière ; H : Carène ; I : Etandard, face supérieure à gauche, face inférieure à droite ; J : Colonne staminale et pistil ; K1-6 : Gradient morphologique de l'aile (K1-3 : Groupes C1, C2 et C3 respectivement ; K4-6 : Groupe C2, C31 et C32) ; L : Gousse ; M : Différentes formes de graines.

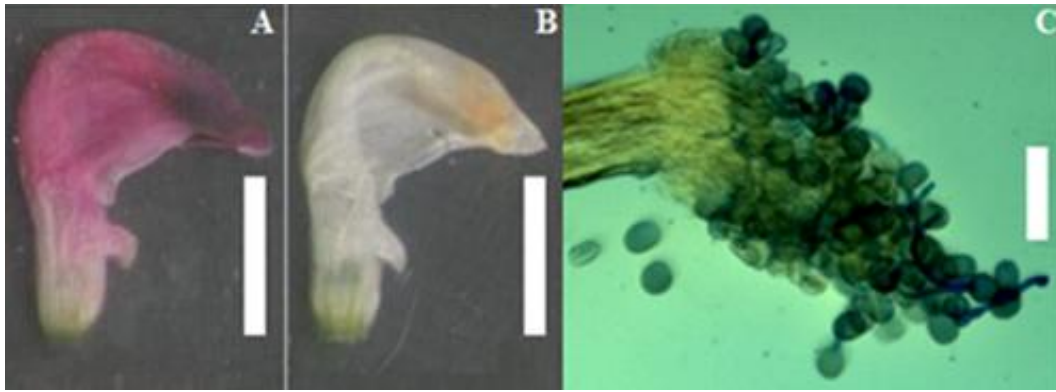


Figure 26 : Stigmate du bouton floral d'*Ebenus pinnata*. Stigmate et étamines à l'intérieur de la carène (A : type à fleurs pourpres ; B : type à fleurs blanches) ; Stigmate avant l'anthèse couvert de grains de pollen, observé au microscope optique (C). Notez les grains de pollen germés avec les tubes polliniques colorés en bleu dans C. Barre d'échelle : 3mm (A et B) ; 100 µm (C).

Les plantes du groupe C2, associées au semi-aride, étaient autant ou parfois plus développées (en termes de taille des plantes, de taille des feuilles, de nombre de tiges et d'inflorescences, de nombre de fleurs par inflorescence, de taille des fleurs, de taille des gousses et des graines) que celles du groupe C3 associées au subhumide (Tableau 5). Les plantes des groupes C2 et C3 étaient beaucoup plus développées que celles du groupe C1 (Tableau 4). Plus intéressant encore, le groupe C2 a montré les valeurs les plus élevées du nombre de fleurs (Tableau 5, caractère 28), de la taille de la carène (taille du pistil) (Tableau 5, caractères 42-44), de la taille des gousses (Tableau 5, caractères 54 et 55) et de la taille des graines (Tableau 5, caractères 56-58). Cette meilleure adaptation du groupe C2 au climat semi-aride peut être considérée comme un signe de xérophilie (adaptation à l'aridité).

La taille des grains de pollen, exprimée par les axes polaire et équatorial et leur rapport, est significativement différente entre les groupes (Tableau 5, lignes 63-65 ; Tableau 6). Les grains de pollen les plus longs en moyenne se trouvent dans les groupes C11 et C12 ($20,54 \pm 0,96 \mu\text{m}$ et $20,15 \pm 0,86 \mu\text{m}$ respectivement), et les grains de pollen les plus larges sont ceux du groupe C32 ($14,31 \pm 0,97 \mu\text{m}$).

Tableau 6: Comparaison de la taille des grains de pollen des groupes C1, C2 et C3 d'*Ebenus pinnata* avec celle des autres espèces du genre *Ebenus*. P : axe polaire ; E : axe équatorial. Une couleur similaire indique une taille similaire des grains de pollen.

Groupes Taxonomiques	P	E	P/E	Références
C1	16.20–23.04	10.41–15.51	1.19–1.92	Présente étude
C2	16.27–22.76	10.40–15.78	1.13–1.85	Présente étude
C3	15.18–23.26	10.25–17.13	1.09–1.79	Présente étude
<i>E. cretica</i>	36–40	16–20	2.25–2	Halbritter et al., 2020
<i>E. barbiger</i>	24,6	17,3	1.42	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. pisidica</i>	32,1	18,8	1.71	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. plumosa</i>	30,4	16,2	1.88	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. boissieri</i>	35,8	17,7	2.02	Aytaç and Yildirim, 2017

<i>E. bourgaei</i>	28,8	16,8	1.71	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. reesei</i>	36,5	16,3	2.24	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. macrophylla</i>	28,3	16,8	1.68	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. hirsuta</i>	30,3	17,7	1.71	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. longipes</i>	35,6	18,4	1.93	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. depressa</i>	27,8	17,2	1.62	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. cappadocica</i>	25,2	17,8	1.42	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. haussknechtii</i>	29,1	17,7	1.64	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. laguroides</i>	28–31,8	16,3–16,7	1.72–1.90	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. zekiyeae</i>	27,9	18	1.55	Aytaç and Yildirim, 2017
<i>E. stellata</i>	27,5	12,4	2.22	Ghanavati and Amirabadizadeh, 2012

Aucun traitement mécanique ou chimique n'a été nécessaire pour la germination des graines. La plupart des graines saines ont germé après 3 jours. Les taux de germination des graines oscillent entre 90-98% (Tableau 5, ligne 66). Les plantules n'ont pas survécu à la culture en pot, que ce soit après transplantation à partir de boîtes de Petri ou lorsqu'elles ont été semées directement dans des pots, même dans leur sol d'origine. Des graines encore enfermées dans le calice ont été observées germées juste après la dispersion sur les sacs d'emballage humides des plantes récoltées. Les graines récoltées en juillet 2014 dans les populations FB, AS et SM1 (voir Tableau 3 pour les codes des populations) ont présenté, en janvier 2015, un an après la récolte, des taux de germination de respectivement 95% (FB), 94% (AS) et 96% (SM1). En février 2021, près de sept ans après la récolte, leur pouvoir germinatif est resté inchangé, avec des taux de germination de respectivement 97 % (FB), 90 % (AS) et 96 % (SM1). En ce qui concerne les cultures expérimentales dans des conditions de terrain, aucune plante n'est apparue dans les endroits ensemencés, même pour les graines prélevées sur des plantes indigènes du champ de l'expérience.

III.4. Analyse cytogénétique

Pour toutes les populations étudiées, les plaques métaphasiques de mitoses présentent $2n = 14$ chromosomes (Tableau 7 et Figure 27). En tout, ce nombre a été compté sur 234 plaques mitotiques (41 pour le groupe C1, 82 pour le groupe C2, et 111 pour le groupe C3). Des constriction secondaires sont présentes au moins sur la paire de chromosomes 2 du caryotype A (Groupe C1) (Figure 27A') ; les paires de chromosomes 1, 2 et 4 du caryotype B (Groupe C2) (Figure 27B') et les paires de chromosomes 2 et 7 (Figure 27C'). Les longueurs des chromosomes ont été mesurées pour seulement une plaque par groupe, ce qui est très insuffisant. Nous présentons ici ces mesures qu'à titre indicatif comme résultats préliminaires sur la caryomorphologie des trois groupes C1, C2 et C3.

Tableau 7: Populations et nombres de plaques utilisées pour les comptages chromosomiques. Voir Tab. 2 pour la signification des codes des populations.

Groupe	Population	Mitoses à $2n=14$	Méioses I ou II à $n=7$
C1	FB	41	45
	AG		24
	AZ		6
C2	AK	7	7
	BO	1	94
	BM	63	
	TA		17
	AB		82
	TB	3	
	RM2	8	
C3	AS	29	28
	SM1		72
	AM	20	97
	BA		5
	AF	17	11
	SM2	34	27
	KH	11	88
Total		234	603

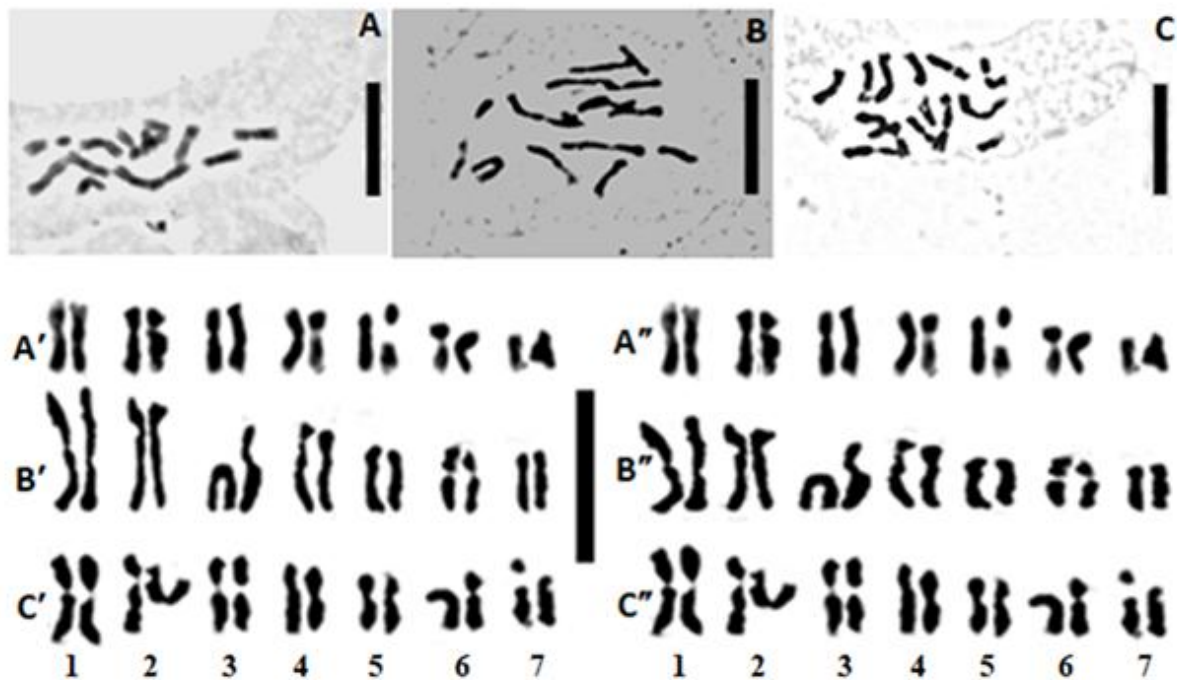


Figure 27: Chromosomes mitotiques d'*Ebenus pinnata*. A : plaque métaphasique de la population FB (groupe C1) ; B : plaque métaphasique de la population BM (groupe C2) ; C : plaque métaphasique de la population AS (groupe C3). A' : Caryogramme de la plaque A ; B' : Caryogramme de la plaque B ; C' : Caryogramme de la plaque C. A'' : Caryogramme A' après correction ; B'' : Caryogramme B' après correction ; C'' : Caryogramme C' après correction (les longueurs et largeurs des chromosomes ont été corrigées en référence à A' comme expliqué dans Matériel et méthodes). Les flèches indiquent les chromosomes divisés. Barre d'échelle = 10 μ m

Des différences de longueur des chromosomes ont été détectées entre les trois caryotypes même après ajustement pour éliminer l'effet de différence de degré de contraction des chromosomes (voir paragraphe II.7.3), en particulier pour le groupe C1 dont les chromosomes sont plus courts que ceux des deux autres groupes (Tableau 8).

Tableau 8: Mesures des chromosomes (μm) d'*Ebenus pinnata*. Les plaques A, B et C correspondant aux plaques de métaphase mitotique de la Figure 27. C1 (Population FB), C2 (Population BM) et C3 (Population AS) correspondent aux groupes taxonomiques tels que délimités dans la Figure 20. Chr : Chromosomes classés du plus long au plus court ; TL1 : Longueur totale avant ajustement ; TL2 : Longueur totale après ajustement ; W1 : Largeur avant correction ; W2 : Largeur après correction.

Chr	Plaque A (Groupe C1)				Plaque B (Groupe C2)				Plaque C (Groupe C3)			
	TL ₁	TL ₂	W ₁	W ₂	TL ₁	TL ₂	W ₁	W ₂	TL ₁	TL ₂	W ₁	W ₂
1	4,22	4,22	0,82	0,82	7,47	5,58	0,6	0,80	5,69	5,62	0,88	0,89
2	4,16	4,16	0,87	0,87	7,39	5,52	0,61	0,82	5,42	5,36	0,86	0,87
3	3,87	3,87	0,87	0,87	6,69	5,00	0,61	0,82	5,17	5,11	0,92	0,93
4	3,82	3,82	0,87	0,87	6,17	4,61	0,54	0,72	5,13	5,07	0,85	0,86
5	3,79	3,79	0,87	0,87	6,02	4,50	0,61	0,82	4,49	4,44	0,87	0,88
6	3,75	3,75	0,87	0,87	5,55	4,15	0,64	0,86	4,17	4,12	0,84	0,85
7	3,63	3,63	0,87	0,87	5,36	4,00	0,6	0,80	4,00	3,95	0,85	0,86
8	3,61	3,61	0,87	0,87	5,04	3,77	0,61	0,82	3,92	3,87	0,91	0,92
9	3,43	3,43	0,87	0,87	4,24	3,17	0,8	1,07	3,85	3,81	0,84	0,85
10	3,11	3,11	0,89	0,89	3,93	2,94	0,75	1,00	3,73	3,69	0,87	0,88
11	3,06	3,06	0,85	0,85	3,87	2,89	0,82	1,10	3,34	3,30	0,9	0,91
12	2,84	2,84	0,9	0,9	3,52	2,63	0,65	0,87	3,21	3,17	0,85	0,86
13	2,19	2,19	0,85	0,85	3,51	2,62	0,64	0,86	2,66	2,63	0,83	0,84
14	2,18	2,18	0,9	0,9	3,45	2,58	0,64	0,86	2,54	2,51	0,82	0,83
	$\Sigma\text{TL}_1 = \Sigma\text{TL}_2 = \mathbf{47.66}$				$\Sigma\text{TL}_1 = 72.21; \Sigma\text{TL}_2 = \mathbf{53.96}$				$\Sigma\text{TL}_1 = 57.32; \Sigma\text{TL}_2 = \mathbf{56.65}$			
	$\Sigma\text{TL}_1/2 = \Sigma\text{TL}_2/2 = \mathbf{23.83}$				$\Sigma\text{TL}_1/2 = 36.10; \Sigma\text{TL}_2/2 = \mathbf{26.98}$				$\Sigma\text{TL}_1/2 = 28.66; \Sigma\text{TL}_2/2 = \mathbf{28.33}$			

Les différences de longueurs relatives totales des lots haploïdes des chromosomes (R) entre les trois groupes taxonomiques C1, C2 et C3 sont au moins du même ordre que celles différenciant les autres espèces d'*Ebenus* reconnues (Tableau 9). Les distances euclidiennes (basées sur les longueurs chromosomiques relatives) entre les trois groupes d'*E. pinnata* sont aussi grandes, voire plus grandes, que les distances entre les autres espèces d'*Ebenus* (Tableau 10, Figure 28). Le groupe C1 se révèle plus proche des autres espèces d'*Ebenus* que les groupes C2 et C3 (Figure 28). La distance entre C2 et C3 est du même ordre ou même plus grande que celle entre de nombreuses autres espèces d'*Ebenus* (Tableau 10, Figure 28).

Tableau 9: Comparaison des longueurs de chromosomes (μm) et d'autres paramètres du caryotype (KP) chez les espèces d'*Ebenus*. C1, C2, C3 : Groupes taxonomiques avant ajustement de la longueur des chromosomes ; C1', C2' , C3' : Groupes taxonomiques après ajustement de la longueur des chromosomes. EP : *E. plumose* ; EM : *E. macrophylla* ; EH : *E. haussknechtii* ; EB : *E. barbiger* ; EL : *E. longipes* ; EA ; *E. argentea*. CL1-7 : Longueur du chromosome de la paire 1-7 (valeur moyenne des deux longueurs de chromosomes) ; T : Longueur totale du caryotype haploïde (ΣCLi) ; D : Gamme de longueur des chromosomes (CL1-CL7) ; R : Longueur totale relative du caryotype haploïde (T/D) ; RCL1-7 : Longueurs relatives des chromosomes 1-7 (=CLi/T). On s'attend à ce que les mêmes caryotypes aient des longueurs relatives totales de caryotype haploïde (R) et des longueurs relatives de chromosomes (RCL) très similaires.

	KP	C ₁	C ₂	C ₃	C ₁ '	C ₂ '	C ₃ '	EL ¹	EA ¹	EP ²	EM ²	EH ²	EB ²
Longueur des chromosomes	CL1	4.19	7.43	5.56	4.19	5.55	5.49	3.56	3.02	4.91	4.22	2.93	2.78
	CL2	3.84	6.43	5.15	3.84	4.81	5.09	3.26	2.76	4.20	3.51	2.75	2.63
	CL3	3.77	5.79	4.33	3.77	4.33	4.28	3.01	2.52	4.21	3.41	2.66	2.37
	CL4	3.62	5.20	3.96	3.62	3.89	3.91	2.85	2.42	4.15	3.16	2.59	2.19
	CL5	3.27	4.09	3.79	3.27	3.06	3.75	2.75	2.26	3.85	2.92	2.52	1.97
	CL6	2.95	3.70	3.28	2.95	2.76	3.24	2.54	2.07	3.43	2.56	2.29	1.82
	CL7	2.18	3.48	2.60	2.18	2.60	2.57	2.23	1.89	3.09	2.15	2.16	1.58
	T	23.82	36.12	28.67	23.82	26.98	28.33	20.20	16.94	24.44	21.93	17.90	15.34
D	2.01	3.95	2.96	2.01	2.95	2.92	1.33	1.13	1.82	2.07	0.77	1.20	
Longueur relative ch.	R	11.85	9.14	9.68	11.85	9.14	9.70	15.18	14.99	13.43	10.59	23.25	12.78
	RCL1	0,18	0,21	0,19	0,18	0,21	0,19	0,18	0,18	0,20	0,19	0,16	0,18
	RCL2	0,16	0,18	0,18	0,16	0,18	0,18	0,16	0,16	0,17	0,16	0,15	0,17
	RCL3	0,16	0,16	0,15	0,16	0,16	0,15	0,15	0,15	0,17	0,16	0,15	0,15
	RCL4	0,15	0,14	0,14	0,15	0,14	0,14	0,14	0,14	0,17	0,14	0,14	0,14
	RCL5	0,14	0,11	0,13	0,14	0,11	0,13	0,14	0,13	0,16	0,13	0,14	0,13
	RCL6	0,12	0,10	0,11	0,12	0,10	0,11	0,13	0,12	0,14	0,12	0,13	0,12
	RCL7	0,09	0,10	0,09	0,09	0,10	0,09	0,11	0,11	0,13	0,10	0,12	0,10

¹Aytaç and Pinar (2000), ²Aksoy et al. (2001).

Tableau 10: Matrice de distance euclidienne basée sur les longueurs relatives des chromosomes. Les données utilisées sont les longueurs chromosomiques relatives individuelles RCL (Tableau 8). Les distances euclidiennes entre les trois groupes d'*E. pinnata* (jaune) sont du même ordre ou plus grandes qu'entre la plupart des autres espèces d'*Ebenus* (vert). C1, C2, C3 : Groupes taxonomiques d'*E. pinnata* ; EP : *E. plumose* ; EM : *E. macrophylla* ; EH : *E. haussknechtii* ; EB : *E. barbiger* ; EL : *E. longipes* ; EA ; *E. argentea*. Voir le dendrogramme correspondant (Figure 28).

	C ₁	C ₂	C ₃	EP	EM	EH	EB	EL	EA
C ₁		0,05	0,03	0,03	0,03	0,06	0,02	0,04	0,02
C ₂	0,05		0,03	0,06	0,05	0,08	0,04	0,08	0,04
C ₃	0,03	0,03		0,04	0,03	0,07	0,03	0,06	0,02
EP	0,03	0,06	0,04		0,01	0,05	0,02	0,02	0,02
EM	0,03	0,05	0,03	0,01		0,06	0,02	0,03	0,01
EH	0,06	0,08	0,07	0,05	0,06		0,06	0,06	0,06
EB	0,02	0,04	0,03	0,02	0,02	0,06		0,04	0,02
EL	0,04	0,08	0,06	0,02	0,03	0,06	0,04		0,04
EA	0,02	0,04	0,02	0,02	0,01	0,06	0,02	0,04	

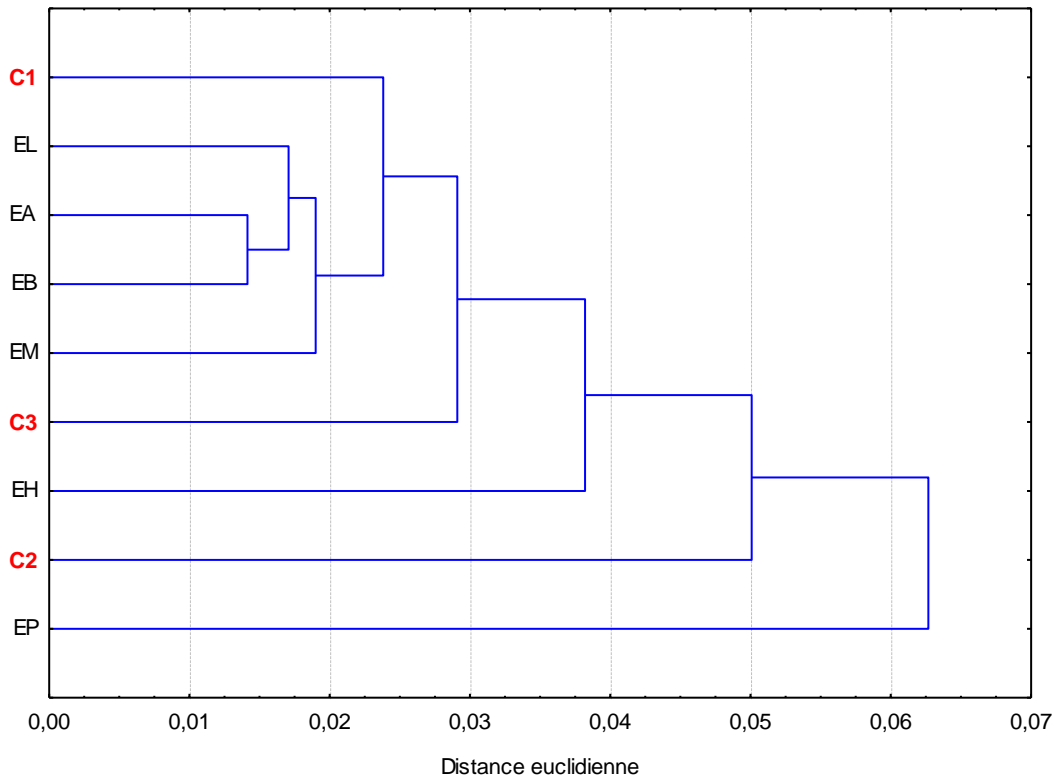


Figure 28: Dendrogramme UPGMA comparant les longueurs relatives des chromosomes entre les groupes d'*Ebenus* (RCL) du Tableau 9. La matrice de distances euclidiennes est donnée Tableau 10. C1, C2, C3 : Groupes taxonomiques d'*E. pinnata* de la présente étude ; EP : *E. plumose* ; EM : *E. macrophylla* ; EH : *E. haussknechtii* ; EB : *E. barbiger* ; EL : *E. longipes* ; EA ; *E. argentea*.

En tout, 603 plaques métaphasiques I ou II ont été observées (75 pour le groupe C1, 200 pour le groupe C2, et 328 pour le groupe C3) (Tableau 7). Les plaques de métaphase de la méiose I montrent 7 bivalents, toujours avec 5 bivalents en anneau et 2 bivalents en bâtonnet (Figure 29), confirmant ainsi le nombre de chromosomes de $2n = 2x = 14$, avec $x = 7$. Les plaques métaphasiques de la méiose II ont montré 7 chromosomes (Figure 29). Aucune irrégularité de méiose n'a été trouvée pour le matériel étudié. Les taux de fertilité du pollen étaient assez élevés. Ils variaient entre 93,47- 98,49% avec une valeur moyenne de $95,50 \pm 1,52\%$ pour le groupe C1 ; 91,22- 98,16% avec une valeur moyenne de $95,06 \pm 1,90\%$ pour le groupe C2 ; et 90,00-97,98% avec une valeur moyenne de $95,07 \pm 2,29\%$ pour le groupe C3.

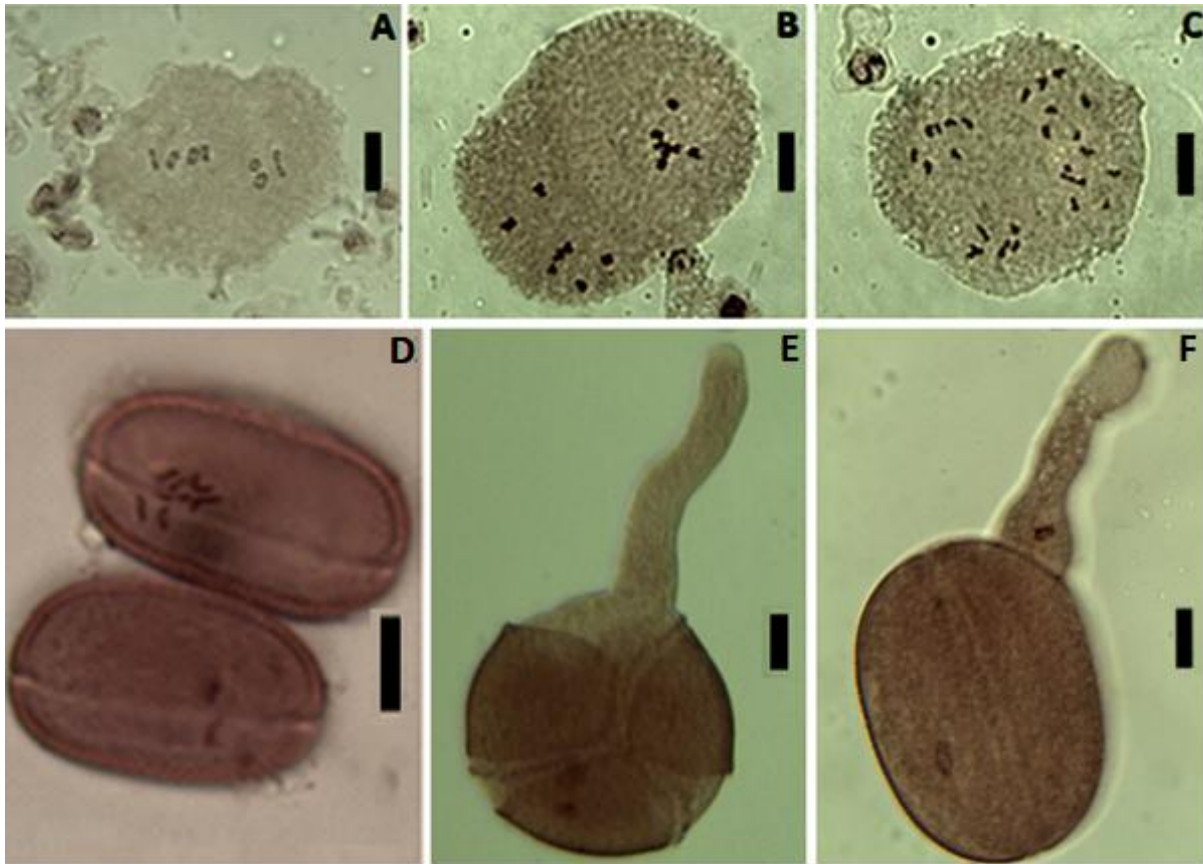


Figure 29: Chromosomes méiotiques d'*Ebenus pinnata*. A : Métaphase I avec 5 bivalents en anneau et 2 bivalents en bâtonnet ; B : Métaphase II ; C : Métaphase III (quatre noyaux au stade métaphase ; D : Deux grains de pollen nouvellement formés avec des chromosomes au stade métaphase ; E : Grain de pollen germé avec deux noyaux à l'intérieur ; F : Grain de pollen germé avec un noyau à l'intérieur du grain de pollen et un autre dans le tube pollinique. Les mêmes configurations ont été plus ou moins observées pour toutes les populations étudiées. Noter le type tricolpate des grains de pollen (E). Barre d'échelle = 10µm

Comme déjà souligné dans la section précédente, pour tout le matériel étudié, la germination du pollen a lieu bien avant l'anthèse (Figure 26C). Même après l'anthèse, la colonne staminale recouvrant le pistil reste totalement cachée à l'intérieur de la carène qui est transformée en une boîte hermétiquement fermée, ce qui suggère une cleistogamie complète et un niveau élevé de consanguinité (homozygotie totale) dans le matériel étudié d'*E. pinnata*.

III.5. Divergence évolutive

La matrice alignée de 25 séquences (4 séquences Genbank d'*Ebenus pinnata*, 10 séquences nouvellement obtenues d'*E. pinnata*, 9 séquences d'autres espèces d'*Ebenus*, 2 séquences du genre *Taverniera* (*T. aegyptiaca* et *T. multinoda*) utilisées comme groupe externe) compte 704 sites. L'arbre phylogénétique bayésien (Figure 30) est très cohérent avec l'arbre du maximum de vraisemblance (non montré), les deux ayant des branches internes bien

soutenues. Les séquences d'*Ebenus* se répartissent en trois clades : un pour les séquences d'*E. pinnata*, un pour *E. stellata* seule, et un troisième composé des huit espèces d'*Ebenus* restantes ; ce dernier comprend deux groupes frères : un pour la paire *E. armatagei* et *E. cretica*, le second pour les six espèces restantes : *E. cappadocica*, *E. lagurioides*, *E. longipes*, *E. sibthorpii* et *E. reesei* (Figure 30). Des résultats très concordants ont été obtenus en utilisant les séquences matK de Genbank. Les observations les plus importantes à retenir de cette phylogénie (Figure 30) sont les longueurs des branches au sein du groupe *E. pinnata* qui sont du même ordre que celles du groupe *E. lagurioides* et de ses sœurs (espèces turques d'*Ebenus*). Les distances (nombre de différences de bases) entre les séquences d'*E. pinnata* varient de 0 à 6, ce qui est similaire ou même supérieur à celles du groupe d'*E. lagurioides* et de ses sœurs (1-4 différences de bases) (Tableau 11). Au sein du groupe *E. pinnata*, la séquence la plus divergente est *E. pinnata* 2 (4-6 différences de bases) (Tableau 11).

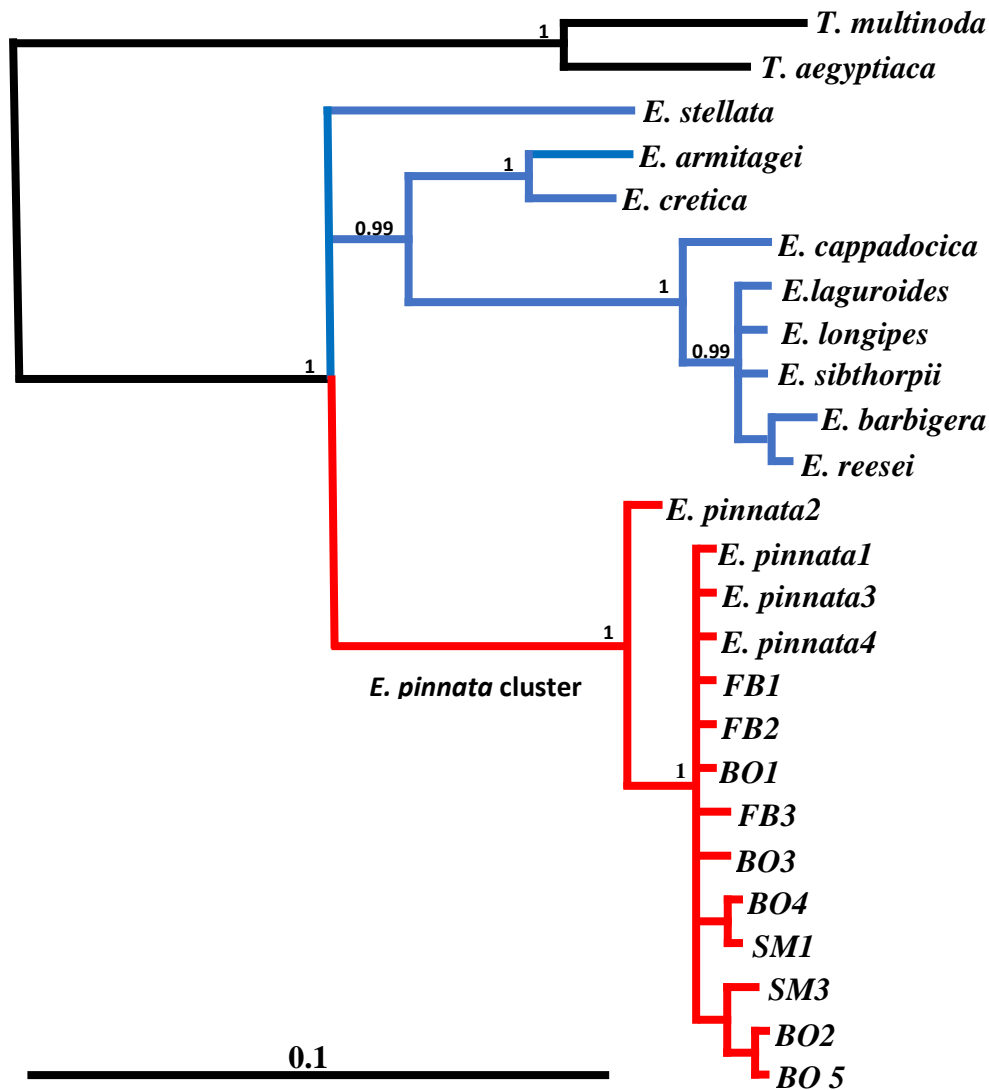


Figure 30: Arbre phylogénétique bayésien montrant les relations des séquences ITS d'*Ebenus pinnata* et d'autres espèces d'*Ebenus*. *Taverniera aegyptiaca* et *T. multinoda* constituent le groupe externe. FB1-3 : Séquences du groupe C1 ; BO1-5 : Séquences du groupe C2 ; SM1-SM3 : Séquences du groupe C3 ; *E. pinnata* 1-4 : Séquences GenBank. Au-dessus des branches internes se trouvent les valeurs des probabilités postérieures. Voir Tableau 11 pour les valeurs des distances par paire.

Tableau 11: Estimations de la divergence évolutive par paire entre les séquences ITS1-ITS2 des espèces du genre *Ebenus*. La divergence est exprimée en nombre de différences de bases. Toutes les positions contenant des lacunes et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait un total de 602 positions dans l'ensemble de données finales. Les séquences d'*E. pinnata* nouvellement obtenues sont FB1-3 (Groupe C1), BO1-5 (Groupe C2), SM1-SM3 (Groupe C3). Toutes les autres séquences sont obtenues à partir de GenBank (voir Matériaux et Méthodes pour les références des séquences). *Taverniera aegyptiaca* et *T. multinoda* sont le groupe externe utilisé dans l'inférence phylogénique (Figure30). Noter la similarité des distances au sein du groupe de séquences d'*E. pinnata* (vert) avec celles entre certaines autres espèces d'*Ebenus* reconnues (jaune). L'espèce la plus proche d'*E. pinnata* est ici *E. armitagei* (en gras).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	<i>E. pinnata</i> 1																								
2	<i>E. pinnata</i> 2	4																							
3	<i>E. pinnata</i> 3	0	4																						
4	<i>E. pinnata</i> 4	0	4	0																					
5	FB1	0	4	0	0																				
6	FB3	1	5	1	1	1																			
7	FB4	0	4	0	0	0	1																		
8	BO1	0	4	0	0	0	1	0																	
9	BO2	1	5	1	1	1	2	1	1																
10	BO3	1	5	1	1	1	2	1	1	2															
11	BO4	1	5	1	1	1	2	1	1	2	2														
12	BO5	1	5	1	1	1	2	1	1	0	2	2													
13	SM1	1	5	1	1	1	2	1	1	2	2	0	2												
14	SM3	2	6	2	2	2	3	2	2	1	3	3	1	3											
15	<i>E. cappadocica</i>	40	38	40	40	40	41	40	40	39	41	41	39	41	40										
16	<i>E. laguroides</i>	41	39	41	41	41	42	41	41	40	42	42	40	42	41	7									
17	<i>E. longipes</i>	42	40	42	42	42	43	42	42	41	43	43	41	43	42	8	1								
18	<i>E. sibthorpii</i>	41	39	41	41	41	42	41	41	40	42	42	40	42	41	8	1	2							
19	<i>E. barbiger</i>	42	40	42	42	42	43	42	42	43	43	43	43	43	44	10	3	4	4						
20	<i>E. reesei</i>	42	40	42	42	42	43	42	42	41	43	43	41	43	42	8	1	2	2	2					
21	<i>E. armitagei</i>	30	28	30	30	30	31	30	30	29	31	31	29	31	30	31	30	30	30	33	31				
22	<i>E. cretica</i>	33	31	33	33	33	34	33	33	32	34	34	32	34	33	29	28	29	28	31	29	11			
23	<i>E. stellata</i>	34	32	34	34	34	35	34	34	33	35	35	33	35	34	38	37	38	38	40	38	30	30		
24	<i>T. aegyptiaca</i>	76	74	76	76	76	77	76	76	75	77	75	75	75	76	79	73	74	74	76	74	72	72	75	
25	<i>T. multinoda</i>	74	72	74	74	74	75	74	74	73	75	73	73	73	74	78	72	73	73	75	73	70	70	73	16

III.6. Activité antioxydante

Les capacités antioxydantes des extraits étudiés ont été évaluées par deux méthodes in vitro : le test de piégeage du radical libre DPPH et le test du pouvoir réducteur. Les résultats sont présentés dans le Tableau 12.

Dans nos résultats, l'extrait d'*E. pinnata* provenant de la zone semi-aride (échantillon 3) avait statistiquement ($P < 0,05$) la valeur la plus élevée en contenu phénolique total ($56,89 \pm 0,46$ mg GAE/g d'extrait sec), suivi par les échantillons 1 et 2 avec des concentrations similaires. L'échantillon 3 a également exprimé la meilleure activité de piégeage ($95,67 \pm 2,02$ mg GAE/g d'extrait sec) et le meilleur pouvoir réducteur ($25,88 \pm 0,26$ mg GAE/g d'extrait sec), suivi de l'échantillon subhumide et de l'échantillon humide. Dans l'analyse des clusters (Figure 31), l'échantillon 'semi-aride' s'est comporté comme un groupe éloigné par rapport aux échantillons 'humides' et 'sub-humides' plus proches entre eux.

III.7. Activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne présentés dans le Tableau 12 ont révélé que tous les extraits étudiés étaient potentiellement efficaces pour inhiber la croissance microbienne. Bien que l'analyse statistique n'ait pas montré de différence significative entre les trois extraits, l'échantillon semi-aride semble plus actif contre les quatre microorganismes testés, à savoir *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* résistant à la méthicilline, *Vibrio cholera* et *Salmonella typhi* avec des diamètres d'inhibition (DI) de $10,50 \pm 1,50$, $10,33 \pm 0,58$, $11,75 \pm 3,89$ et $11,77 \pm 1,36$ mm, respectivement. D'autre part, l'échantillon sub-humide tend à être plus efficace contre *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, avec des DI de $12,00 \pm 1,41$ et $11,75 \pm 0,35$ mm, respectivement. Le dendrogramme de l'analyse en grappes (CAH) basé sur les données du Tableau 12 est présenté dans la Figure 31.

Tableau 12: Comparaison des activités antioxydante et antibactérienne de trois échantillons d'extraits éthanoliques d'*Ebenus pinnata* provenant de différents étages climatiques. Pour chaque paramètre, les valeurs sont exprimées sous forme de Min-Max (ligne supérieure) et de Moyenne \pm écart-type (ligne inférieure). Les lettres majuscules différentes indiquent des différences significatives entre les valeurs moyennes (test LSD, $\alpha = 0,01$ pour les paramètres antioxydants et $\alpha = 0,05$ pour l'activité antibactérienne, avec C>B>A). TPC : teneur totale en polyphénols ; DPPH : activité de piégeage des radicaux ; RP : dosage du pouvoir réducteur.

		Échantillon 1 (Humide)	Échantillon 2 (Subhumide)	Échantillon 3 (Semiaride)
Activité Antioxydante	Paramètre			
	TPC (mg EAG/g EXT)	50.32-51.33 50.79 \pm 0.51 A	50.93-53.02 52.04 \pm 1.05 A	56.49-57.40 56.89 \pm 0.46 B
	DPPH (mg EAG/g EXT)	68.62-72.74 71.18 \pm 2.24 A	82.93-88.56 86.39 \pm 3.02 B	93.53-97.54 95.67 \pm 2.02 C
	RP (mg EAG/g EXT)	10.27-12.52 11.09 \pm 1.24 A	16.45-17.94 17.21 \pm 0.75 B	25.64-26.16 25.88 \pm 0.26 C
Activité Antibacterienne	Souche			
	<i>Escherichia coli</i>	10-13 11.50 \pm 2.12 A	11-13 12.00 \pm 1.41 A	10-13 11.50 \pm 2.12 A
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10-10.4 10.20 \pm 0.28 A	8.5-10 9.50 \pm 0.87 A	9-12 10.50 \pm 1.50 A
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.8-11 9.90 \pm 1.56 A	11.5-12 11.75 \pm 0.35 A	8.5-10 9.25 \pm 1.06 A
	Methicillin-resistant <i>S.aureus</i> (MRSA)	9-10.4 9.80 \pm 0.72 A	9-10 9.60 \pm 0.53 A	10-11 10.33 \pm 0.58 A
	<i>Vibrio cholerae</i>	9-10 9.50 \pm 0.71 A	8-11.2 9.60 \pm 2.26 A	9-14.5 11.75 \pm 3.89 A
	<i>Salmonella typhi</i>	9.6-11 10.53 \pm 0.81 A	8.9-13 11.30 \pm 2.14 A	10.3-13 11.77 \pm 1.36 A

¹ Exprimé en diamètre (mm) de la zone d'inhibition.

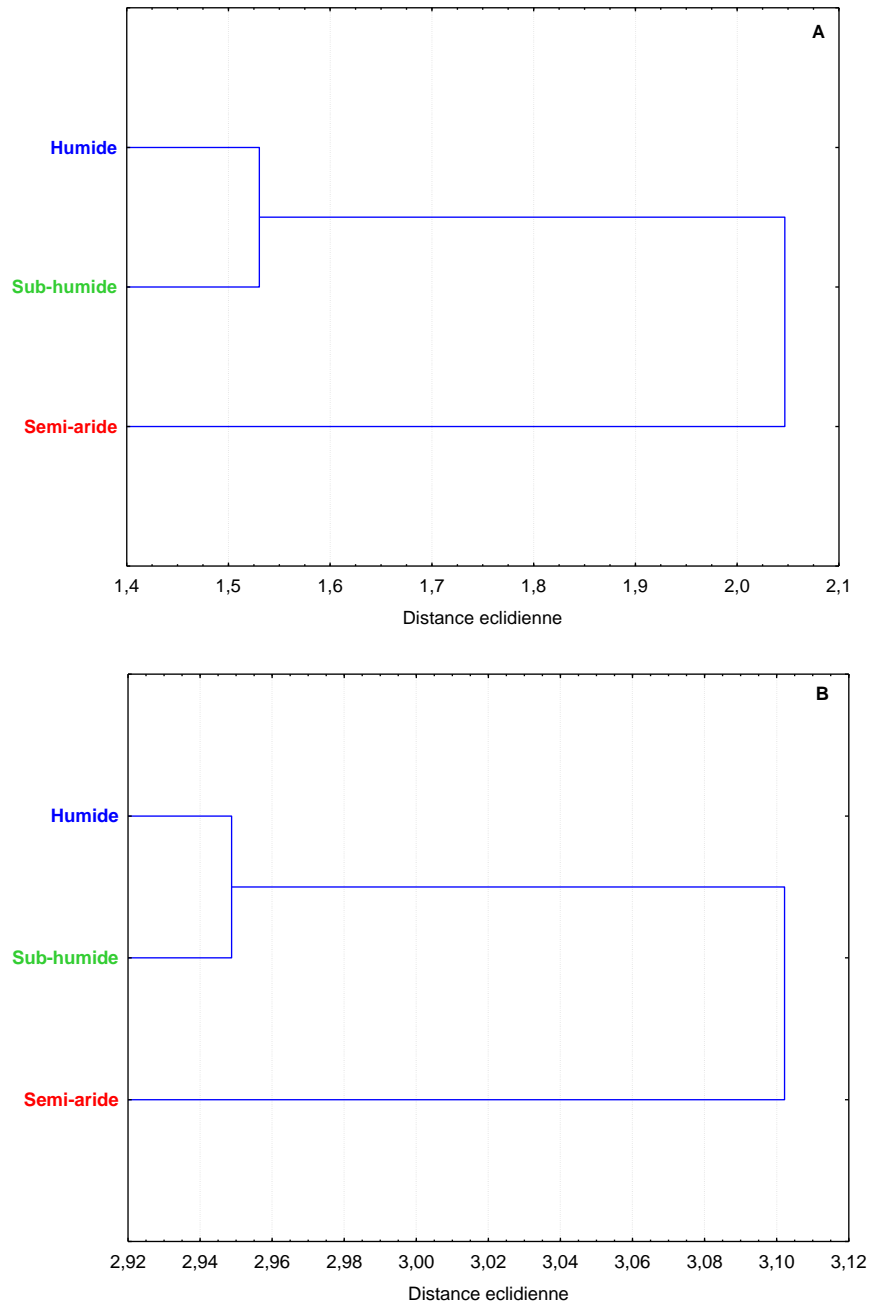


Figure 31: Analyse des activités antioxydante et antibactérienne de trois écotypes d'*Ebenus pinnata* provenant de différents étages climatiques. A. Activité antioxydante ; B. Activité antibactérienne. Source des données dans le tableau 12.

Chapitre IV : Discussion

IV. Discussion

La présente étude apporte les premiers résultats détaillés sur la taxonomie d'*E. pinnata* Ait. Les aspects suivants ont été pris en compte : la distribution géographique, l'écologie, l'analyse multivariée de la morphologie, la taille et la fertilité du pollen, le système de reproduction (cléistogamie), la cytogénétique, la phylogénie et l'évolution, l'activité antioxydante et l'activité antimicrobienne. Trois groupes taxonomiques principaux ont été révélés sur la base de la morphologie multivariée, corroborés par l'écologie, la morphologie du pollen, la caryomorphologie mais avec peu de divergence moléculaire. La discrimination taxonomique multivariée dénote un isolement reproductif, soutenu par le système de reproduction cléistogame. Toutes ces observations et la divergence moléculaire limitée suggèrent fortement que nous sommes devant un cas de spéciation en cours. Plus de détails seront exposés dans les sections suivantes.

IV.1. Distribution géographique, écologie et pression de sélection

Les taxons endémiques peuvent être classés en endémiques autochtones, endémiques allochtones, reliques taxonomiques, reliques biogéographiques, néoendémiques et paléoendémiques (Morrone, 2008). Selon les conclusions de Kaveh et Kazampour-Osaloo (2015), *E. pinnata* est apparu au cours du pliocène (5,33-2,58 Ma), avec l'Afrique du Nord étant l'aire ancestrale la plus probable (Kaveh et al., 2015). Ainsi, *E. pinnata* peut être classé comme un taxon néoendémique probablement autochtone et relativement récent. Malgré l'adaptation de ses fruits à l'anémochorie, son aire de distribution est limitée à la partie tellienne de l'Afrique du Nord (Figure 19), et ce pour des raisons écologiques vraisemblablement. *E. pinnata* ne supporte pas une sécheresse excessive et prolongée ni le gel. C'est pourquoi on ne le trouve pas (ou seulement occasionnellement) dans les hautes plaines, au-delà de 1200m d'altitude, et dans les milieux sahariens. Il est également absent dans le littoral constantinois, correspondant à la zone la plus arrosée d'Algérie probablement dû au caractère xérophyte de la plante. Même à l'échelle d'une population, la pression de sélection semble être très forte comme le suggère l'unicité morphologique de chaque population (Figure 20B) et l'absence de croissance des graines lors de semis expérimentaux, même dans leurs environnements d'origine.

IV.2. Xérophilie

De nombreux auteurs considèrent les membres du genre *Ebenus* comme des xérophytes (Vrachnakis et al., 2005 ; Syros et al., 2006 ; Vrachnakis et al., 2008 ; Hegazy et

al., 2010a ; Hegazy et al., 2010b). Comme déduit de la bibliographie (par exemple Fahn et Cutler, 1992 ; De Micco et Aronne, 2012), parmi les caractères xérophiiles montrés par *E. pinnata* figurent une rosette de feuilles développées, la réduction de la surface foliaire, la réduction du nombre de feuilles caulinaires avec des folioles étroites et parfois enroulées, la structure foliaire, des tiges et des pétioles verts, une pilosité épaisse sur toutes les parties de la plante (à l'exception de la corolle qui est extrêmement réduite), des tiges striées, de longues dents de calice brillantes et ciliées entourant la corolle réduite. Le groupe C2 (associé au climat semi-aride) est relativement beaucoup plus développé (en termes de taille de la plante, de nombre de fleurs (graines) et de taille des graines) que le groupe C3 (associé au stade subhumide) et encore plus que le groupe C1 (associé au stade humide) (Tableau 5). Cette meilleure adaptation à l'aridité peut être considérée comme un indice de xérophilie.

IV.3. Défense contre les stress abiotiques et biotiques

Le rôle des poils chez les plantes est multiple. Ces derniers contribuent à protéger la plante contre les températures extrêmes, les radiations UV et le stress hydrique (e.g. Xiao et al., 2017 ; Karabourniotis et al., 2020), contre les insectes et les pathogènes (e.g. Levin, 1973 ; Xing et al., 2017) et, de manière intéressante, à absorber l'eau atmosphérique (Grammatikopoulos et al., 1994 ; Pina et al., 2016 ; Shreel et al., 2020 ; Waseem et al., 2021). Il semble que ce soit par ce mécanisme d'absorption de l'eau atmosphérique que *E. pinnata* fait face au manque d'eau en début de saison estivale bien que ses racines ne s'enfoncent pas spécialement dans le sol. Aucune attaque d'insectes ou de pathogènes n'a été observée sur les feuilles, les inflorescences et les graines matures d'*E. pinnata* (obs. pers.), ce qui dénote l'efficacité de sa pilosité contre les parasites. Cependant, des fourmis noires ont été remarquées en train de collecter et de consommer ses fruits mûrs (obs. pers.). Les plantes d'*E. pinnata* n'ont aucune défense contre les animaux herbivores puisqu'elles sont aussi palatables pour les moutons et les chèvres que d'autres légumineuses fourragères (obs. pers.).

IV.4. Mécanisme de dispersion des graines

Les fruits matures d'*E. pinnata* sont rapidement caduques et réduits à une très petite gousse spongieuse monosperme, indéhiscente et enfermée dans le tube du calice très poilu avec de longues dents ciliées. Il s'agit d'un cas d'adaptation à l'anémochorie (dispersion des graines par le vent). Cette structure, avec des dents ciliées longues et étirées, rappelle le pappus des plantes Asteraceae. Le pappus des Astéracées est une modification de l'ensemble du calice du fleuron (Basu et al., 2014) alors que chez *Ebenus* seules les dents du calice qui

sont beaucoup plus longues que le tube sont impliquées (Aytaç, 2000 ; Aytaç et al., 2015). Ce type de fruit (légumineuse monosperme enfermée dans le tube du calice et les dents ciliées) est également mentionné pour *Dalea mollissima* (Rydb.) Munz (Maddox 1985), une plante légumineuse des déserts d'Amérique du Nord (Bibref, 1812, dans le site du Wildflower center https://www.wildflower.org/plants/result.php?id_plant=DAMO2, consulté le 13 06 2021), et d'autres espèces de *Dalea* (Woods et Hughes, 2013) notamment chez *D. pinnata* (Walter ex J.F.Gmel.) Barneby (Barneby, 1977 dans NYBG Steere Herbarium <http://sweetgum.nybg.org/science/world-flora/monographs-details/?irn=16220>, consulté le 13 06 2021). Cette structure est également présente chez de nombreuses espèces du genre *Trifolium* (Quézel et Santa, 1962 ; Van der Pijl, 1982). Cette adaptation à l'anémochorie par la réduction du fruit et l'allongement des dents du calice est unique au genre *Ebenus* dans la tribu des Hedysareae (Huber-Morath, 1970 ; Çelebi et al., 2009 ; Amirahmadi et al., 2014 ; Aytaç et al., 2015 ; Duan et al., 2015) y compris son genre frère le plus proche *Taverniera* dans lequel la gousse est beaucoup plus grande avec 1-3 éléments épineux ou pubescents, non enfermés dans le calice, les dents du calice sont plus courtes que la moitié du tube (Boolos, 1999 ; Choi et Ohashi, 2003). Les fruits d'*E. pinnata* (gousses enfermées dans le calice) continuent de flotter à la surface de l'eau, ce qui suggère une adaptation à l'hydrochorie également (obs. pers.). En plus de l'anémochorie, d'autres mécanismes, tels que la myrmécochorie, l'endozoochorie et l'exozoochorie (Shivanna et Tandon, 2014) sont également possibles puisque les fruits d'*E. pinnata* sont collectés par les fourmis, consommés par les herbivores et ont une base pointue, un calice poilu et de longues dents ciliées qui les rendent aptes à adhérer aux fourrures animales (obs. pers.). Cette structure (base pointue, calice poilu et gousse spongieuse) est également adaptée pour s'enfoncer dans le sol et conserver l'humidité pendant le processus de germination.

IV.5. Système de reproduction et spéciation

On parle de cléistogamie (littéralement "mariage fermé") lorsqu'une plante produit des fleurs autopollinisées fermées en permanence (Culley et Klooster, 2007). Nos observations ont révélé que chez les fleurs d'*E. pinnata*, la pollinisation a lieu bien avant l'anthèse. Ce type de cléistogamie est appelé cléistogamie de pré-anthèse (Lord, 1981 ; Culley et Klooster, 2007 ; Baskin et Baskin, 2014), pollinisation des bourgeons (par exemple Cabin et al., 1996 ; Stewart et al., 1996 ; et littérature générale), ou cléistogamie des bourgeons (Novoselova, 2003). Chez *E. pinnata*, cette cléistogamie de pré-anthèse ou de bourgeon est doublée d'une caractéristique que nous pouvons appeler " cléistogamie de la carène ", car les anthères

recouvrant le stigmate sont hermétiquement enveloppées dans la carène transformée en une loge qui ne s'ouvre jamais, même après l'anthèse, empêchant ainsi la pollinisation croisée des fleurs. Ces phénomènes (cléistogamie complète de la fleur, cléistogamie complète du bourgeon, cléistogamie complète de la carène) sont des mécanismes d'autopollinisation assurant un fort isolement reproductif entre les lignées, conduisant automatiquement à une spéciation sympatrique rapide (Zohary, 1999) s'ils sont associés à une réponse adaptative (Macnair, 1989). Sur la base de la structure de la fleur (corolle réduite enfermée dans le calice), on s'attend à ce que les autres espèces d'*Ebenus* soient également autopollinisatrices. À l'exception d'*E. pinnata*, *E. cretica*, *E. sibthorpii*, *E. armitagei* et *E. stellata*, les 14 autres espèces d'*Ebenus* sont limitées à la Turquie (Aytaç et Yildirim, 2018) et leurs aires de répartition se chevauchent ou sont très proches (Bayrakdar et al., 2010). Ces observations sont en accord avec l'estimation de Kaveh et Kazampour-Osaloo (2015) suggérant une diversification très récente et rapide au sein du genre *Ebenus* au cours du quaternaire en Turquie. Le système de reproduction par autopollinisation peut avoir joué un rôle majeur dans l'isolement reproductif et la formation de ces jeunes espèces sympatriques en Turquie. De même, dans des conditions de consanguinité élevée, on s'attend à ce qu'une spéciation cryptique ait lieu dans l'aire de distribution étendue et écologiquement hétérogène d'*E. pinnata*.

IV.6. Traitement taxonomique et évolution

Les analyses multivariées basées sur la morphologie, résumées par la Figure 20 et la Figure 21, ont révélé une discrimination parfaite entre les principaux groupes taxonomiques C1, C2 et C3. C'est exactement ce qui est attendu pour des groupes divergents et génétiquement isolés. Sous un régime panmictique et une pression de sélection homogène, les nuages de points multivariés devraient être sous forme de continuums en raison du flux de gènes (introgression) entre les groupes. Les trois principaux groupes (C1, C2 et C3) sont non seulement bien séparés mais aussi corrélés chacun avec un étage climatique (humide pour C1, subhumide pour C3 et semi-aride pour C2) (Figure 21). La discrimination morphologique entre les groupes est très probablement une conséquence de l'isolement génétique dû au système de reproduction cléistogame associé à une adaptation différentielle à l'environnement écologique (essentiellement le climat). Les génotypes semblent être étroitement associés à leur type d'environnement car ils ne se développent pas dans des conditions expérimentales, avec la tendance des individus de la population à se regrouper dans les nuages de points multivariés (Figure 20B).

Cette discrimination morphologique (Figs. 20-21 et Tableau 5), couplée à une association écologique (Figure 21), est corroborée par des différences palynologiques (Tableau 6) et caryologiques (Tableau 7 et Tableau 8, Figure 27 et Figure 28) par rapport à celles discriminant les autres espèces acceptées d'*Ebenus* (Tabs. 7, 8 et 9). Etant donné cette distinction morphologique, palynologique et caryologique, couplée à l'isolation génétique claire due à un système de reproduction cléistogame complet, les groupes taxonomiques révélés dans la présente étude peuvent être candidats à un rang d'espèce. A l'exception du morphotype à fleurs blanches, tous les autres groupes ne peuvent être distingués au premier coup d'œil, les différences n'ont été révélées que par la morphométrie et la caryomorphologie, c'est pourquoi nous choisissons de les considérer comme des espèces cryptiques. Moléculairement, ces espèces cryptiques révélées ici au sein du taxon *E. pinnata* ne sont pas très divergentes (Figure 30 et Tableau 10). Cela signifie que ces " espèces cryptiques " sont très jeunes, comme la plupart des espèces turques d'*Ebenus* (Kaveh et Kazampour-Osaloo, 2015). Les populations morphologiquement diversifiées d'*E. pinnata* ne diffèrent cependant pas substantiellement dans les séquences ITS, connues pour présenter un polymorphisme intraspécifique (par exemple *Ebenus cretica*, *Taverniera cuneifolia*, *Hedysarum coronarium*, comme déduit des séquences GenBank), ou même un polymorphisme intrapopulationnel (par exemple Haque et al., 2009 ; Ali et al., 2011) comme c'est le cas pour les populations d'*E. pinnata* (Figure 30).

Dans le groupe C1, associé à l'étage humide, la réduction extrême de l'aile de la corolle (Tableau 5, caractères 38-41), les fleurs blanches (Tableau 5, caractère 36) corrélées avec la couleur verte des tiges, des bractées et des calices (Tableau 5, caractères 31 et 33) (voir aussi Figure 25), les chromosomes relativement plus courts (Tableau 7 et Figure 27) peuvent être considérés comme des apomorphies (états de caractères dérivés). Cette observation suggère que ces traits apomorphes d'*E. pinnata* de l'étage climatique humide peuvent correspondre à une adaptation naissante des formes xérophiiles au milieu humide.

IV.7. Nombre de chromosomes, anomalies méiotiques et fertilité du pollen

Les préparations de méiose ont montré 7 bivalents en métaphase I et 7 chromosomes en métaphase II (Figure 29) correspondant au nombre de chromosomes de $2n = 2x = 14$, avec un nombre de base $x = 7$. En métaphase I, les chromosomes sont toujours appariés en 7 bivalents avec 5 en anneaux et 2 linéaires. Aucun multivalent n'a été observé, et la ségrégation chromosomique à l'anaphase-télophase I était régulière puisque la métaphase II était toujours avec $n = 7$.

Ce nombre de chromosomes de $2n = 2x = 14$ ($x = 7$) a déjà été rapporté pour du matériel provenant du Maroc (Molero et al., 1986) et d'Algérie (Gadoum et Hamma, 2016 ; Hadawat et Madani, 2022). Sur les caryogrammes de la Figure 27, il y a deux paires de chromosomes avec deux paires de grands satellites (ou peut-être des chromosomes scindés en deux par leurs centromères ?). Les 4 chromosomes supplémentaires du $2n = 18$ rapporté par Parra et al. (1999) pour une population marocaine pourrait correspondre à une erreur de comptage induite par les 4 grands satellites (ou bras de chromosomes isolés) qu'on aurait pris pour des chromosomes.

Les anomalies de méiose étaient souvent absentes, la cytomixie n'a été observée que dans un très petit nombre de cas. Les taux de fertilité du pollen étaient élevés pour toutes les fleurs évaluées (89,01-98,71%). Selon Siddiqui et Alrumman (2022), la cytomixie est un phénomène induit à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux ; elle se produit chez les mutants, les hybrides, les aneuploïdes et les plantes stressées (chaleur, froid, sécheresse, parasites et pollution), entraînant une réduction de la fertilité du pollen. Dans notre cas, de très rares cytomixes et anomalies associées ont été rencontrées lors du criblage des préparations pour la méiose, ce qui est en accord avec les taux de fertilité polliniques élevés évalués (89,01-98,71 %). De ce point de vue, on peut déduire que les populations locales d'*E. pinnata* sont en parfait équilibre avec leur environnement, sans qu'aucune aberration ne se produise du fait de mutations, d'aneuploïdies ou d'hybridations entre génotypes divergents (Zemouri et al., 2023).

IV.8. Activités antioxydantes et antimicrobiennes

Dans la présente étude, les activités antioxydantes et antimicrobiennes des extraits d'éthanol d'*Ebenus pinnata* ont révélé un potentiel intéressant qui pourrait être utilisé comme source médicinale alternative. Les rapports concernant les substances phytochimiques et les activités biologiques d'*E. pinnata* sont très rares. Dans l'étude d'Abreu et al. (2007), la mesure de l'activité antioxydante de l'extrait de méthanol des parties aériennes d'*E. pinnata* collectées en Tunisie à l'aide de trois tests différents (activités de piégeage des radicaux DPPH et ABTS, et dosage du pouvoir réducteur) a révélé un potentiel intéressant. Les auteurs ont lié cette activité à la présence de quatre composés phénoliques: Ombuoside, kaempferol-3-O-rutinoside, rutine et catéchine. Une autre étude, en Algérie, portant sur les paramètres antioxydants des extraits de méthanol de neuf espèces, Nouioua et Gaamoune (2018) ont rapporté que les extraits d'*E. pinnata* montrent la plus grande activité de piégeage du radical DPPH (IC₅₀ de 12,25±2,80 µg/mL) par rapport à huit autres taxons de l'est du pays. Ils ont

également rapporté que cette plante contenait $8,57 \pm 0,16$ mg GAE/g d'extrait sec de PTC. Ces dernières performances sont très faibles par rapport à celles obtenues dans la présente étude (Tableau 11).

Le pouvoir antioxydant des extraits de l'échantillon du semi-aride s'est avéré plus fort que celui des deux autres échantillons pour les deux tests. Sur la base de ces résultats, on peut supposer que la teneur élevée en composés phénoliques de l'échantillon a pu contribuer aux capacités antioxydantes observées. Les présents résultats sont en accord avec d'autres études faisant état d'une forte corrélation entre les composés phénoliques totaux et l'activité antioxydante (Zhang et Wang, 2009 ; Kumar et al., 2014).

À la lumière des résultats antimicrobiens, il a été observé que tous les extraits ont montré une puissance comparable à la concentration analysée. Les principales causes des légères différences observées dans ces résultats sont les divers bio-contenus des échantillons analysés qui ont été récoltés à différents étages bioclimatiques (humide, sub-humide et semi-aride). Mais parfois, la même espèce peut avoir des valeurs bioactives différentes car de nombreux facteurs sont responsables de ces changements, tels que la période de récolte, la disponibilité de l'eau, les facteurs environnementaux (climat et altitude) et technologiques (Ahuja et al., 2010 ; Rabeta et Nur Faraniza, 2013). En effet, Kabtni et al. (2020) ont étudié l'influence des variations climatiques sur la composition phénolique et l'activité antioxydante des populations de *Medicago minima* sélectionnées à partir de différentes provenances en Tunisie. Ils ont conclu que les teneurs phénoliques les plus élevées sont observées dans les populations de la zone semi-aride avec un climat BSK (Climat semi-arid froid) et une altitude supérieure à 550 m, ce qui est en accord avec les résultats de cette étude. L'accumulation d'un niveau plus élevé de composés phénoliques et l'expression de la meilleure activité antioxydante pour *E .pinnata* récolté dans un climat semi-aride, caractérisé par des températures élevées et de faibles précipitations, peuvent être liées à des stress hydriques et thermiques (de Abreu et Mazzafera, 2005 ; Al-Huqail et al., 2020).

Conclusion générale

La présente étude porte sur la diversité taxonomique chez la xérophyte nord-africaine *Ebenus pinnata* Ait. (Fabaceae) avec un focus sur les populations du Nord-Est algérien. Trois groupes morphologiques plus ou moins hétérogènes ont été révélés par des analyses multivariées, corroborées par la caryomorphologie, la taille des grains de pollen et l'activité antioxydante. Ces différences sont légères mais significatives, du même ordre que celles révélées pour de nombreuses autres espèces turques acceptées. Le groupe C1 (tiges de 17.4-107.8 cm de haut, 1-27 tiges/plante, fleurs blanches ou roses, ailes de 1.00-1.7 mm de long, 2-87 fleurs/inflorescence, grains de pollen 16.29-23.04 x 10.41-15.51 μ m, 2n = 14 chromosomes, chromosomes 2. 18-4.22 μ m de long, TPC 50.79 \pm 0.51, DPPH 71.18 \pm 2.24, RP 11.09 \pm 1.24 est associé au stade de climat humide ; le groupe C2 (tiges 19.5-147.5cm de haut, 1-34 tiges/plante, fleurs roses, ailes 2.2-3.2mm de long, 2-93 fleurs/inflorescence, grains de pollen 16. 27-22.76 x 10.40-15.78 μ m, 2n = 14 chromosomes, chromosomes 2.58-5.58 μ m de long, TPC 56.89 \pm 0.46, DPPH 95.67 \pm 2.02, RP 25.88 \pm 0.26) est associé à l'étage climatique semi-aride ; le groupe C3 (tiges 10.4-165.7cm de haut, 1-29 tiges/plante, fleurs roses, ailes 1. 7-3.7mm de long, 2-75 fleurs/inflorescence, grains de pollen 15.18-23.26 x 10.25-17.13 μ m, 2n = 14 chromosomes, chromosomes 2.51-5.62 μ m de long, TPC 52.04 \pm 1.05, DPPH 86.39 \pm 3.02, RP 17.21 \pm 0.75) est associé au stade climatique sub-humide. La différenciation multivariée significative (corroborée par les tailles des grains de pollen et des chromosomes) suggère un isolement reproductif des groupes, ce qui est fortement soutenu par le système de reproduction cléistogame complet. Les séquences ITS1-ITS2 des populations d'*E. pinnata* ne sont pas très divergentes (0-6 différences de base) mais elles sont du même ordre que celles rapportées pour d'autres espèces d'*Ebenus* turques acceptées (*E. laguroides*, *E. longipes*, *E. sibthorpii*, *E. barbiger*, *E. reesei*) (1-4 différences de base). Tous ces résultats suggèrent fortement que nous sommes devant un cas de spéciation en cours. Etant donné la différenciation morphologique et caryologique légère mais significative entre les groupes C1, C2 et C3, leur association écologique étroite (due à une pression de sélection naturelle forte) et leurs séquences ITS peu divergentes, nous proposons de considérer ces nouveaux groupes taxonomiques comme des espèces cryptiques apparues récemment. De plus, les plantes associées au stade de climat semi-aride (groupe C2) semblent en moyenne plus prospères que le groupe C3 (associé au stade de climat sub-humide) et encore plus que le groupe C1 (associé au stade de climat humide). Ces observations confirment la nature xérophile des plantes d'*E. pinnata* déjà dénotée par leur morphologie, leur anatomie foliaire et leur phénologie. Les caractères les plus apomorphes (la plus petite biomasse végétale, la présence de fleurs blanches, l'extrême réduction de l'aile, les chromosomes les plus courts) se retrouvent dans le

groupe C1. Cette dernière observation suggère que nous sommes devant une adaptation naissante des plantes *E. pinnata* (associées à des stades climatiques semi-arides ou sub-humides) au stade climatique humide.

Il est important de retenir aussi que le faible taux d'anomalies méiotiques et de la fertilité pollinique dénotent une absence d'un impact environnemental négatif et absence d'hybridations entre cytotypes divergents. Les extraits des parties aériennes de plantes des trois groupes ont également montré une significative activité antibactérienne en engendrant des zones d'inhibition allant de de 8,5 à 14,5 mm.

Pespectives de recherche

Il serait intéressant d'élargir cette étude à l'échelle de toute l'aire de distribution de *Ebenus pinnata*, affiner l'étude caryomorphologique, utiliser d'autres marqueurs moléculaires pour la phylogénie et analyser la structure génétique des populations par les marqueurs SSR. La présence de la cléistogamie mérite d'être vérifiée chez les autres membres du genre *Ebenus*.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abidin S.Z.U., Munem A., Khan R., Batiha G.E.S., Amhad M., Zafar M., Khalil A.A.K., Hetta H.F., Mahmoud M.H., Sami A., et Bhatti M.Z. (2021). Ethnoveterinary botanical survey of medicinal plants used in Pashto, Punjabi and Saraiki Communities of Southwest Pakistan. *Veterinary Medicine and Science*, 1–18. DOI: <https://doi.org/10.1002/vms3.582>
- Abreu P.M., Braham H., Ben Jannet H., Mighri Z., Matthew S. (2007). Antioxidant compounds from *Ebenus pinnata*. *Fitoterapia* 78: 32–34. Doi: [10.1016/j.fitote.2006.09.013](https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.09.013)
- Ahangarian S., Kasampour-Osaloo S. et Maassoumi A.A. (2007). Molecular phylogeny of the tribe Hedysareae with special reference to *Onobrychis* (Fabaceae) as inferred from nrDNA ITS sequences. *Iranian J. Bot.* 13: 64–74.
- Ahuja I., De Vos R.C., Bones A.M. et Hall R.D. (2010). Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science* 15(12): 664–674. DOI: [10.1016/j.tplants.2010.08.002](https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.002)
- Aksoy H., Ünal F. et Aytaç Z. (2001). Karyological study on four endemic *Ebenus* L. taxa (Leguminosae) in Turkey. *Caryologia* 54(4): 307–311. Doi: [10.1080/00087114.2001.10589241](https://doi.org/10.1080/00087114.2001.10589241)
- Al-Huqail A., El-Dakak R.M., Sanad M.N., Badr R.H., Ibrahim M.M., Soliman D. et Khan F. (2020). Effects of climate temperature and water stress on plant growth and accumulation of antioxidant compounds in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) leafy vegetable. *Scientifica* (Cairo). 2020 Feb 27; 2020: 3808909. DOI: [10.1155/2020/3808909](https://doi.org/10.1155/2020/3808909)
- Ali A.M., Al-Hemaid F.M.A., Lee J., Choudhary R.K., Naif A., Al-Harbi1 N.A. et Kim S.Y. (2011). Genetic diversity assessment of *Diplocyclos palmatus* L. C Jeffrey from India using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *African Journal of Biotechnology* 10(72):16145–16151. Doi: [10.5897/AJB10.2002](https://doi.org/10.5897/AJB10.2002)
- Amirahmadi A., Kazampour-Osaloo S., Moein F., Kaveh A. et Maassoumi A.A. (2014a). Molecular systematics of the tribe Hedysareae (Fabaceae) based on nrDNA ITS and plastid *trnL-F* and *matK* sequences. *Pl. Syst. Evol.* 300:729–747. Doi: [10.1007/s00606-013-0916-5](https://doi.org/10.1007/s00606-013-0916-5)

- Aydemir E.A., Simsek E., Imir N., Göktürk R.S., Yesilada E. et Fiskin K. (2015). Cytotoxic and apoptotic effects of *Ebenus boissieri* Barbey on human lung cancer cell line A549. *Pharmacognosy Magazine*, 11(Suppl 1), S37. DOI: 10.4103/0973-1296.157679
- Aytac Z. (2000). The genus *Ebenus* L. (Leguminose/Fabaceae) in Turkey. *Karaca Arbor. Mag.* 5: 145-171.
- Aytaç Z., Suludere Z. et Pınar M. (2015). Examination of the leaflets hairs and stoma structures with the electron microscope of the genus *Ebenus* L. (Leguminosae) in Turkey. *Bio.Di. Con.* 8 (2): 37–50. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/biodicon/issue/55741/762420>
- Aytaç Z., Ünal. F et Pınar M.N. (2000). Morphological, palynological, and cytotaxonomical study of *Ebenus longipes* Boiss. & Bal. and *E. argentea* Siehe ex Bornm. (Leguminosae) from Turkey. *Isr. J. Plant Sc.* 48: 321–326. Doi: [10.1092/RG77-25TD-F7Y2-8D6X](https://doi.org/10.1092/RG77-25TD-F7Y2-8D6X)
- Aytaç Z. et Yildirim H. (2018). *Ebenus zekiyeae* (Fabaceae), a new species from Turkey. *Annales Botanici Fennici* 55 (4-6): 25–29. Doi: [10.5735/085.055.0104](https://doi.org/10.5735/085.055.0104)
- Aytac Z. (2000). The genus *Ebenus* L. (Leguminose/Fabaceae) in Turkey. *Karaca Arboretum*, 5: 145-171.
- Aytaç Z., Suludere Z. et Pınar M. (2015). Examination of the leaflets hairs and stoma structures with the electron microscope of the genus *Ebenus* L. (Leguminosae) in Turkey. *BioDiCon*8 (2): 37–50.
- 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. DOI: 10.1023/A:1012570007850
- Baskin C.C. et Baskin J.M. (2014). Variation in seed dormancy and germination within and between individuals and populations of a species. In Baskin and Baskin (Editors), *Second Edition, Seeds*, pp.277–373. Academic Press. Doi:[10.1016/B978-0-12-416677-6.00008-1](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416677-6.00008-1)
- Basu S., Zandi P., Cetzal-Ix W. et Sengupta R. (2014). Asteraceae: The sunflower family. Retrieved from <http://www.eoearth.org/view/article/53cd57450cf2d022a359c79b>
- Bayrakdar F., Aytac Z., Suludere Z. et Candan S. (2010). Seed morphology of *Ebenus* L. species endemic to Turkey. *Turk. J. Bot.* 34(4): 283–289.

- Bazos I. et Rivers M.C. (2017). *Ebenus cretica*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T83751984A86136006. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T83751984A86136006.en>. Télécharger le **17 Avril 2018**.
- Bekdouche F., Sahnoune M., Krouchi Y., Achour S., Guemati N. et Derridj A. (2011). The contribution of legumes to post-fire regeneration of *Quercus suber* and *Pinus halepensis* forests in northeastern Algeria. *Rev. Écol. (Terre Vie)*, vol. 66.
- Bektas E., Kaltalioglu K., Sahin H., Turkmen Z. et Kandemir A. (2018). Analysis of phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial properties of some endemic medicinal plants. *Int. j. second. metab.* 5(2): 75–86. Doi: [10.21448/ijsm.392354](https://doi.org/10.21448/ijsm.392354)
- Bhuwan J.C., Vijay J., Archana S.N., Piyush V. et Minky M. (2022). Review on Documented Medicinal Plants used for the Treatment of Cancer; *Current Traditional Medicine* 2022; 8(2): e111021197159. DOI: <https://doi.org/10.2174/2215083807666211011125110>
- Bidak L.M., Kamala S.A., Halmy M.W.A. et Heneidy S.Z. (2015). Goods and services provided by native plants in desert ecosystems: Examples from the northwestern coastal desert of Egypt. *Glob. Ecol. Conserv.* 3: 433–447. Doi: [10.1016/J.GECCO.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2015.02.001)
- Blois M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181(4617): 1199–1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- Boissier E. (1872). *Flora Orientalis: Save Enumeratio Plantarum In Oriente a Græcia et Ægypto ad Indiæ Fines Hucusque Observatarum – Vol. 2. APUD EUMDEM, 65, RUE DE LYON.*
- Boulos L. (1999). *Flora of Egypt. Vol. One (Azollaceae-Oxalidaceae)*. Cairo, Egypt: Al Hadara Publishing. 340pp.
- Braham H., Ben Jannet H., Castedo L. et Mighri Z. (2004). Isolation, for the first time, of a flavonoid glycoside and the (±)-catechin from the aerial parts of *Ebenus pinnata*. *Journal de la Société Chimique de Tunisi*, 6 : 153-160.
- Cabin R.J., Evans A.S., Jennings D.L., Marshall D.L., Mitchell R.J. et Sher A.A. (1996). Using bud pollinations to avoid self-incompatibility: implications from studies of three mustards. *Can. J. Bot.* 74(2): 285–289. Doi: [10.1139/B96-034](https://doi.org/10.1139/B96-034)

- Çelebi A., Açık L. et Aytaç Z. (2009). Biosystematic studies among *Ebenus* L. Species based on morphological, RAPD-PCR and seed protein analyses in Turkey. *Pak. J. Bot.* 41(5): 2477–2486.
- Ceylan R., Katanić J., Gokhan Z., Sanja M., Abdurrahman A., Tatjana B., Snežana S., Vladimir M., Gokalp O.G. et al. (2016). Chemical and biological fingerprints of two Fabaceae species (*Cytisopsis dorycniifolia* and *Ebenus hirsuta*): Are they novel sources of natural agents for pharmaceutical and food formulations? *Ind. Crop. Prod.* 84:254–262. Doi: [10.1016/J.INDCROP.2016.02.019](https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.02.019)
- Chermat, S., Djellouli, Y., Gharzouli, R. 2012: Dynamique régressive de la végétation des hautes plaines Sétifiennes : érosion de la diversité floristique du djebel Youssef (Algérie). *Rev. Écol. (Terre Vie)*, vol. 67.
- Choi B.H. et Ohashi H. (2003). Generic criteria and an infrageneric system for *Hedysarum* and related genera (Papilionoideae-Leguminosae). *Taxon* 52(3): 567–576. Doi: [10.2307/3647455](https://doi.org/10.2307/3647455)
- Cosson M.E. (1857). Itinéraire D'Un Voyage Botanique En Algérie, Entrepris En 1856 Sous Le Patronage Du Ministère De La Guerre (Treizième partie.), *Bulletin de la Société Botanique de France*, 4:5, 473-490.
- Culley T.M. et Klooster M.R. (2007). The cleistogamous breeding system: A review of its frequency, evolution, and ecology in Angiosperms. *Bot. Rev.* 73(1): 1–30. Doi: [10.1663/0006-8101\(2007\)73\[1:TCBSAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2007)73[1:TCBSAR]2.0.CO;2)
- Davis P., Mill R. et Tan K. (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 10 (supplement). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, pp. 381–382.
- De Abreu I.N. et Mazzafera P. (2005). Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(3): 241–248. DOI: [10.1016/j.plaphy.2005.01.020](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2005.01.020)
- De Candolle A.P. (1825). *Mémoires sur la famille des Légumineuses*. A. Belin, Paris. Doi: [10.5962/BHL.TITLE.124031](https://doi.org/10.5962/BHL.TITLE.124031)
- De Micco V. et Aronne G. (2012). Morpho-anatomical traits for plant adaptation to drought. In R. Aroca Editor: *Plant responses to drought stress, from morphological to molecular*

- features. Pp. 37-61. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Doi: [10.1007/978-3-642-32653-0_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-32653-0_2)
- Debeaux M.O. (1894). Flore de la Kabylie du Djurdjura, ou, Catalogue méthodique et raisonné de toutes les plantes vasculaires et spontanées observées jusqu'à ce jour dans cette contrée. Paris : P. Klincksieck.
- Desfontaines R.L. (1798-1799). Flora Atlantica sive historia plantarum quae in Atlante, agro tunetano et algeriensi crescunt. Tomus Primus. Parisiis: Panckoucke.
- Dobignard A. et Chatelain C. (2011). Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord. Vol. 3, Dicotyledonae, Balsaminaceae à Euphorbiaceae. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, hors-série 11b.
- Dobignard A. et Chatelain C. (2012). Index synonymique de la flore d'Afrique du Nord. Vol.4, Dicotyledoneae : Fabaceae - Nymphaeaceae. Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, hors-série 11b.
- Dontas I., Kounadi S., Aligiannis N., Galanos A., Skaltsounis A. et Lelovas P. (2019). Plant extract administration and mild daily exercise increase bone density of ovariectomized rats. In Abstracts of 14th FELASA congress 2019, PC41, p. 157. Laboratory Animals 53(1): 28–203.
- Drapiez P.A.J. (1835). Encyclographie de règne végétal accompagnée de monographies, Volume 4, n° 155, établissement encyclographique, rue de Flandre, Paris, pp. 18.
- DRYFLOR (2016). Plant diversity patterns in neotropical dry forests and their conservation implications. Science 353: 1383–1387.
- Duan L., Wen J., Yang X., Liu, P.L., Arslan E., Ertuğrul K. et Chang Z.Y. (2015). Phylogeny of *Hedysarum* and tribe Hedysareae (Leguminosae: Papilionoideae) inferred from sequence data of ITS, *matK*, *trnL-F* and *psbA-trnH*. *Taxon* 64:49–64. Doi: [10.12705/641.26](https://doi.org/10.12705/641.26)
- Dyer A.F. (1963). The use of lacto-propionic orcein in rapid squash. Methods for chromosome preparations. *Stain Technol.* 38: 85-90. DOI: <https://doi.org/10.3109/10520296309061169>
- eFloras (2008). Publié sur Internet <http://www.efloras.org> [consulté le 02 avril 2018] Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO & Harvard University Herbaria, Cambridge, MA.

- e-Recolnat (2013). Infrastructure Nationale en Biologie et Santé e-ReColNat, collections botaniques. <https://explore.recolnat.org/search/botanique/type=index>. [Consulté le 13 août 2018].
- Fahn A. et Cutler D.F. (1992). Xerophytes. Gebruder Borntraeger, Berlin
- Fazlioglu F. (2018). Phenotypic plasticity of ecotypes across habitats. *Akademik Ziraat Dergisi* 7(2): 253-258. DOI: <http://dx.doi.org/10.29278/azd.476663>
- Fennane M., Ibn Tattou M., Ouyahya A. et El Oualidi J. (2007). Flore vasculaire du Maroc, inventaire et chorologie. Volume 2. *Trav. Inst. Sci., sér. Bot.* 38. Rabat. 1–636
- Gadoum N. et Hamma A. (2016). Etude cytogénétique de l'espèce *Ebenus pinnata* Aiton (Fabaceae) du Golfe de Béjaïa et de la Vallée de la Soummam. Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, Algérie. 58 p. <http://univ-bejaia.dz/dspace/123456789/10254>
- Gandoger M.M. (1908). Flore du littoral méditerranéen du Maroc, *Bulletin de la Société Botanique de France*, 55:7, 561-567.
- Ghanavati F. et Amirabadizadeh H. (2012). Pollen grain morphology in Iranian *Hedysareae* (Fabaceae). *Crop Breed. J.* 2(1): 25–33. Doi: [10.22092/CBJ.2012.100413](https://doi.org/10.22092/CBJ.2012.100413)
- Gledhill D (2008) *The Names of Plants*. Fourth Edition, Cambridge University Press, New York.
- Graham P.H. et Vance C.P. (2003). Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology*, 131(3), 872-877.
- Grammatikopoulos G. et Manetas Y. (1994). Direct absorption of water by hairy leaves of *Phlomis fruticosa* and its contribution to drought avoidance. *Can. J. Bot.* 72(12): 1805–1811. Doi: [10.1139/B94-222](https://doi.org/10.1139/B94-222)
- Hadawat A.K. et Madani S. (2022). Etude cytogénétique de quelques populations d'*Ebenus pinnata* Ait. (Fabacées) de la région de Béjaïa. Mémoire de Master en Sciences de l'Environnement. Université Abderrahmane Mira de Bejaia, Algérie. 49 p. <http://univ-bejaia.dz/dspace/123456789/21618>
- Halbritter H., Auer W. et Igersheim A. (2020). *Ebenus cretica*. In: PalDat - A palynological database.

- https://www.palдат.org/pub/Ebenus_cretica/3057777;jsessionid=B9B8A714C47DE9C0CB28F0595C4D0398; accessed 2021-01-25.
- Halbritter H., Auer W. et Igersheim A. (2020). *Ebenus cretica*. In: PalDat - A palynological database.
https://www.palдат.org/pub/Ebenus_cretica/3057777;jsessionid=B9B8A714C47DE9C0CB28F0595C4D0398; consulté le 2021-01-25.
- Haque I., Bandopadhyay R. et Mukhopadhyay K. (2009). Intraspecific variation in *Commiphora wightii* populations based on internal transcribed spacer (ITS1-5.8S-ITS2) sequences of rDNA. *Diversity* 1: 89-101. Doi: [10.3390/D1020089](https://doi.org/10.3390/D1020089)
- Hayta S., Tasarb N., Cakilcioglu U. et Gedikb O. (2014). Morphological, karyological features and pollen morphology of endemic *Ebenus haussknechtii* Bornm. ex Hub.-Mor. from Turkey: A traditional medicinal herb. *Journal of Herbal Medicine* 4: 141–146.
- Hegazy A.K. et Eesa N.M. (1991). On the Ecology, Insect Seed-Predation, and Conservation of a Rare and Endemic Plant Species: *Ebenus armitagei* (Leguminosae). *Conservation Biology*, Vol. 5, No. 3 (Sep., 1991), pp. 317-324.
- Hegazy A.K., Kabil H.F., Boulos L. et Sharashy O. (2010a). Functional traits and life history diversity of the North Africa endemic *Ebenus pinnata* Aiton. *Flora* 205: 666–673. Doi: [10.1016/J.FLORA.2010.04.007](https://doi.org/10.1016/J.FLORA.2010.04.007)
- Hegazy A.K., Kabil H.F., Boulos L. et Sharashy O. (2010b). Conservation approach to the demography and dynamics of protected and unprotected populations of the endemic *Ebenus armitagei* in the Western Mediterranean Coast of Egypt. *J. Nat. Conserv.* 18: 151–158. Doi: [10.1016/J.JNC.2009.08.005](https://doi.org/10.1016/J.JNC.2009.08.005)
- Hu X., Lan S., Song X., Yang F., Zhang Z., Peng D. et Ren M. (2021). Genetic divergence between two sympatric ecotypes of *Phalaenopsis pulcherrima* on Hainan Island. *Diversity* 13: 446. DOI: <https://doi.org/10.3390/d13090446>
- Huber-Morath A. (1965). Die Anatolischenarten der gattung *Ebenus* L. *Bauhinia*, Band 2, Heft 3, Verlag. Basel: In kommission bei Wepf and Co; p. 219–37. Khatun S, Parlak KU, Polat R, Cakilcioglu.
- Huber-Morath A. (1970). *Ebenus* L. In: Davis PH, editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol. 3. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, pp. 590–596.

- İmir N., Aydemir E., Şimşek E., Göktürk R., Yesilada E. et Fişkin K. (2016). Cytotoxic and immunomodulatory effects of *Ebenus boissieri* Barbey on breast cancer cells. *Genetics and Molecular Research*, 15(1). DOI: 10.4238/gmr.15017766
- Ingham J.L. (1978). Flavonoid and Isoflavonoid Compounds from Leaves of Sainfoin (*Onobrychis viciifolia*). *Z. Naturforsch.* 33: 146-148. DOI: 10.1515/znc-1978-1-227
- Jafri S.M.H. (1980). Fabaceae. In: Flora of Libya, V. 118, S.M.H. Jafri & A. El-Gadi (Eds.), Al Faateh University, Faculty of Science, Department of Botany, Tripoli.
- Jafri SMH (1980) Fabaceae. In: Flora of Libya, V. 118, Jafri SMH & El-Gadi A (Eds.), Al Faateh University, Faculty of Science, Department of Botany, Tripoli.
- Kabtani S., Sdouga D., Bettaib Rebey I., Save M., Trifi-Farah N., Fauconnier M.L. et Marghali S. (2020). Influence of climate variation on phenolic composition and antioxidant capacity of *Medicago minima* populations. *Scientific reports* 10(1): 8293. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65160-4>
- Karabourniotis G., Liakopoulos G., Nikolopoulos D. et Bresta P. (2020). Protective and defensive roles of non-glandular trichomes against multiple stresses: structure–function coordination. *Journal of Forestry. Research* 31:1–12. Doi: [10.1007/s11676-019-01034-4](https://doi.org/10.1007/s11676-019-01034-4)
- Katoh K., Rozewicki J. et Yamada K.D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 20 (4):1160-1166. Doi: [10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108)
- Kaveh A. et Kazampour-Osaloo S. (2012). Cladistic analysis of the genus *Ebenus* (Fabaceae-Hedysareae) based on morphological data. *Taxonomy and Biosystematics*, 4th Year, No. 11. DOI: 20.1001.1.20088906.1391.4.11.7.8
- Kaveh A. et Kazampour-Osaloo S. (2015). Estimation of *Ebenus* species divergence time based on nrDNA ITS and matKcpDNA sequences. 4th National Congress of Medicinal Plants. 12, 13 May 2015, Tehran, Iran. Doi: [10.1093/bib/bbx108](https://doi.org/10.1093/bib/bbx108)
- Kaveh A., Nafisi H. et Kazampour-Osaloo S. (2015). Ancestral area reconstruction and estimating geographic patterns of diversification within *Ebenus* (Hedysareae-Fabaceae). 4th National Congress of Medicinal Plants. 12, 13 May 2015, Tehran, Iran.

- Khodaparast A., Sayyah M. et Sardari S. (2012). Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extract and aqueous fraction of *Ebenus stellata* in mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, vol. 15, no. 3, pp. 811–819. Doi: [10.22038/IJBMS.2012.4865](https://doi.org/10.22038/IJBMS.2012.4865)
- Khodaparast A., Sayyah M. et Sardari S. (2012). Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extract and aqueous fraction of *Ebenus stellata* in mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, vol. 15, no. 3, pp. 811–819.
- Kiazai I., Samiullah, Khan N., Attiq-Ur-Rehman, Abdul Ghaffar et Abdul Baqi. (2019). Determination of heavy metals concentration in *Astragalus anisacanthus* and *Ebenus stellata* of Balochistan, Pakistan. Pure and Applied Biology 8(3): 2028-2035. DOI: <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2019.80147>
- Knight C.A., Clancy R.B., Götzenberger L., Dann L. et Beaulieu J.M. (2010). On the relationship between pollen size and genome size. Journal of Botany 2010, Article ID 612017, 7 pages. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/612017>
- Kounadi S., Aligiannis N., Pongratz I., Lelovas P., Ismini D. et Skaltsounis A. (2011). Estrogenic activity of the methanolic extract of *Ebenus cretica* L. Planta Medica 77 - PM168. Doi: [10.1055/S-0031-1282926](https://doi.org/10.1055/S-0031-1282926)
- Kounadi S., Aligiannis N., Pongratz I., Lelovas P., Ismini D. et Skaltsounis A. (2011). Estrogenic activity of the methanolic extract of *Ebenus cretica* L. Planta Medica 77 - PM168. DOI: [10.1055/s-0031-1282926](https://doi.org/10.1055/s-0031-1282926)
- Kovach W.L. (2007). MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.
- Kültür S., Gürdal B., Sari A. et Melikoğlu G. (2021). Traditional herbal remedies used in kidney diseases in Turkey: an overview. Turkish Journal of Botany 45: 269-287. DOI: [10.3906/bot-2011-32](https://doi.org/10.3906/bot-2011-32)
- Kumar S., Sandhir R. et Ojha S. (2014). Evaluation of antioxidant activity and total phenol in different varieties of *Lantana camara* leaves. BMC Research Notes 7, 560. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-560>
- Larsson A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. Bioinformatics 30 (22): 3276–3278. Doi: [10.1093/bioinformatics/btu531](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531)

- Levin D.A. (1973). The Role of Trichomes in Plant Defense. *The Quarterly Review of Biology* 48(1): 3–15. Doi: [10.1086/407484](https://doi.org/10.1086/407484)
- Lewis G., Schrire B., Mackinder B. et Lock M. (eds.) (2005). *Legumes of the World*. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewke-Bandara N.L., Papini A., Mosti S., Brown T. et Smith L.M.J. (2013). A phylogenetic analysis of genus *Onobrychis* and its relationships within the tribe Hedysareae (Fabaceae). *Türk Bot. Derg.* 37: 891–992. Doi: [10.3906/BOT-1210-32](https://doi.org/10.3906/BOT-1210-32)
- Lord E.M. (1981). Cleistogamy: a tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *The Botanical Review* 47(4): 421–449. Doi: [10.1007/BF02860538](https://doi.org/10.1007/BF02860538)
- LPWG, Legume Phylogeny Working Group (2013a). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon* 62: 217–248.
- LPWG, Legume Phylogeny Working Group (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *TAXON* 66 (1): 44–77.
- Macnair M.R. (1989). The potential for rapid speciation in plants. *Genome* 31: 203–210. Doi: [10.1139/G89-035](https://doi.org/10.1139/G89-035)
- Maddox J.C. (1985). Wind dispersal in californian desert plants: experimental studies and conceptual considerations. *Aliso* 11(1): 77–96. Doi: [10.5642/ALISO.19851101.07](https://doi.org/10.5642/ALISO.19851101.07)
- Madoui A., Gehu J.M. et Alatou D. (2006). L'effet du feu sur la composition des pinèdes de *Pinus halepensis* Mill. dans le nord de la forêt de Bou-Taleb, Algérie. *Ecologia mediterranea* – Vol. 32, pp. 05-13.
- Mahmood A. et Qadri R. (2004). A qualitative study of the nodulating ability of legumes of Pakistan-list 6. *Pak. J. Bot.*, 36(1): 167–171.
- Manafzadeh S., Salvo G. et Conti E. (2014). A tale of migrations from east to west: the Irano-Turanian floristic region as a source of Mediterranean xerophytes. *Journal of Biogeography (J. Biogeogr.)* 41 (2): 366–379. Doi: [10.1111/JBI.12185](https://doi.org/10.1111/JBI.12185)
- Mandokhail A., Samiullah, Khan K., Tareen A.H., Attiq-Ur-Rehman Kakar A.U.-R, Tariq S. et Kakar N. (2020). Determination of Antioxidants by Four Different Methods in

- Medicinally Important Plant *Ebenus Stellata* of Balochistan. *Al-Nahrain Journal of Science*.23(4): 13-18. DOI: 10.22401/ANJS.23.4.03
- Mebarki A. (2005). Hydrologie des bassins de l'Est algérien : Ressources en eau, aménagement et environnement. Thèse de doctorat d'état (Géographie et Aménagement du Territoire, option : Hydrologie), Université Mentouri de Constantine, Algérie. 360 p.
- Mertens T.R. et Hamnersmith R.L. (1998). Genetic laboratory investigations. Eleventh ed. Prentice Hall inc., Upper Saddle River, New Jersey.
- Miara M.D. (2016). Etat des Connaissances et Mesures de Conservation de la Flore Endémiques dans l'Atlas Tellien Occidental d'Algérie (Exemple de la région de Tiaret comme une nouvelle zone importante pour les plantes (IPA)). 1st Mediterranean Plant Conservation Week, 24 – 29 October 2016, Ulcinj, Montenegro.
- Miller M.A., Pfeiffer W. et Schwartz T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 14 Nov. 2010, New Orleans, LA pp. 1–8. Doi: [10.1109/GCE.2010.5676129](https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129)
- Mitrocotsa D., Skaltsounis A.-L., S., Harvala C. et Tillequin F. (1999). Flavonoid and terpene glycosides from European *Ebenus* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 27: 305-307. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(98\)90077-1](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(98)90077-1)
- MNHN - Museum national d'Histoire naturelle (2018). The vascular plants collection (P) at the Herbarium of the Muséum national d'Histoire Naturelle (MNHN - Paris). Version 69.74. Occurrence dataset. accessed via GBIF.org on 23 July 2018. [Doi: 10.15468/nc6rxy](https://doi.org/10.15468/nc6rxy)
- Molero J. et Montserrat Marti J.M. (1986). Números cromosómicos de plantas marroquíes. *Collectanea Botanica* [Barcelona], vol. 16, p. 351–354.
- Morrone J.J. (2008). Endemism. In Sven Erik Jørgensen and Brian D Fath (Editor-in-Chief), *Evolutionary Ecology* Vol. [2] of *Encyclopedia of Ecology*, 5 vols. pp. [1254–1259] Oxford: Elsevier.
- Mukassabi T.A., Ahmidat G., Sherif I. M., Elmogasapi A. et Thomas P.A. (2012). Checklist and life forms of plant species in contrasting climatic zones of Libya. *Biological Diversity And Conservation* – 5 / 3.

- NCCLS. (1993). Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Approved Standard NCCLS Publication M2-A5, Villanova, PA, USA.
- Nouioua W. et Gaamoune S. (2018). Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities development of methanol extracts of some species growth in the massif of Boutaleb Setif Algeria. *International Journal of Pharmacy and Natural Medicines* 6(1): 15–20.
- Novoselova L.V. (2003). Bud cleistogamy at annual species of genus *Medicago* L. *Czech Journal of Genetics, Plant Breeding* 39 (Special issue): 285-287 ref.8.
- Oyaizu M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese journal of nutrition and dietetics* 44(6): 307–315. DOI: <http://dx.doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Ozdemir E. et Alpinar K. (2015). An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus mountains: Aladaglar (Nigde–Turkey). *J. Ethnopharmacol.* 166: 53–65. Doi: [10.1016/j.jep.2015.02.052](https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.02.052)
- Page R.D.M. (1996). TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357–358. Doi: [10.1093/bioinformatics/12.4.357](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.4.357)
- Pampanini R. (1930). *Prodromo della flora cirenaica*. Forlì : Ministero delle Colonie (Tipografia Valbonesi).
- Parra R., Valdés B., Gordillo I. et Venanzi R. (1999). In: Kamari, G., Felber, F. and Garbari, F. (ed.): *Meditenanean chromosome number reports – 9 – Fl. Medit.* 9: 323-387. 1999. - ISSN 1120- 4052.
- Pina A.L.C.B., Zandavalli R.B., Oliveira R.S., Martins F.R. et Soares A.A. (2016). Dew absorption by the leaf trichomes of *Combretum leprosum* in the Brazilian semiarid region. *Functional Plant Biology* 43(9): 851-861. Doi: [10.1071/FP15337](https://doi.org/10.1071/FP15337)
- Pinar N.M., Vural C. et Zytac Z. (2000). Pollen morphology of *Ebenus* L. (Leguminosae: subfamily Papilionoideae) in Turkey. *Pak. J. Bot.* 32(2): 303-310.
- Pinar NM, Vural C, Zytac Z (2000) Pollen morphology of *Ebenus* L. (Leguminosae: subfamily Papilionoideae) in Turkey. *Pak. J. Bot.* 32(2): 303–310.

- Polhill R. (1997). Introduction to the Leguminosae: Legumes in streets and gardens. *Curtis's Botanical Magazine*, 14(4), 176-183.
- Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25 7, 1253-6. Doi: [10.1093/molbev/msn083](https://doi.org/10.1093/molbev/msn083)
- Postgate J. (1998). Nitrogen Fixation (3rd ed.). Cambridge: Cambridge University Press.
- Pottier-Alapetite G. (1979). Flore de la Tunisie. Angiospermes-dicotylédones, Apétales-Dialypétales. Publications Scientifiques Tunisiennes, Tunis.
- Quézel P. et Santa S. (1962). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales - Tome 1. Ed CNRS. Paris.
- Quézel P. and Santa S. (1962). Nouvelle flore d'Algérie et des régions désertiques méridionales - Tome 1. Ed CNRS. Paris.
- Rabeta M.S. & Nur Faraniza R. (2013). Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of *Garcinia atrovirdis* and *Cynometra cauliflora*. *International Food Research Journal* 20: 1691–1696.
- Rice et al. (2015). The Chromosome Counts Database (CCDB) – a community resource of plant chromosome numbers. *New Phytol.* 206(1): 19–26.
- Schoch C.L., et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.
- Schreel J.D.M., Leroux O., Goossens W., Brodersen C., Rubinstein A. et Steppe K. (2020). Identifying the pathways for foliar water uptake in beech (*Fagus sylvatica* L.): a major role for trichomes. *The Plant Journal* 103(2): 769-780. Doi: [10.1111/tpj.14770](https://doi.org/10.1111/tpj.14770)
- Schrire B.D., Lavin M. et Lewis G.P. (2005a). Global distribution patterns of the Leguminosae: Insights from recent phylogenies. *Biol. Skr.* 55: 375–422.
- Schrire B.D., Lewis G.P. et Lavin M. (2005b). Biogeography of the Leguminosae. Pp. 21–54 in: Lewis GP, Schrire B, MacKinder B & Lock M (eds.), *Legumes of the World*. Richmond, U.K.: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Shivanna K.R. et Tandon R. (2014). Seed Dispersal. *Reproductive Ecology of Flowering Plants: A Manual*, pp. 135–143. Springer New Delhi Heidelberg New York Dordrecht London. Doi: [10.1007/978-81-322-2003-9_11](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2003-9_11)

- Sibthorp J. (1833). *Flora Graeca: Sive Plantarum Rariorum Historia Quas In Provinciis Aut Insulis Græciæ* – vol.
- Siddiqui S. et Alrumman S.A. (2022). Methomyl, imbraclaobrid and clethodim induced cytomixis and syncytes behaviors in PMCs of *Pisum sativum* L: Causes and outcomes. *Saudi J. Biol. Sci.* 29(9): 103390. DOI: 10.1016/j.sjbs.2022.103390
- Simsek E., Imir N., Aydemir E.R., Gokturk R.S., Yesilada E. et Fiskin K. (2017). Caspase-mediated Apoptotic Effects of *Ebenus boissieri* Barbey Extracts on Human Cervical Cancer Cell Line HeLa. *Pharmacognosy Magazine* 13(50): 254-259. DOI: 10.4103/0973-1296.204560
- Singleton V.L., Orthofer, R. et Lamuela-Raventos R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 299: 152-178. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
- Sprent J.I. (2001). *Nodulation in Legumes*. Royal Botanic Gardens, Kew. Pp. 146.
- Stamatakis A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9):1312–1313. Doi: [10.1093/bioinformatics/btu033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033)
- Statsoft, Inc. (2007). *Statistica* (data analysis software system). version 8.0. www.Statsoft.com.
- Stewart H.M., Stewart S.C. et Canne-Hilliker J.M. (1996). Mixed mating system in *Agalinis neoscotica* (Scrophulariaceae) with bud pollination and delayed pollen germination. *Int. J. Plant Sci.* 157(4): 501–508. Doi: [10.1086/297368](https://doi.org/10.1086/297368)
- Stronen A.V., Norman A.J., Wal E.V. et Paquet P.C. (2021). The relevance of genetic structure in ecotype designation and conservation management. *Evolutionary Applications* 15(2): 185-202. DOI: <https://doi.org/10.1111/eva.13339>
- Syros T., Kofidis G., Economou A.S. et Bosabalidis A.M. (2006). Leaf structural dynamics associated with adaptation of two *Ebenus cretica* ecotypes. *Biologia Plantarum* 50 (2): 245–250. Doi: [10.1007/s10535-006-0014-4](https://doi.org/10.1007/s10535-006-0014-4)
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. et Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary

- Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731–2739. Doi: [10.1093/molbev/msr121](https://doi.org/10.1093/molbev/msr121)
- Taubert P. (1891). Leguminosae. Pp. 70–396 in: Engler, A. & Prantl, K. (eds.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien*, vol. 3(3). Leipzig: Engelmann
- Uyar Z., Böke N., Türkay E., Koz Ö., Yas A. I. et Kırmızıgül S. (2006). Flavonoid glycosides and methylinositol from *Ebenus haussknechtii*. *Nat. Prod. Res.* 20(11): 999-1007. DOI: 10.1080/14786410600921516
- Van der Pijl L. (1982). Ecological Dispersal Classes, Established on the Basis of the Dispersing Agents. In: *Principles of Dispersal in Higher Plants*. Springer, Berlin, Heidelberg. Doi: [10.1007/978-3-642-87925-8_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-87925-8_5)
- VandenBosch K. et Stacey G. (2003) Advances in legume biology. *Plant Physiology*, 131(3), 839-839.
- Vrachnakis T.G., Siakouli-Galanopoulou A.K., Fauland K. et Vlahos J.C. (2005). Investigations on *Ebenus cretica* L. (Leguminosae). *Phyton* 45 (3): 363–374.
- Vrachnakis T.G. et Vlahos J.C. (2008). Investigations on the anatomy of *Ebenus cretica* l. Fabaceae. *Acta Hortic.* 766: 225–230.
- Waseem M., Nie Z., Yao G., Hasan M., Yun Xiang Y. et Fang X. (2021). Dew absorption by leaf trichomes in *Caragana korshinskii*: An alternative water acquisition strategy for withstanding drought in arid environments *Physiologia Plantarum* 172:528–539. Doi: [10.1111/ppl.13334](https://doi.org/10.1111/ppl.13334)
- Wessa P. (2016). Box-Cox Normality Plot (v1.1.12) in Free Statistics Software (v1.2.1), Office for Research Development and Education, URL http://www.wessa.net/rwasp_boxcoxnorm.wasp/ [Accessed on December 2016].
- Woods M. et Hughes W.S. (2013). The genus *Dalea* (Fabaceae) in Alabama. *Phytoneuron* 2013-n: 1–12. 2013. ISSN 2153 733X
- Xiao K., Mao X., Lin Y., Xu H., Zhu Y., Cai Q., Xie H. et Zhang J. (2017). Trichome, a functional diversity phenotype in plant. *Mol Biol* 6: 183. Doi: [10.4172/2168-9547.1000183](https://doi.org/10.4172/2168-9547.1000183)

- Xing Z, Liu Y., Cai W., Huang X., Wu S. et Lei Z. (2017). Efficiency of Trichome-Based Plant Defense in *Phaseolus vulgaris* Depends on Insect Behavior, Plant Ontogeny, and Structure. *Front Plant Sci.* 2017; 8: 2006. Doi: [10.3389/fpls.2017.02006](https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02006)
- Yahara T., Javadi F., Onoda Y., Queiroz L.P., Faith D., Prado D.E., Akasaka M., Kadoya T., Ishihama F., Davies S., Slik J.W.F., Yi T., Ma K., Bin C., Darnaedi D., Pennington R.T., Tuda M., Shimada M., Ito M., Egan A.N., Buerki S., Raes N., Kajita T., Vatanparast M., Mimura M., Tachida H., Iwasa Y., Smith G.F., Victor J.E. et Nkonki T. (2013). Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators, and strategies. *Taxon* 62: 249–266.
- Yousif F., Hifnawy M.S., Soliman G., Boulos L., Labib T., Mahmoud S., Ramzy F., Yousif M., Hassan I., Mahmoud M., El-Hallouty S.M., El-Gendy M., Gohar L., El-Manaway M., Fayyad W. et El-Menshawi B.S. (2007). Large-scale in vitro. screening of Egyptian native and cultivated plants for schistosomicidal activity, *Pharmaceutical Biology* 45(6): 501-510. DOI: <https://doi.org/10.1080/13880200701389425>
- Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel J.C., Gillis M., Dreyfus B. et Lajudie P. (2004). Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. *Systematic and Applied Microbiology*, 380–395. Doi: [10.1078/0723-2020-00273](https://doi.org/10.1078/0723-2020-00273)
- Zameer S., Ali S., Gulmeena et Tareen R.B. (2022). Identification of Volatile Constituents and Antimicrobial Activity of *Ebenus stellata*. *GU. J. Phytosci.* 2(4): 214-222.
- Zemouri T., Chikhoun A., Benmouhoub H., Sahnoune M. (2023). Taxonomic Comparison, Antioxidant and Antibacterial Activities of Three *Ebenus pinnata* Ait. ecotypes (Fabaceae) from Algeria. *Horticulturae*. 9(8):879. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9080879>
- Zhang Y. et Wang Z. (2009). Phenolic composition and antioxidant activities of two *Phlomis* species: A correlation study. *CR Biologies* 332: 816-826. DOI: [10.1016/j.crv.2009.05.006](https://doi.org/10.1016/j.crv.2009.05.006)
- Zohary D. (1999). Speciation under self-pollination. In: Wasser SP (eds) *Evolutionary Theory and Processes: Modern Perspectives*. Springer, Dordrecht. Doi: [10.1007/978-94-011-4830-6_18](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4830-6_18)

Etude taxonomique de l'endémique nord-africaine *Ebenus pinnata* Aiton (Fabaceae) dans l'Est algérien.

Résumé : *Ebenus pinnata* Ait. est une plante xérophile, endémique à l'Afrique du Nord Tellienne. Ce taxon est peu étudié malgré sa large distribution et son importance pour comprendre la taxonomie et l'évolution du genre *Ebenus*. Nous présentons ici une étude détaillée de sa biogéographie, écologie, morphologie, système de reproduction, caryologie, sa diversité moléculaire (ITS) et ses activités antioxydantes et antibactériennes. 433 spécimens d'herbiers provenant de toute l'Afrique du Nord et 639 plantes fraîches (34 populations) d'Algérie ont été utilisés pour les analyses biogéographiques et morphologiques. L'analyse multivariée des 639 plantes sur 52 caractères morphologiques a donné 3 groupes taxonomiques plus ou moins hétérogènes : Groupe C1 associé au climat humide, Groupe C2 du semi-aride, et Groupe C3 du subhumide, avec C1 présentant plus de caractères apomorphes. La discrimination morphologique entre les groupes est significativement soutenue par la taille des pollens, la caryomorphologie et l'activité antioxydante mais peu avec la divergence moléculaire, la fertilité pollinique et l'activité antibactérienne. Les différences caryomorphologiques (longueurs des chromosomes), palynologiques et moléculaires entre les groupes sont du même ordre que pour les autres espèces d'*Ebenus* acceptées. Les cultures expérimentales suggèrent une forte pression de sélection. Toutes les plantes étudiées ont montré une cléistogamie pré-anthèse avec une carène transformée en une loge fermée dénotant un fort isolement reproductif. Les résultats suggèrent un phénomène de spéciation en cours.

Mots clés : Biogéographie, Morphologie, écologie, caryologie, phylogénie, antioxydants, cléistogamie, spéciation.

Taxonomic study of the North African endemic *Ebenus pinnata* Aiton (Fabaceae) in eastern Algeria.

Abstract: *Ebenus pinnata* Ait. is a xerophilous plant, endemic to the Tellian North Africa. This taxon is little studied despite its wide distribution and its importance for understanding the taxonomy and evolution of the genus *Ebenus*. Here we present a detailed study on its biogeography, ecology, morphology, reproductive system, karyology, molecular diversity (ITS) antioxidant and antibacterial activities. 433 herbarium specimens from across North Africa, and 639 fresh plants (34 populations) from Algeria were used for biogeographic and morphological analyses. The multivariate analysis of the 639 plants on 52 morphological characters gave 3 more or less heterogeneous taxonomic groups: Group C1 associated with the humid climate, Group C2 for the semi-arid, and Group C3 for the subhumid, with C1 presenting more apomorphic characters. Morphological discrimination between groups was significantly supported by pollen size, karyomorphology and antioxidant activity but little supported by molecular divergence, pollen fertility and antibacterial activity. The karyomorphological (chromosome lengths), palynological and molecular differences between the groups are of the same order as for other accepted *Ebenus* species. Experimental cultures suggest strong selection pressure. All the plants studied showed pre-anthesis cleistogamy with a keel transformed into a closed box denoting strong reproductive isolation. The results suggest an ongoing speciation phenomenon.

Keywords: Biogeography, Morphology, Ecology, Karyology, Phylogeny, Antioxidants, Cleistogamy, Speciation.

بشرق الجزائر (Fabaceae) المستوطن بشمال إفريقيا *Ebenus pinnata* Aiton دراسة تصنيفية لنبات

الخلاصة: إيبينوس بيناتا آيت. هو نبات محب للجفاف، مستوطن في شمال أفريقيا التلية ولم تتم دراسته إلا قليلاً على الرغم من توزيعه على نطاق تقدم هنا دراسة مفصلة عن الجغرافيا الحيوية، والبيئة، والتشكل، والجهاز التناسلي، وعلم *Ebenus*. واسع وأهميته لفهم تصنيف وتطور جنس والأنشطة المضادة للأكسدة والمضادة للبكتيريا. تم استخدام 433 عينة عشبية من جميع أنحاء شمال أفريقيا، و639 (ITS) النواة، والتنوع الجزيئي نباتاً طازجاً (34 مجموعة) من الجزائر للتحليلات الجغرافية الحيوية والمورفولوجية. أعطى التحليل متعدد المتغيرات للنباتات الـ 639 على 52 للمناطق شبه C2 المرتبطة بالمناخ الرطب، المجموعة C1 شخصية مورفولوجية 3 مجموعات تصنيفية غير متجانسة أكثر أو أقل: المجموعة المزيد من الخصائص غير المتجانسة. كان التمييز المورفولوجي بين المجموعات C1 للمناطق شبه الرطبة، مع تقديم C3 القاحلة، والمجموعة مدعوماً بشكل كبير بحجم حبوب اللقاح، وتشكل النواة والنشاط المضاد للأكسدة، ولكنه مدعوم قليلاً بالتباعد الجزيئي، وخصوبة حبوب اللقاح والنشاط المضاد للبكتيريا. إن الاختلافات الجينية (أطوال الكروموسومات) والاختلافات الجزيئية والجزيئية بين المجموعات هي بنفس الترتيب كما هو الحال بالنسبة لأنواع الإيبينوس المقبولة الأخرى. تشير الثقافات التجريبية إلى ضغط اختيار قوي. أظهرت جميع النباتات التي تمت دراستها زواجاً ذرياً قبل التآليف مع تحول العارضة إلى صندوق مغلق مما يدل على العزلة الإنجابية القوية. تشير النتائج إلى ظاهرة انتواع مستمرة.

الكلمات المفتاحية: الجغرافيا الحيوية، علم التشكل، علم البيئة، علم الخلايا النووية، علم السلالة، مضادات الأكسدة، زواج الفرج، الأنواع.