



N°ordre.....
N°série.....

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Ecologie Végétale**

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Option: les bases biologiques de la production végétale

Présentée par

Hayet GOUDJIL-BENHIZIA

Thème

**Caractérisation cytogénétique classique et moléculaire de trois
espèces endémiques du genre *Hedysarum* L.**

Soutenue le 30/ 01/ 2014

Devant le jury:

Président	Mr D. KHELIFI	Professeur à l'université de Constantine 1
Rapporteur	Mme N. KHALFALLAH	Professeur à l'université de Constantine 1
Examineurs	Mme D. SATTI	Professeur à l'université de Constantine 1
	Mme N. AMIROUCHE-HAMZA	Professeur à l'USTHB
	Mr R. AMIROUCHE	Professeur à l'USTHB.
	Mr A. ABDELGUERFI	Professeur à l'ENSA.

Remerciements

Je remercie tout particulièrement Madame KHALFALLAH N., professeur à l'université Constantine 1 et responsable du laboratoire de cytogénétique, qui m'a confié ce projet et en a suivi avec attention toutes les étapes. Je tiens à lui exprimer ici ma profonde gratitude pour les conseils instructifs qu'elle m'a prodigués pendant toutes ces années afin de faire aboutir ce travail de longue haleine. Je lui suis infiniment reconnaissante pour avoir partagé ses connaissances, son expérience et pour sa disponibilité.

Je remercie vivement Monsieur KHELIFI D., professeur à l'université Constantine 1 d'avoir accepté d'examiner ce travail et de présider le jury.

Je me fais un immense plaisir de remercier Madame SATTA D., professeur à l'université Constantine 1, pour ces encouragements, son soutien moral et d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je suis également reconnaissante à Madame AMIROUCHE N., maître de conférences à l'USTHB et Monsieur AMIROUCHE R., professeur à l'USTHB d'avoir accepté de faire le déplacement et de m'honorer de leur participation à ce jury.

Un devoir pour moi de remercier chaleureusement Monsieur ABDELGUERFI A, professeur à l'école nationale des sciences agronomiques, d'avoir accepté de consacrer du temps pour participer à l'évaluation de ce travail.

J'exprime mes sincères remerciements à Madame SILJAK-YAKOVLEV S., directeur de recherche du Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution végétale à l'université Paris XI-d'Orsay, de m'avoir permis de réaliser la partie moléculaire dans son laboratoire. La bonne marche de ce travail a reposé en grande partie sur sa contribution bienveillante et son aide précieuse.

La cytométrie en flux a été réalisée à l'institut des sciences du végétal (ISV) au CNRS à Gif-sur-Yvette. Pour cela je tiens à remercier chaleureusement Monsieur BROWN S., responsable du service de cytométrie pour sa collaboration et sa disponibilité.

Ma gratitude concerne Madame ALI MOHAMMED BADRI H., docteur chercheur au Centre de recherche Edokki (Caire-Egypte) qui m'a permis de réaliser certaines analyses dans son laboratoire. Pour son aide et ses conseils qu'elle n'a cessé de me les présenter au cours de mon passage en Egypte. Ses collaboratrices, docteur Ilhem et docteur Samira, que je n'oublie pas ici de les remercier.

Je remercie sincèrement Monsieur BELOUAHEM R., maître de conférences à l'université Constantine 1 (ILE) pour sa disponibilité à chaque fois que j'avais un problème de traduction. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude et respect.

J'adresse mes sincères remerciements à mes deux collègues Madame BENAMARA M .et Monsieur BAAZIZ K. pour leurs aides et encouragements.

Que Mademoiselle DJEGHAR R., ingénieur au laboratoire de cytogénétique, trouve ici toute ma reconnaissance pour l'aide qu'elle m'a apportée lors de la réalisation des différentes techniques.

Monsieur BELBEKRI N., ingénieur et responsable du laboratoire de BGBV, Mademoiselle BOULDJADJE R., qu'ils trouvent dans ces quelques mots mes remerciements les plus sincères pour leurs aides.

A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à la réalisation de cette thèse, mes vifs remerciements.

Résumé

Une étude cytogénétique de deux espèces diploïdes ($2n = 2x = 16$): *H. pallidum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. et d'une espèce tétraploïde ($2n = 4x = 32$): *H. perrauderianum* Coss. et Durieu. est réalisée pour la première fois. Ces espèces endémiques de l'Algérie et de l'Afrique du Nord sont fourragères. Le caryotype est constitué de 8 paires chromosomiques dont une paire satellifère chez les diploïdes et de 16 paires dont deux satellifères chez le tétraploïde. L'hétérochromatine constitutive, sous forme de bandes fines et larges, intercalaires et télomériques est révélée par le C-banding. 1 à 4 chromosomes B de nature hétérochromatique sont observés. La coloration des chromosomes métaphasiques par la chromomycine A_3 montre des bandes d'ADN riches en bases GC, situées au niveau télomérique des bras courts des paires portant les satellites, qui correspondent aux NORs. La FISH a révélé l'existence d'un locus chez les diploïdes et de deux loci chez le tétraploïde de chaque famille des gènes ribosomiques (5S et 35S). Les signaux 5S sont observés chez *H. pallidum* (2x) dans la région centromérique, et chez *H. naudinianum* (2x) et *H. perrauderianum* (4x) dans la région télomérique. Chez les trois espèces étudiées, les loci 35S sont situés sur les paires satellifères au niveau des constriction secondaires et des NORs. La majorité des bandes CMA^+ sont aussi $DAPI^+$. La similitude de certaines paires chromosomiques et la présence d'univalents, de trivalents et de tétravalents suggèrent une origine autotétraploïde de l'espèce *H. perrauderianum*. La taille du génome est de $2C = 1.5$ pg chez *H. pallidum*, de 3.36 pg chez *H. naudinianum* et de 6.64 pg chez *H. perrauderianum*. L'analyse du caryotype, de l'organisation de l'hétérochromatine, des gènes ribosomiques et de la taille du génome, permettent d'affirmer que *H. perrauderianum* est plus proche d' *H. naudinianum* que d' *H. pallidum*.

Mots clés: caryotype; chromosomes B; organisation de l'hétérochromatine; gènes ribosomiques 5S et 35S; méiose; taille du génome.

ملخص

لأول مرة تقدم نتائج تتعلق بالوراثة الخلوية النباتية لنوعين ثنائي الصيغة الصبغية ($2n = 2x = 16$): *Hedysarum pallidum* Desf. و *Hedysarum naudinianum* Coss. (32) *Hedysarum perrauderianum* Coss et Durieu. هذه الأنواع نباتات علفية و مستوطنة بالجزائر وشمال إفريقيا. النمط النووي مكون من 8 أزواج كروموسومية من بينهم واحد satellifère لدى ثنائي الصيغة الصبغية ومن 16 زوج بينهم اثنان satellifères عند رباعي الصيغة الصبغية. الهيتيروكروماتين التركيبي على شكل نقط، وأشرطة رفيعة وواسعة، ووسطية و قطبية، وتم الكشف عنه بواسطة C-banding. لوحظت كروموسومات B، ذات طبيعة هيتيروكروماتنية وعددها محصور بين 1 و 4. إن تلوين الكروموسومات في المرحلة الاستوائية باستعمال chromomycine A₃ أظهر أشرطة ADN غنية بقواعد GC، الموجودة على مستوى الأذرع القصيرة للأزواج الحاملة لل satellites، الموافقة لمناطق NORs. تقنية التهجين الموضعي FISH أظهرت وجود موقع واحد لدى ثنائي الصيغة الصبغية و اثنان عند رباعي الصيغة الصبغية من كل عائلة الجينات الريبوزومية (5S و 35S). الإشارات 5S ملاحظة عند *H. pallidum* (2x) في المنطقة الوسطى و عند *H. naudinianum* (2x) و *H. perrauderianum* (4x) في المواقع النهائية للصبغيات. عند الأنواع الثلاثة المدروسة، المواقع 35S متمركزة على الأزواج satellifères على مستوى التركيبات الثانوية و NORs. أغلبية الأشرطة CMA⁺ هي أيضا DAPI⁺. تشابه بعض الأزواج الصبغية ووجود وحدات أحادية الكروموسوم، وثلاثية الكروموسوم، ورباعية الكروموسوم يوحي بأصل رباعي الصبغيات ذاتي للنوع *H. perrauderianum*. كمية المجموع المورثي $2C = 1,5pg$ عند *H. pallidum* و $3,36pg$ عند *H. naudinianum* و $6,64pg$ عند *H. perrauderianum*. إن تحليل النمط النووي، وتنظيم الهيتيروكروماتين، والجينات الريبوزومية، وكمية المجموع المورثي يسمح بالتأكد على أن *H. perrauderianum* أقرب إلى *H. naudinianum* من *H. pallidum*.

الكلمات المفتاح: النمط النووي، كروموسومات B، تنظيم الهيتيروكروماتين، الجينات الريبوزومية 5S و 35S، الانقسام

المنصف، كمية المجموع المورثي.

Abstract

The first cytogenetic data are presented for two diploid species ($2n = 2x = 16$): *H. pallidum* Desf. and *H. naudinianum* Coss. and a tetraploid species ($2n = 4x = 32$): *H. perrauderianum* Coss. and Durieu. These endemic species of Algeria and North Africa are fodder. The karyogram consists of 8 chromosome pairs; one pair is satellite in the diploid and 16 pairs among which two are satellites in the tetraploid. The constitutive heterochromatin, as thin and wide, intercalary and telomeric bands is revealed by C-banding. One to four heterochromatic B chromosomes were observed. Staining of metaphase chromosomes by chromomycin A3 shows bands of DNA rich in GC base, located in the short arm telomere pairs with satellites, which correspond to the nucleolar organizer regions. FISH revealed the existence of a locus in diploid and two loci in the tetraploid of each family of ribosomal genes (5S and 35S). 5S signals are observed in *H. pallidum* (2x) in centromeric region, and in *H. naudinianum* (2x) and *H. perrauderianum* (4x) in telomeric region. In all three species studied, the loci 35S are located on satellifère pairs in secondary constrictions and NORs. The majority of bands CMA⁺ are also DAPI⁺. The similarity of certain chromosome pairs and presence of univalents, trivalents and tetravalents suggest an autotetraploid origin of *H. perrauderianum* species. The genome size of $2C = 1.5$ pg in *H. pallidum*, 3.36 pg in *H. naudinianum* and 6.64 pg in *H. perrauderianum*. The karyotype analysis, organization of heterochromatin, ribosomal genes and genome size, it can be concluded that *H. perrauderianum* is nearest of *H. naudinianum* than *H. pallidum*.

Keywords: karyotype; B chromosomes; heterochromatin organization; ribosomal genes 5S and 35S; meiosis; genome size.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre 1. Synthèse bibliographique	
1- Description du genre <i>Hedysarum</i> L	4
2- Présentation des espèces étudiées	5
3- Travaux de cytogénétique réalisés sur le genre <i>Hedysarum</i> L.....	7
4- Notion d'endémisme	8
5- Lignées polyploïdes	9
6- Chromosomes B.....	10
7- Apport de la cytogénétique.....	11
7-1- Caryotype	11
7-2- Hétérochromatine	12
7-3- Gènes ribosomiques.....	13
8- Taille du génome	14
Chapitre 2. Matériel et méthodes	
1- Matériel	16
2- Méthodes	19
2-1- Etude de la mitose.....	19
2-1-1- Techniques de cytogénétique classique	19
2-1-2- Techniques de cytogénétique moléculaire	21
2-1-3- Coloration au nitrate d'argent	27
2-2- Etude de la méiose.....	28
2-3- Test de viabilité et mesure des grains de pollen	28
2-4- Cytométrie en flux	30

Chapitre 3. Résultats

1- Dénombrement chromosomique.....	32
2- Caryotype	33
3- Organisation de l'hétérochromatine.....	37
4- Nombre et distribution des ADNr 5S et 35S chez les trois espèces	41
5- Analyse du comportement méiotique	43
6- Chromosomes B.....	46
7- Viabilité et taille des grains de pollen.....	48
8- Quantification de l'ADN par cytométrie en flux des trois espèces	51

Chapitre 4. Discussion générale

1- Dénombrement chromosomique et caractéristiques du caryotype	53
2- Organisation de l'hétérochromatine et cartographie et activité de l'ADNr	55
3- Comportement méiotique.....	57
4- Chromosomes B.....	57
5- Caractères palynologiques.....	58
6- Taille du génome	59
7- Origine possible du tétraploïde <i>H. perrauderianum</i>	61

Conclusion et perspectives	63
---	-----------

Références bibliographiques.....	66
---	-----------

Annexes

Liste des figures

- Figure 1.** Photographies, graines et gousses: (a) *Hedysarum pallidum* Desf.; (b) *Hedysarum naudinianum* Coss.; (c) *Hedysarum perrauderianum* Coss et Durieu..... 6
- Figure 2.** Représentation schématique d'un cytomètre en flux (Brown *et al.*1991)..... 15
- Figure 3.** Zones de prélèvements des espèces étudiées..... 17
- Figure 4.** Localisation des points de prélèvements des populations d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum*..... 17
- Figure 5.** Mitose et méiose pollinique: (a, b, c) plaques métaphasiques à $2n = 2x = 16$ chromosomes chez *H. naudinianum*; $2n = 4x = 32$ et $2n = 18$ chromosomes chez *H. perrauderianum* respectivement; (d, e, f) stades diacinèse à 8 bivalents chez *H. naudinianum*; 16 et 9 bivalents chez *H. perrauderianum* respectivement..... 32
- Figure 6.** Caryotype d'*H. naudinianum* (population de Aïn Sfa): (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme 35
- Figure 7.** Caryotype et hétérochromatine constitutive d'*H. perrauderianum*: (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme..... 38
- Figure 8.** L'hétérochromatine constitutive chez *H. naudinianum*..... 39
- Figure 9.** Coloration à la chromomycine, hybridation *in situ* avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaques métaphasiques et noyaux interphasiques et idiogrammes des chromosomes marqueurs: (a, d, g, j) *H. perrauderianum*; (b, e, h, k) *H. naudinianum*; (c, f, i, l) *H. pallidum*..... 40
- Figure 10.** Coloration des nucléoles au nitrate d'argent et histogrammes des nombres de nucléoles par cellule: (a) *H. pallidum*; (b) *H. naudinianum*; (c) *H. perrauderianum*. Les flèches indiquent le nombre de nucléoles par noyau..... 42
- Figure 11.** Cellules au stade diacinèse: (a) bivalent en v et trivalent; (b, c) tétravalent et univalent; (d) pentavalent; anomalies méiotiques: (e, f) des chromosomes retardataires en anaphase I et (g) en anaphase II; (h, i) pont de chromatine à la fin de l'anaphase I et II (a, b, e) *H. naudinianum* et (c, d, f, g, h, e) *H. perrauderianum*..... 44
- Figure 12.** Chromosomes B en méiose: (a, b, c) 1 à 3 chromosomes B chez *H. naudinianum*; (d, e, f) 1 à 4 chromosomes B chez *H. perrauderianum*..... 47
- Figure 13.** Pollen observé au microscope photonique chez *H. naudinianum* et *H. perrauderianum*: (a) pollen viable (rose) et pollen non viable (transparent); (b) pollen de taille variable.....49
- Figure 14.** Pollen observé au microscope photonique: (a, c) *H. naudinianum*; (b, d) *H. perrauderianum*; (a, b,) vue équatoriale et colpus; (d, e) vue polaire..... 51
- Figure 15.** Histogrammes des quantités d'ADN nucléaire déterminées par cytométrie de flux: (a) espèce diploïde; (b) espèce tétraploïde..... 52

Liste des tableaux

Tableau 1. Nomenclature chromosomique de Levan <i>et al.</i> (1964).....	12
Tableau 2. Origine géographique et étage bioclimatique des espèces étudiées	18
Tableau 3. Composition du mélange d'hybridation.....	25
Tableau 4. Données morphométriques du caryotype d' <i>H. naudinianum</i>	34
Tableau 5. Données morphométriques du caryotype d' <i>H. perrauderianum</i>	36
Tableau 6. Fréquences des appariements chromosomiques chez les populations d' <i>H. naudinianum</i> au stade diacinèse (5 individus/population; 30 CMP/individu).....	45
Tableau 7. Fréquences des appariements chromosomiques au stade de diacinèse chez les populations d' <i>H. perrauderianum</i> (5 individus/population; 30 CMP/individu).....	45
Tableau 8. Fréquences des anomalies méiotiques chez les trois populations d' <i>H. naudinianum</i> (5 individus/population; 30 CMP/individu).....	46
Tableau 9. Fréquences des anomalies méiotiques chez les six populations d' <i>H. perrauderianum</i> (5 individus/population; 30 CMP/individu).....	46
Tableau 10. Fréquences des chromosomes B chez les trois populations d' <i>H. naudinianum</i> (5 individus / population; 300 cellules / individu).....	48
Tableau 11. Fréquences des chromosomes B chez les six populations d' <i>H. perrauderianum</i> (5 individus / population; 300 cellules/individu).....	48
Tableau 12. Viabilité du pollen des populations diploïdes (<i>H. naudinianum</i>) et des populations tétraploïdes (<i>H. perrauderianum</i>).....	49
Tableau 13. Données morphométriques des grains de pollen des populations diploïdes (<i>H. naudinianum</i>) et des populations tétraploïdes (<i>H. perrauderianum</i>).....	50
Tableau 14. Estimation de la taille du génome par cytométrie en flux des espèces étudiées...	52

Liste des abréviations

BamH1: produite par *Bacillus amyloliquefaciens*. Site de reconnaissance: 5'-GGATCC-3'

BSA: Bovin Serum Albumin

CMA₃: Chromomycine A₃

CMF: Cytométrie en Flux

CMP: Cellules Mères de Pollen

Coss: Cosson

cs: constriction secondaire

CV: Coefficient de Variation

DAPI: 4',6- diamidino-2-phenylindole

Desf: Desfontaine

EcoR1: produite par *Escherichia coli*. Site de reconnaissance: 5'-GAATTC-3'

FISH: Hybridation *In Situ* par Fluorescence

Ic: Indice centromérique

Kb: Kilo base

L: de Litardière

Mo: Maoklane

M: Molaire

Mpb: méga-paires de base

mM: millimolaire

ng: nanogramme

nm: nanomètre

pg: picogramme

R: Aïn Roua

S: Aïn Sfa

Introduction

Le bassin méditerranéen est considéré comme l'un des 33 points chauds de très forte biodiversité avec le plus grand nombre de plantes endémiques. Cette région a été exposée à une influence anthropique prolongée rendant sa biodiversité sujette à un changement rapide. La connaissance de la flore et de la végétation méditerranéenne, leur statut et leur évolution sont d'une importance capitale pour la valorisation et la conservation de ce patrimoine biologique.

Le genre *Hedysarum* (légumineuse de la famille des Fabacées) dont la répartition géographique est très large, est représenté par plus de 170 espèces (Wielgorskaya 1995). Elles peuvent être annuelles ou pérennes, diploïdes ou tétraploïdes, autogames ou allogames (Baatout *et al.* 1991; Boussaid *et al.* 1995). Le nombre chromosomique chez les diploïdes est soit $2n = 14$ ($x = 7$) soit $2n = 16$ ($x = 8$).

Les espèces du genre *Hedysarum*, constituent un patrimoine d'un grand intérêt agro-économique grâce à leur qualité fourragère et leur capacité à améliorer la fertilité des sols par la fixation de l'azote atmosphérique. Elles peuvent être ainsi exploitées dans l'amélioration des sols dégradés, surtout dans les zones arides et semi-arides. Cependant, ces espèces restent insuffisamment étudiées et peu exploitées, particulièrement en Algérie.

En Afrique du Nord, on compte 10 espèces caractérisées par une diversité importante qui concerne aussi bien la morphologie que les aires de répartition de leurs peuplements. Toutefois, elles sont menacées par une érosion génétique incontestable comme en témoigne l'extinction d'*H. humile* L. et la raréfaction d'*H. flexuosum* L. et *H. aculeolatum* Munby (Trifi-Farah et Marrakchi 2001, 2002; Hannachi-Salhi *et al.* 2002). Cette érosion serait accélérée par l'exploitation des cultures, le surpâturage, la dégradation des sols ainsi que les changements climatiques.

L'Algérie, avec la présence d'au moins neuf taxons dont plusieurs sont des endémiques (*H. perrauderianum* Coss. et Durieu et *H. naudinianum* Coss.) parfois très localisés comme *H. perrauderianum* (Quezel et Santa 1962), est considérée par certains auteurs comme un centre d'origine de ces taxons (Hannachi-Salhi *et al.* 2002). La répartition des espèces du genre *Hedysarum* est particulièrement déterminée par la pluviométrie et l'altitude (Abdelguerfi-Berrekia *et al.* 1988).

Les taxons endémiques, occupent des aires géographiques plus réduites par rapport aux autres représentants proches sur le plan systématique et sont donc en général des espèces rares. La sauvegarde du patrimoine génétique des espèces rares, relictuelles et endémiques est devenu une nécessité face aux menaces d'une civilisation de plus en plus envahissante (Richardson 1978 in Favarger et Siljak-Yakovlev 1986).

Le nombre de chromosomes et les données sur les caryotypes des espèces du genre *Hedysarum* sont rares. Quelques chercheurs en Turquie ont contribué à ce sujet avec peu d'espèces telles que *H. pannosum*, *H. syriacum*, *H. varium*...etc (Akpınar et Yildiz 1999; Yildiz et Gücel 2006; Arslan *et al.* 2012). En Méditerranée, seules les espèces *H. coronarium* L., l'unique espèce fourragère cultivée, *H. pallidum* Desf. et *H. aculeolatum* Munby., ont fait l'objet d'une étude cytogénétique classique (Falistocco et Maurelli 1990; Sadaoui 1999; Benhizia *et al.* 2003; Issolah *et al.* 2006).

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient d'évaluer la diversité intra- et interspécifique du caryotype chez deux espèces diploïdes et une espèce tétraploïde endémiques du complexe *Hedysarum* L. L'application de techniques classiques et moléculaires nous conduiront à la détermination du caryotype et sa variabilité potentielle dans plusieurs populations, l'examen de l'organisation de l'hétérochromatine (Giemsa C-banding et fluorochrome banding), la cartographie des gènes ribosomiques 5S et 35S, la détermination de l'activité transcriptionnelle de l'ADNr par comptage des nucléoles et l'analyse de la méiose.

H. pallidum a fait l'objet d'une étude cytogénétique classique (Benhizia 2001; Benhizia *et al.* 2003), complétée dans ce travail par une étude moléculaire.

Pour la première fois, les techniques de cytogénétique classique et moléculaire sont appliquées aux espèces *H. naudinianum* et *H. perrauderianum*. Cette dernière a fait l'objet d'une publication (Benhizia *et al.* 2013).

La cytogénétique moléculaire offre de nouvelles possibilités dans l'étude de l'évolution chromosomique et l'organisation du génome, et contribue à une meilleure caractérisation du caryotype des espèces endémiques (Siljak-Yakovlev et Peruzzi 2012). Signalons que cette approche n'a jamais encore été abordée pour les espèces du genre *Hedysarum* L.

Les données sur la taille du génome des espèces du genre *Hedysarum* L. sont rares (l'information est seulement disponible pour 6 des 170 espèces, Akpinar et Yildiz 1999) et particulièrement sur les populations naturelles en Afrique du Nord. En complément à l'étude cytogénétique, nous avons mesuré la taille des génomes des espèces étudiées par cytométrie en flux. La comparaison des valeurs $-C$ constitue une voie naturelle pour expliquer les relations phylogénétiques au sein de groupes de taxa étroitement apparentés (Bennett *et al.* 2000).

Une étude préliminaire de quelques caractères palynologiques chez *H. naudinianum* et *H. perrauderianum* a été abordée dans ce travail.

Ce document s'articule de la façon suivante:

- un premier chapitre présente les données de la littérature sur le complexe *Hedysarum* L. et les outils cytogénétiques;
- un second chapitre décrit le matériel végétal et les différentes méthodes de cytogénétique classique et moléculaire utilisées;
- un troisième chapitre annonce les résultats caryologiques et palynologiques obtenus;
- un quatrième chapitre est consacré à l'analyse fine du caryotype à travers une synthèse des résultats présentée dans une discussion générale;
- la conclusion et les éventuelles perspectives dégagées à partir de ce travail constituent le dernier chapitre.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1- Description du genre *Hedysarum* L.

Les espèces du genre *Hedysarum* (famille des Fabacées et tribu des Hedysarées) poussent spontanément sur des sols variés et dans des conditions climatiques différentes, présentant ainsi une grande diversité. Ce genre est représenté par plus de 170 espèces réparties à travers l'Europe tempérée, la région méditerranéenne, l'Ouest de l'Asie, la Sibérie et l'Amérique du Nord en allant de l'Arizona jusqu'au Canada et aux régions Arctiques (Allen et Allen 1981; Wielgorskaya 1995).

Le genre *Hedysarum* est subdivisé en deux sous-groupes d'espèces qui se distinguent par la morphologie, les régimes de reproduction, les caractères du caryotype et les origines géographiques. Le premier groupe inclut les espèces alpines, arctiques et asiatiques ($2n = 2x = 14$ chromosomes), et le second les espèces méditerranéennes ($2n = 2x = 16$ chromosomes).

En Afrique du Nord, on recense 10 espèces dont plusieurs sont endémiques. La Tunisie et le Maroc comprennent chacune six espèces (Battandier et Trabut 1902; Jahandiez et Maire 1932) et l'Algérie comprend neuf espèces dont *H. naudinianum* Coss. et *H. perrauderianum* Coss et Durieu endémiques de l'Algérie, et *H. carnosum* Desf. et *H. pallidum* Desf. endémiques de l'Afrique du Nord (Quezel et Santa 1962).

Hedysarum vient du mot grec *Hedys*, qui signifie fourrage doux à brouter (Bonnier 1934). Les plantes appartenant à ce genre sont d'une manière générale constituées d'un appareil souterrain robuste portant de nombreuses nodosités fixatrices d'azote et d'un système aérien à rameaux dimorphes: tige principale "orthotrope" et ramifications latérales "plagiotropes". Ces espèces comme toutes les autres espèces légumineuses fourragères telles que la luzerne, participent à la fixation des sols et à leur enrichissement en azote, ainsi qu'à l'alimentation du bétail étant donné que la majorité d'entre elles sont pâturées par les ovins et les bovins.

L'exploitation des espèces d'*Hedysarum*, en Algérie, en tant que plante de pâturage, est très limitée; alors que dans d'autres pays, tels que l'Italie et l'Espagne, des programmes d'amélioration conduits particulièrement sur l'espèce *H. coronarium* ont abouti à la sélection de certaines variétés (Bonciarelli et Monotti 1976). Seules les variétés italiennes ont été introduites en Tunisie et dont les surfaces de culture sont encore trop limitées (Figier 1982; Hannachi-Salhi *et al.* 2002; Marghali *et al.* 2003). Les espèces du genre *Hedysarum* sont bien adaptées aux sols calcaires et aux bancs graveleux et rocailloux. Certaines espèces poussent jusqu'à 2300 m d'altitude (Allen et Allen 1981).

2- Présentation des espèces étudiées

2-1- *Hedysarum pallidum* Desf. est une plante vivace, diploïde, poussant spontanément en Algérie, au Maroc et en Tunisie (Endémique Nord-africaine). Elle a une écologie peu marquée et se rencontre dans des milieux assez divers. En Algérie, *H. pallidum* se rencontre dans l'Oranie, le Constantinois et les Aurès. Elle se trouve généralement dans les forêts et les broussailles et présente des inflorescences en grappe plus ou moins allongées atteignant 10 à 15 cm à la fructification, de grandes fleurs rosées ou blanches lavées de pourpre, parfois blanches (Quezel et Santa 1962; Abdelguerfi-Berrekia *et al.* 1986) (Fig. 1a).

2-2- *Hedysarum naudinianum* Coss. est une plante herbacée vivace de 12 à 22 cm de hauteur, diploïde, endémique de l'Algérie et assez rare. Elle se trouve dans le Tell Constantinois (Monts de Bibans), dans l'Algérois (Littoral, Atlas tellien), à Boghar et au Nord de Sétif (Bougâa, Ain Roua). Des fleurs réunies en grappes allongées, longues de 3 à 28 mm et pourprées. Des fruits en gousses et des graines de couleur marron clair à foncé, à dimensions et poids variables allant de 10.6 à 14.4 g. Elle pousse spontanément dans les forêts claires sous Pin d'Alep (Quezel et Santa 1962; Bousba 1992) (Fig. 1b).

2-3- *Hedysarum perrauderianum* Coss. et Durieu (appelée *perralderianum* par Quezel et Santa 1962), légumineuse, à vocation fourragère est une plante tétraploïde, vivace de 11.5 à 31.5 cm de hauteur, endémique de l'Algérie et rare. Elle se trouve uniquement à l'Est de l'Algérie, dans les régions de Sétif (Bou Thaleb) et Batna (Djebel Toumour, Lambès et Bellesma) (Cosson 1856; Quezel et Santa 1962; Hannachi-Salhi *et al.* 2002). Cette espèce pousse spontanément dans les forêts claires sur marne et préfère des sols moyennement calcaires à très calcaires. Elle présente des fleurs en grappes allongées, longues de 7 à 15 mm et purpurines plus ou moins violacées. Les fruits sont des gousses articulées au nombre d'une graine par article, de couleur marron clair à foncé, à dimensions et poids variables allant de 9.8 à 10.6 g (Quezel et Santa 1962; Bousba 1992) (Fig. 1c).

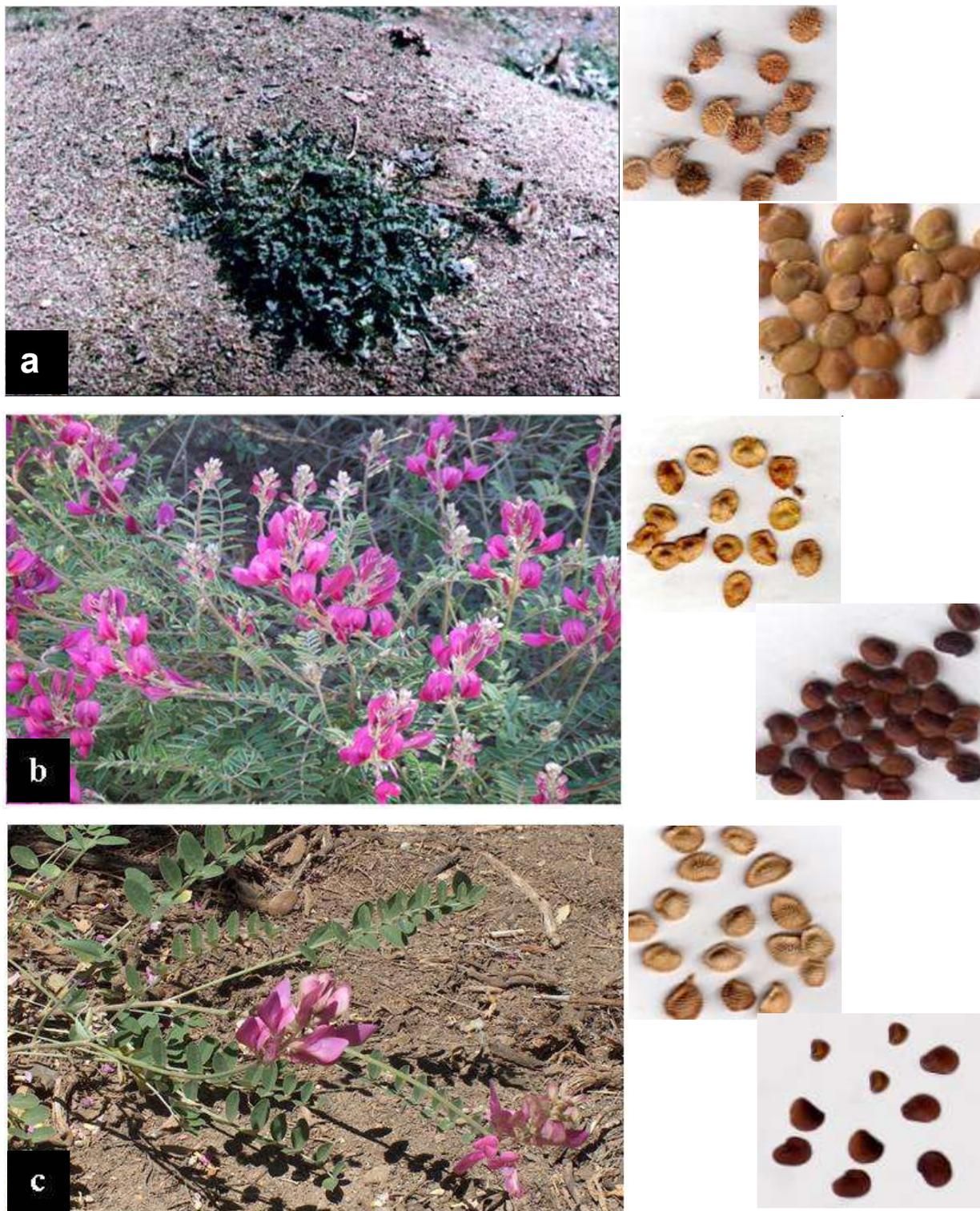


Figure 1. Photographies, graines et gousses: (a) *Hedysarum pallidum* Desf.; (b) *Hedysarum naudinianum* Coss.; (c) *Hedysarum perrauderianum* Coss et Durieu.

3- Travaux de cytogénétique réalisés sur le genre *Hedysarum* L.

L'organisation chromosomique du genre *Hedysarum* est mal connue, les publications sur ce sujet sont rares et mettent en évidence l'existence d'une variabilité du nombre chromosomique ($2n = 14, 16, 17, 18, 28, 32, \text{ et } 48$). En effet, les dénombrements chromosomiques varient de $2n = 14$ (*H. alpinum*; *H. arcticum*; *H. boutignyanum*; *H. caucasicum*; *H. hedysaroides*; *H. neglectum*; *H. obscurum* et *H. vicioides*) à $2n = 28$ (*H. alpinum*; *H. arcticum* et *H. obscurum*) en passant par $2n = 16$ (*H. alpinum*; *H. dasycarpum*; *H. makensi* et *H. macranthum*) (Moore 1971). Selon Bolkhoskikh *et al.* (1974), l'espèce *H. setigenum* est à $2n = 48$ et l'espèce *H. mackensii* présente deux nombres chromosomiques $2n = 16$ et $2n = 17$.

Le niveau diploïde ($2n = 2x = 16$ chromosomes) chez deux populations naturelles et une variété italienne d'*H. coronarium* a été confirmé par Falistocco et Maurelli (1990).

Beji (1976, 1980) et Beji *et al.* (1991) ont étudié les relations évolutives dans le genre *Hedysarum* par des essais sur la tétraploïdie induite expérimentalement. Ces mêmes auteurs ont signalé que *H. pallidum* est l'unique espèce du genre connue en Tunisie qui présente à la fois des populations spontanées diploïdes $2n = 2x = 16$ et tétraploïdes $2n = 4x = 32$.

Le nombre chromosomique et le caryotype de quelques espèces turques du genre *Hedysarum* comme *H. syriacum* Boiss et *H. pannosum* Boiss. sont établis pour la première fois par Akpinar et Yildiz (1999); Yildiz et Gücel (2006) et Arslan *et al.* (2012). Ces auteurs ont mis en évidence l'existence de deux nombres chromosomiques $2n = 2x = 14$ et $2n = 2x = 16$.

Pour ce qui est des espèces algériennes, la plupart des travaux sont anciens et d'ordre systématique (Cosson 1856; Munby 1866; Pomel 1874; Battandier et Trabut 1902; Maire 1955; Quezel et Santa 1962). Les travaux récents sont limités et se résument à ce qui suit:

Une étude menée sur 30 populations et 08 espèces de ce genre montre que le nombre chromosomique est de $2n = 2x = 16$, à l'exception d'*Hedysarum pallidum* Desf., qui présente deux nombres chromosomiques $2n = 16$ et $2n = 18$ (Abdelguerfi-Berrekia 1985; Abdelguerfi-Berrekia *et al.* 1986; Abdelguerfi-Berrekia *et al.* 1988).

Une étude caryologique réalisée sur une espèce endémique Nord-africaine, *Hedysarum pallidum* Desf, confirme l'existence d'un cytotype diploïde $2n = 16$ ($n = x = 8$). Le nombre $2n = 18$ n'a pas

été observé. Des chromosomes B sont observés chez les populations contaminées par l'antimoine (Benhizia 2001; Benhizia *et al.* 2003).

Bousba (1992) a contribué à l'étude morphologique et comparative de deux espèces endémiques de l'Algérie du genre *Hedysarum* L. Il a dénombré $2n = 16$ chez *H. naudinianum* et $2n = 18$ et 32 chez *H. perrauderianum*.

Sadaoui (1999) a également réalisé une étude caryologique sur une espèce endémique de l'Algérie, *H. aculeolatum* Munby. Cette espèce présente un nombre de chromosomes stable $2n = 2x = 16$ chez l'ensemble des populations étudiées.

Deux nombres chromosomiques $2n = 16$ et $2n = 18$ ont été observés par Issolah *et al.* (2006) chez des populations de l'espèce *H. coronarium*. D'après cet auteur, la variation caryotypique existante serait liée aux facteurs écologiques du milieu d'origine des populations chez cette espèce.

Outre une bonne synthèse des travaux réalisés sur le genre *Hedysarum* L. (Benhizia 2001; Issolah 2006), des travaux plus récents ont été publiés dans le domaine biochimique (Chennaoui *et al.* 2007), génétique microbienne (Gharzouli *et al.* 2012, 2013), écologie microbienne (Torche *et al.* 2010).

4- Notion d'endémisme

L'endémisme est un terme qui a été utilisé en biologie végétale par De Candolle (1820). Cet auteur a introduit ce terme pour désigner certains genres, certaines familles ou encore certaines espèces qui n'apparaissent que dans un lieu précis et nulle part ailleurs. Le terme endémique fait référence à l'habitat de l'espèce: habitat très localisé (un seul endroit du globe) et habitat caractérisé par des conditions environnementales particulières, spécifiques d'un type de milieu.

Favarger et Contandriopoulos (1961) ont proposé la première classification des plantes endémiques basée sur les données cytotaxonomiques. Les espèces endémiques sont classées en quatre grandes catégories, en fonction du niveau de ploïdie: paléoendémiques, patroendémiques, schizoendémiques et apoendémiques. Contandriopoulos (1962, 1964) a utilisé cette classification dans son étude de la flore endémique de la Corse. Siljak-Yakovlev et Peruzzi (2012), ont revu cette classification sur la base de données de cytogénétique classique et moléculaire.

Une espèce est dite endémique strict si on ne la retrouve que sur un type d'habitat très spécifique (sommets montagneux, prairies calcaires...) et jamais ailleurs. Ce type d'endémisme résulte principalement d'une restriction du spectre écologique (forte adaptation locale) d'une espèce en réponse à une intense compétition. Une espèce endémique locale est une espèce que l'on ne trouve qu'en un seul endroit, d'aire très restreinte (une île perdue au milieu du Pacifique et nulle part ailleurs) (Anderson 1994).

5- Lignées polyploïdes

Le terme "polyploïdie" a été introduit pour la première fois par Winkler en 1916. Il désigne la présence de plus de deux lots haploïdes de chromosomes dans une même cellule. La formation d'individus polyploïdes est un événement courant dans la nature, et ce processus représente un mécanisme de spéciation majeur chez les angiospermes (Peer *et al.* 2009; Wood *et al.* 2009).

Otto et Whitton (2000), rappellent les trois mécanismes susceptibles d'être à la source d'individus polyploïdes: l'endomitose, la production de gamètes non réduits et la polyspermie. Bien que le doublement somatique des lots chromosomiques soit possible, il est actuellement admis que la voie principale conduisant à la formation d'un individu polyploïde est la production de gamètes non réduits. Il existe deux grandes catégories de polyploïdes selon l'origine des génomes qui les composent:

-les autopolyploïdes sont des individus issus d'un doublement chromosomique intervenant au niveau intraspécifique et présentant plus de deux copies d'un même génome. L'appariement de plus de deux chromosomes homologues aboutit souvent à la formation de multivalents d'où une hérédité polysomique. D'après Le Comber *et al.* (2010), les multivalents peuvent être à l'origine de gamètes ayant un nombre de chromosomes déséquilibré et donc des problèmes de stérilité. La méiose peut toutefois rapidement se régulariser (diploïdisation cytologique) et devenir disomique.

-les allopolyploïdes sont des individus qui combinent les génomes d'au moins deux espèces ancestrales (Stebbins 1971). Ils résultent d'une hybridation interspécifique suivie d'une duplication du génome hybride formé (Ramsey et Schemske 1998). Les allopolyploïdes segmentaires correspondent à la formation d'espèces issues de l'hybridation de parents ayant en commun des segments chromosomiques (Leitch et Bennett 1997). Chez les plantes, on estime que plus de 75% des espèces polyploïdes sont allopolyploïdes (Wood *et al.* 2009).

6- Chromosomes B

Les chromosomes B ont été décrits pour la première fois par Pantulu (1960) dans une variété du Mil cultivée au Soudan. Ils ont été signalés chez plus de 1300 plantes et 500 espèces animales (Jones 1975; Jones et Rees 1982). Ces chromosomes surnuméraires sont généralement de nature hétérochromatique et suivent leurs propres voies évolutives (Jones 1985). Comme ils ne sont pas indispensables pour une croissance normale, ils ont été considérés comme non fonctionnels et sans gènes essentiels (Houben *et al.* 2011). Les chromosomes B peuvent avoir de l'ADN ribosomique, quelques organisateurs nucléolaires et certains ont une information génétique qui contrôle leur transmission (cas du Riz et Maïs) (Cohen *et al.* 2003, 2008).

Les variations structurales des chromosomes A, comme les translocations, les délétions et les inversions, peuvent être à l'origine des chromosomes surnuméraires, spécialement quand les régions hétérochromatiques sont affectées. L'autofécondation chez des plantes peut entraîner leur apparition (Gorenflot et Raicu 1980). Des analyses plus récentes leur suggèrent une origine extrachromosomique (Jones *et al.* 2008). Plusieurs travaux ont montré que les chromosomes B ont une vitesse d'apparition élevée et que leur nombre augmente d'une génération à l'autre comme chez certaines espèces animales et végétales (Camacho *et al.* 2002; Lôpez *et al.* 2005) où ils sont considérés comme des "éléments parasites". Cette propriété parasite assure leur survie et leur propagation dans les populations naturelles, même contre un gradient d'effets nocifs sur le phénotype de la plante (Jones 2012).

Les nombreux travaux réalisés sur ces chromosomes ont souvent montré l'existence d'une corrélation entre leur présence et la distribution écologique des populations. Ainsi, John et Hewitt (1965), ont établi que les populations de *Myrmeleotettix maculatus*, présentent plusieurs chromosomes B dans les régions sèches et chaudes, tandis que dans les climats plus humides et plus froids ces chromosomes ne sont présents qu'en nombre réduit, ou même absents. Ces auteurs concluent que les chromosomes B ont un rôle dans l'adaptation des organismes aux variations du milieu. Puertas *et al.* (1986) montrent chez le seigle que la fréquence des chromosomes B diminue quand les conditions leur sont favorables et augmente dans le cas contraire. D'après ces auteurs, les chromosomes B se comportent en "égoïste" et n'apparaissent que lorsque cela les avantage. La présence des chromosomes B a été également corrélée avec la fréquence de crossing-over, une diminution de la vigueur générale, une stérilité mâle et une fertilisation préférentielle.

7- Apport de la cytogénétique

7-1- Caryotype

L'étude des paramètres caryologiques et de l'organisation des chromosomes, peut fournir des indications évolutives. La technique classique de Feulgen permet de construire un caryotype pour chaque espèce. L'étude des caryotypes se fait généralement en métaphase mitotique où les chromosomes sont bien individualisés et présentent la meilleure morphologie. Différents paramètres interviennent dans la description de la morphologie des chromosomes: la taille, la position du centromère, la présence de satellites et les constriction secondaires. D'autres caractères sont également utilisés pour l'étude des caryotypes; la longueur totale des chromosomes, la longueur relative des chromosomes, l'asymétrie du caryotype mesurée par l'indice d'asymétrie (IAs %), le rapport de la plus longue paire de chromosomes sur la paire de chromosomes la plus courte.

Différentes méthodes ont été employées pour localiser le centromère, ce qui a engendré l'apparition de diverses nomenclatures de morphologie chromosomique, cependant la nomenclature du caryotype la plus consensuelle est celle de Levan *et al.* (1964) (Tab. 1).

Le caryotype est représenté par une plaque métaphasique, un caryogramme et un idiogramme. Le caryogramme qui consiste, à partir d'une photographie d'une cellule en métaphase, à juxtaposer les chromosomes homologues, par ordre décroissant de longueur. L'idiogramme est la représentation idéale des chromosomes selon un diagramme établi à partir des mesures statistiques d'au moins 5 plaques métaphasiques. Il est le plus souvent haploïde. Dans le cas où il existe une homéologie (non homologie) entre les chromosomes d'une paire, il est souhaitable de présenter un idiogramme diploïde.

Tableau 1. Nomenclature chromosomique de Levan *et al.* (1964)

Position du centromère	d	r	Ic	Types chromosomiques
Point médian	0.0	1.0	50.0	Métacentrique s.s. (M)
Région médiane	0.0 – 2.5	1.0 – 1.7	50.0 – 37.5	Métacentrique (m)
Région submédiane	2.5 – 5.0	1.7 – 3.0	37.5 – 25.0	Submétacentrique (sm)
Région subterminale	5.0 – 7.5	3.0 – 7.0	25.0 – 12.5	Subtélocentrique (st)
Région terminale	7.5 – 10.0	7.0 – ∞	12.5 – 0.0	Acrocentrique (t)
Point terminal	10.0	∞	0.0	Télocentrique (T)

Bras court (BC); bras long (BL); d = BL – BC; r = BL/BC; Indice centromérique (Ic) = BC/ LT x100; longueur totale (LT); s.s: sensu stricto.

7-2- Hétérochromatine

La chromatine est la forme sous laquelle se présente l'ADN dans le noyau. Substance de base des chromosomes chez les eucaryotes, elle existe sous deux états différents de condensation: l'euchromatine et l'hétérochromatine. Heitz (1928), définit l'hétérochromatine comme les segments de chromosome qui apparaissent très condensés et très colorés, sous forme de chromocentres dans les noyaux interphasiques. Par contre, l'euchromatine a des états condensés et décondensés, qui varient en fonction du cycle cellulaire. Les régions hétérochromatiques sont très riches en séquences hautement répétées et en éléments transposables et ne contiennent pas de gènes, alors que les régions euchromatiques sont plus pauvres en éléments répétés mais sont riches en gènes (Schmidt *et al.* 1995; Samouelian *et al.* 2009).

Deux types principaux d'hétérochromatine peuvent être distingués:

- l'hétérochromatine facultative contient généralement des gènes qui peuvent être désactivés par l'hétérochromatinisation de l'ADN et dont le comportement est différent entre deux chromosomes homologues.
- l'hétérochromatine constitutive qui fait l'objet de ce travail, est constituée de séquences répétées, qui généralement n'ont pas de fonction codante, reste condensée en permanence. Elle présente le même aspect chez les chromosomes homologues et généralement localisée dans deux régions principales; près des centromères, et dans les télomères ou les constriction secondaires (cs) des

chromosomes porteurs des organisateurs nucléolaires (NORs- Nucleolar Organizing Regions) (Stebbins 1971). Selon Siljak-Yakovlev et Cartier (1986), l'hétérochromatine constitutive se trouve également dans les régions chromosomiques intercalaires (cas du complexe *Crepis praemorsa*). Un bras entier de chromosome et même un chromosome entier peuvent être hétérochromatinisés tels que les chromosomes sexuels du palmier dattier (Siljak-Yakovlev *et al.* 1996).

Différentes techniques de coloration ont été développées de façon à révéler des bandes caractéristiques sur les différents chromosomes et à pouvoir les identifier. La technique de coloration différentielle au Giemsa (C-banding) permet de visualiser l'hétérochromatine constitutive sur les chromosomes, quelle que soit sa constitution moléculaire, tandis que les fluorochromes, comme la chromomycine (CMA), et le 4',6- diamidino-2-phenylindole (DAPI)/Hoechst, révèlent l'hétérochromatine riche en bases GC ou AT, respectivement (Schweizer 1976).

En général, le profil de coloration ou "banding pattern" est identique pour les chromosomes homologues d'une garniture chromosomique. Les changements dans le profil de l'hétérochromatine (remaniements chromosomiques) qui concernent la quantité, la position et le type d'hétérochromatine peuvent apparaître lors de l'évolution chromosomique (Sumner 1990).

La fonction de l'hétérochromatine demeure encore obscure. L'hétérochromatine ferait partie de la famille grandissante des structures génétiques égoïstes. Cependant, sa présence dans le génome, à un moment précis, peut être à l'origine des remaniements chromosomiques importants au cours de l'évolution d'un groupe d'espèces proches comme c'est le cas des genres *Reichardia*, *Crepis* et *dinarica* (Siljak-Yakovlev 2000). Cet auteur considère l'hétérochromatine comme un marqueur de différenciation intra et interspécifique. Elle a aussi la fonction de protection des zones vitales du génome (organisateur nucléolaire et centromère), et aurait un rôle dans l'adaptation des plantes à des conditions de milieu difficiles.

7-3- Gènes ribosomiques

Deux familles de gènes ribosomiques sont les plus étudiés chez les angiospermes. Il s'agit des gènes 5S dont la fonction n'est pas tout à fait connue et 35S contrôlent la formation des nucléoles. Grâce à leur fonction de formation de nucléoles, les régions chromosomiques correspondantes sont connues sous le nom "d'organisateur nucléolaire" ou NORs. Ces gènes sont présents dans le génome des plantes en un nombre variable de copies en tandem, se trouvant dans un ou plusieurs loci. Les deux types d'ADNr sont classés parmi les séquences répétées d'ADN génomique de taille moyenne. Les unités codantes pour les deux familles sont hautement conservées dans tout le règne végétal et sont

souvent portées par des chromosomes séparés. Il existe un exemple de leur colocalisation chez les plantes supérieures (Garcia *et al.* 2007, 2009, 2010).

Le nombre et la localisation des gènes ribosomiques sont détectés par la technique d'hybridation *in situ* (FISH). Cette méthode est une application au matériel cytologique des techniques de biologie moléculaire utilisées pour les hybridations d'ADN *in vitro*. Ces techniques utilisent l'une des propriétés des acides nucléiques: la réassociation spécifique d'une molécule d'ADN simple brin marqué appelé sonde en solution, avec sa séquence complémentaire, appelée cible. Dans la méthode d'hybridation *in situ* sur chromosomes, l'acide nucléique cible est fixé dans sa situation originelle au sein du chromosome.

Les gènes ribosomiques permettent, en tant que marqueurs, d'identifier des chromosomes, apporter des informations utiles sur le plan phylogénétique au sein d'un complexe d'espèces proches et dans l'étude de l'évolution du génome.

8- Taille du génome

La cytométrie en flux (CMF) est une technique communément utilisée chez les plantes pour déterminer la taille et la composition en bases GC et AT du génome nucléaire (Siljak-Yakovlev *et al.* 2002), estimer le niveau de ploïdie (Kamaté *et al.* 2001) ainsi que pour la vérification de l'état hybride des plantes (Pires *et al.* 2004). La comparaison des valeurs –C constitue une voie naturelle pour expliquer les relations phylogénétiques et la systématique au sein de groupes de taxa étroitement apparentés (Bennett *et al.* 2000).

La technique de cytométrie en flux a été utilisée au début des années soixante comme méthode de numération cellulaire. Depuis les années 70, l'amélioration des techniques et l'augmentation de la précision de la détection ont permis d'utiliser la CMF pour mesurer des signaux émis par des constituants intracellulaires. Elle permet l'analyse de nombreux constituants cellulaires (chromosomes, acides nucléiques, lipides, protéines), d'organites isolés (noyaux, mitochondries, plastes), ou de certaines fonctions cellulaires (viabilité, activités enzymatiques, gènes rapporteurs, activités ioniques...). L'intérêt particulier de cette technique réside dans le fait qu'elle est rapide, ne nécessitant pas de préparation complexe de l'échantillon et qu'elle procure des résultats d'une grande précision. En quelques minutes, plus de 2000 noyaux de l'échantillon sont extraits, colorés et analysés (Brown *et al.* 1991).

Le cytomètre en flux (Fig. 2) se compose d'un système fluïdique, d'un système optique et d'un système électronique. Les noyaux à l'intérieur desquels un fluorochrome est fixé de façon spécifique sur l'ADN sont entraînés dans une veine liquide au travers de laquelle ils défilent devant un faisceau laser. Une source lumineuse d'une longueur d'onde choisie traverse ces éléments et provoque l'émission par le fluorochrome d'un signal lumineux qui est perçu et analysé par un système optique adapté. Le système optique est composé d'une source lumineuse, de filtres et de détecteurs (les photomultiplicateurs). Le système électronique met en forme ces signaux lumineux, les digitalise, et élabore les histogrammes. L'axe des abscisses de ces histogrammes qui sont monoparamétriques correspond à l'intensité de fluorescence des noyaux (exprimé en unités arbitraires), l'axe des ordonnées indique le nombre de noyaux mesurés.

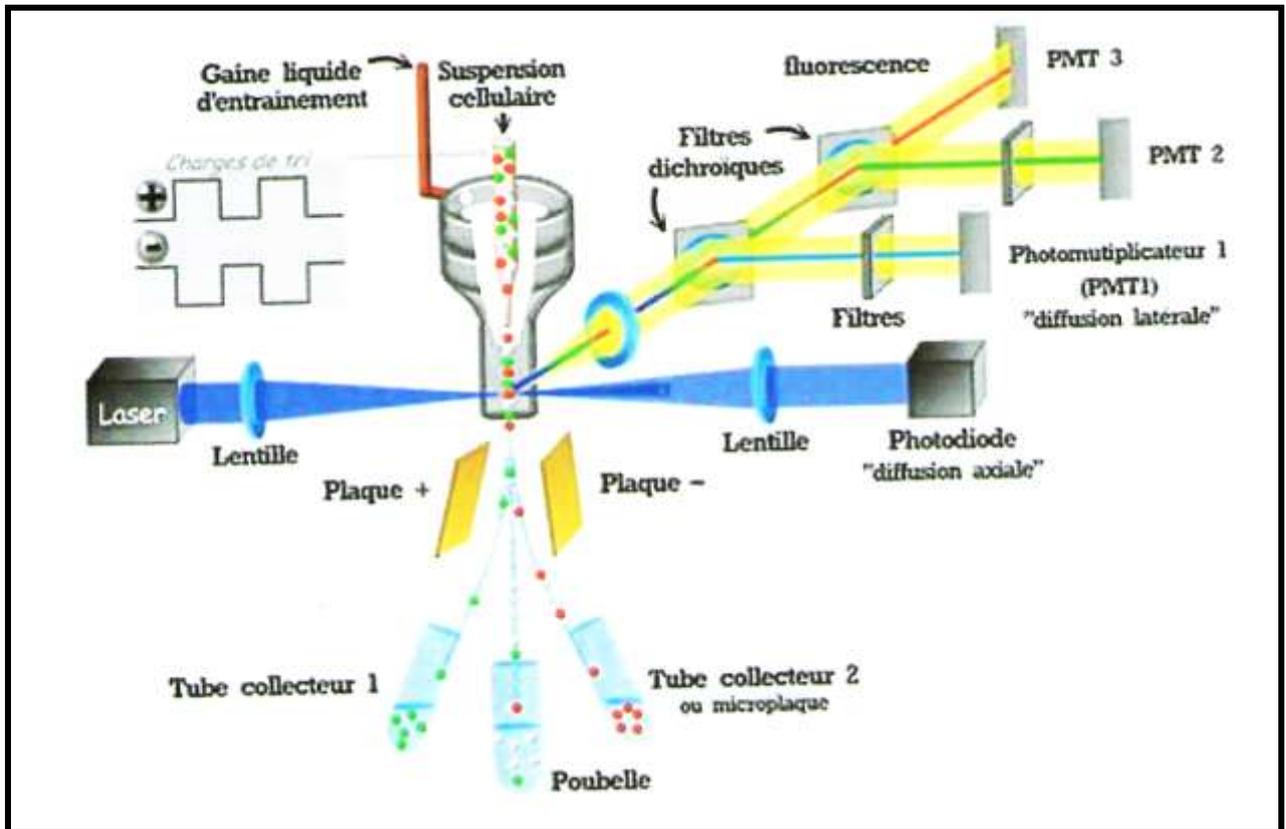


Figure 2. Représentation schématique d'un cytomètre en flux (Brown *et al.* 1991).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1- Matériel

Le matériel d'étude (graines et boutons floraux) provient de trois (3) espèces endémiques d'origine algérienne poussant dans des conditions naturelles: *Hedysarum pallidum* Desf., *Hedysarum naudinianum* Coss. et *Hedysarum perrauderianum* Coss. et Durieu. La récolte a été réalisée entre 2004 et 2007 par Benhizia H. et Benhizia Y., pendant le printemps et l'été (avril et mai pour les boutons floraux, juin et juillet pour les graines). L'identification des espèces a été faite sur la base de la flore d'Algérie de Quezel et Santa (1962).

Sur la carte géographique (Fig. 3) sont situées les zones de prélèvements des espèces étudiées. Le site du prélèvement des populations contaminées d'*H. pallidum* se situe à 3 Km au Nord de la région de Ain Babouche (Oum El Bouaghi). Cette région est dominée par le Djebel Hamimat (point culminant à 1039 m), les plaines occupent le reste de la région (850 à 950 m d'altitude) (Benhizia *et al.* 2003). La figure 4 indique en détaille les points de prélèvements des populations d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum*.

L'origine géographique des populations, l'étage bioclimatique et les dates de récolte du matériel végétal sont regroupés dans le tableau 2.

La taille des populations d'*H. perrauderianum* varie selon leur localisation. Les populations 1, 2, 3 et 4 (P1-P4) récoltées en bord de route, comptent 7-40 individus selon la population. Populations 5 et 6 (P5-P6) provenant d'une forêt claire de Pin d'Alep (*Pinus halepensis* Miller), comptent 50 à 100 individus. Selon la particularité de chaque population, le nombre d'individus récoltés varie de 5 à 20. Les populations contaminées d'*H. pallidum* présentent très peu de pieds.

Tableau 2. Origine géographique et étage bioclimatique des espèces étudiées.

Espèces	Nombre de Populations	Zone de prélèvement	Localisation	Altitude (m)	Latitude/Longitude	Étage bioclimatique	Date de récolte
<i>Hedysarum pallidum</i>	4	Aïn Babouche (Djebel Hamimat)	Oum El Bouaghi	850 à 950	35°36'19.1" N, 7°25'56.3"E 35°44'47.9" N, 7°10'43.7"E 35°58'18.4" N, 7°14'17.0"E 35°58'23.1" N, 7°07'38.5"E	Semi aride	2007
<i>Hedysarum naudinianum</i>	3	Aïn Sfa Aïn Roua Maoklane	Nord Sétif Nord Sétif Nord Sétif	900	36°19'40.0" N, 5°14'55.5"E 36°19'58.9" N, 5°13'37.6"E 36°22'57.4" N, 5°03'55.3"E	Sub humide Sub humide Sub humide	2004 2004 2005
<i>Hedysarum perrauderianum</i>	6	Ouled Tebane	Sud Ouest Sétif (Djebel Boutaleb)	1600	35°49'04.5" N, 5°08'51.8"E 35°49'04.5" N, 5°09'15.5"E 35°49'15.3" N, 5°10'06.8"E 35°49'18.9" N, 5°10'31.5"E 35°49'19.9" N, 5°10'40.6"E 35°49'21.8" N, 5°10'47.1"E	Semi aride	2005 2007

2- Méthodes

2-1- Etude de la mitose

- Germination des graines

Après scarification manuelle, pour lever la dormance tégumentaire, les graines sont mises à germer à température ambiante dans des boîtes de Pétri tapissées de papier filtre imbibé d'eau distillée. La durée de la germination varie de 3 à 5 jours selon l'espèce. Un séjour préalable à basse température (4°C) augmentait le pourcentage de germination de la nouvelle récolte.

- Prétraitement

Nous avons déterminé la période de la journée pendant laquelle le coefficient mitotique était le plus important; celle-ci se situe le plus souvent entre 8h et 11h. Plusieurs tentatives ont été faites pour déterminer les substances cytostatiques et la durée de prétraitement convenant le mieux au matériel étudié. Pour bloquer les divisions cellulaires au stade métaphase, les racines de longueur comprise entre 1 et 1.5 cm, sont prélevées le matin et plongées dans une solution de colchicine (0.05%) (Annexe 1) pendant 2h 30min à température ambiante ou dans une solution de 8-hydroxyquinoléine (0.002%) (Annexe 1) pendant 3 heures, à l'obscurité, à 16°C.

- Fixation et conservation

Les racines sont ensuite fixées dans de l'éthanol acétique (3:1; V/V) pendant 24 à 48h à 4°C. Le matériel prétraité et fixé peut être conservé plusieurs mois dans de l'alcool à 70% à 4°C.

Le prélèvement, le prétraitement, la fixation et la conservation des méristèmes racinaires sont des étapes communes à toutes les techniques de cytogénétique qui seront décrites dans les paragraphes suivants.

2-1-1- Techniques de cytogénétique classique

2-1-1-1- Coloration de Feulgen

- Hydrolyse

Après rinçage à l'eau distillée, les pointes racinaires sont hydrolysées dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N) à 60°C pendant un temps variable selon l'espèce étudiée (10 à 15min). L'hydrolyse a pour but de ramollir les méristèmes et de libérer les groupements aldéhydes de l'ADN. Elle facilite, par ailleurs, l'écrasement et l'étalement des cellules.

- Coloration

La coloration est réalisée selon la technique de Feulgen et Rossenbeck (1924). Les extrémités racinaires sont colorées au réactif de Schiff (Annexe 1) durant 30min à 3h à l'obscurité et à la température ambiante. Les groupements aldéhydes, libérés par l'hydrolyse, mis en présence du réactif de Schiff, donnent une couleur rouge aux chromosomes.

- Ecrasement

L'écrasement est effectué selon la méthode d'Östergren et Haneen (1962). Les apex colorés sont sectionnés et déposés sur une lame dans une goutte de carmin acétique à 1% (Annexe 1) ou bien dans de l'acide acétique à 45%. La préparation est recouverte d'une lamelle et écrasée doucement en tapotant à l'aide d'une tige en bois. L'étalement peut être accentué par un léger chauffage en passant rapidement la lame au dessus d'une flamme.

- Montage

Le montage des lames est réalisé selon la technique de Conger et Fairchild (1953). Pour obtenir des préparations permanentes, les lamelles sont décollées à la neige carbonique, rincées à l'éthanol absolu et séchées à l'air libre pendant 24h. Les lames sont ensuite montées au Depex.

L'analyse du caryotype est basée sur la méthode de Levan *et al.* (1964). Les mesures (en mm) des longueurs des bras longs et des bras courts des chromosomes sont faites sur des photographies de six plaques métaphasiques rigoureusement sélectionnées et appartenant à différents individus de la même population. Par la suite, la longueur réelle des chromosomes est calculée en micromètre. La position et l'épaisseur des bandes hétérochromatiques sont définies par les distances entre le centromère et les bords inférieurs et supérieurs de chaque bande. Les chromosomes sont classés par ordre décroissant. L'asymétrie liée à la morphologie des chromosomes est évaluée par l'indice d'asymétrie IAs% selon la formule d'Arano et Saito (1980): $IAs\% = 100 \times (\text{somme des longueurs des bras longs}) / (\text{somme des longueurs totales})$. Les valeurs de l'indice d'asymétrie sont comprises entre 50 et 100%. L'asymétrie liée à la taille des chromosomes (R) est évaluée par le rapport entre la plus grande et la plus petite des paires chromosomiques.

2-1-1-2- Coloration différentielle au Giemsa (C-banding)

La coloration différentielle au Giemsa (C-banding) pour l'étude structurale des chromosomes est réalisée en appliquant la technique développée par Falistocco et Maurelli (1990) sur l'espèce *H.*

coronarium L., à laquelle nous avons apporté quelques modifications. Jusqu'à l'hydrolyse, les étapes sont identiques à celles de la coloration de Feulgen.

- Les pointes racinaires sont écrasées dans une goutte d'acide acétique à 45% (solution fraîchement préparée) entre lame et lamelle.
- Les préparations sont observées au microscope (contraste de phase de type Zeiss) pour s'assurer de la présence des plaques métaphasiques.
- Les lamelles sont décollées à la neige carbonique et les lames rincées à l'éthanol, sont mises à sécher pendant au moins une nuit à température ambiante.
- Après séchage, la dénaturation est effectuée dans une solution saturée d'hydroxyde de baryum $Ba(OH)_2$, pendant 5min pour *perrauderianum* et 10min pour *naudinianum* à 45°C. Cette étape permet la séparation des deux brins d'ADN de chaque chromosome.
- Les lames lavées à l'eau distillée, subissent la renaturation dans le tampon 2 x SSC (Salt Sodium Citrate) (Annexe 1) à 60°C au bain-marie pendant 30min pour *perrauderianum* et 15 à 20min pour *naudinianum*, suivie d'un rinçage à l'eau de robinet et dans l'alcool à 95%. C'est l'étape de la réassociation des deux brins d'ADN.
- La coloration est obtenue par immersion des lames dans une solution de Giemsa à 3% dans le tampon phosphate à pH 6.8 pendant 20min à température ambiante. Chimiquement ce sont des liaisons qui se forment entre l'ADN et les composants de Giemsa.
- Les lames sont enfin rincées à l'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant, séchées pendant une nuit puis montées au Dépex.

L'hétérochromatine constitutive (partie de la chromatine) détectée par le Giemsa, a été aussi révélée avec le 4',6 diamidino-2-phenylindole (DAPI) utilisé après la FISH.

L'observation des lames colorées au Feulgen et au Giemsa est réalisée au microscope photonique (x10 et 100). Les photographies sont prises par un microscope Orthoplan de type Zeiss Axioscop munie d'une caméra CCD Sony.

2-1-2-Techniques de cytogénétique moléculaire

Pour le fluorochrome banding et la FISH, il est nécessaire de travailler sur des plaques métaphasiques libérées des parois pectocellulosiques et du cytoplasme. Pour cela nous préparons des protoplastes.

La technique de préparation des protoplastes appliquée est celle de Geber et Schweizer (1987) légèrement modifiée pour notre matériel. Les racines sont rincées 10min dans le tampon citrate 0.01 M et pH 4.6, et digérées 15 à 30min (selon l'espèce) à 37°C dans 200 µl de solution enzymatique R [4% cellulase R10 (Onosuka Yakult Honsha Co. Tokyo, Japan), 1% pectolyase Y-23 (Seishin Co. Tokyo, Japan) et 4% hemicellulase (Sigma Chemical Co.)] (Annexe 2). La digestion a pour but d'éliminer la paroi cellulaire, le cytoplasme et de libérer les noyaux interphasiques et les chromosomes plus ou moins condensés. C'est une étape critique et difficile à maîtriser. La durée de digestion ne doit pas être trop courte, sans quoi les chromosomes sont encore entourés d'un voile de cytoplasme qui les rend inaccessibles aux sondes d'ADN utilisées, ni trop longue sous peine de dégrader les chromosomes. Les protoplastes sont obtenus en utilisant deux méthodes:

Méthode 1: après digestion, les pointes racinaires sont récupérées sous la loupe binoculaire et placées sur des lames dans une goutte d'acide acétique à 45% fraîchement préparé. A l'aide d'une aiguille, la pointe est dilacérée finement puis couverte d'une lamelle et écrasée légèrement afin d'étaler les cellules. Les lames sélectionnées sont placées à -80°C. Après délamellation, les lames sont laissées sécher au moins 24 h avant utilisation. Cette technique est préconisée dans le cas où le matériel végétal n'est pas abondant ou si les divisions cellulaires sont rares.

Méthode 2: préalablement digérées par des enzymes pectocellulosiques, la solution enzymatique est centrifugée 5min à 4000 tr/min puis enlevée délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur. Les protoplastes en suspension obtenus sont lavés trois fois dans 100 µl de tampon citrate (centrifugation entre chaque lavage) et fixés dans 50 µl d'éthanol acétique (3:1; V/V). Une goutte de la suspension fixée est déposée sur une lame propre, laissée sécher à l'air et conservée à température ambiante jusqu'à utilisation.

L'observation des plaques métaphasiques est effectuée au microscope à contraste de phase (x10 et 40), et le repérage des meilleures plaques à l'aide d'une lame graduée (England finder de chez Oxford instruments).

2-1-2-1- Marquage des bases GC par coloration à la chromomycine A₃ (Fluorochrome banding)

Pour détecter les régions d'ADN riches en bases GC, la coloration à la chromomycine A₃ (CMA₃) est effectuée selon la méthode de Schweizer (1976) avec de légères modifications (Siljak-Yakovlev *et al.* 2002). Pour réhydrater la préparation, on dépose sur la lame plusieurs gouttes du tampon McIlvaine pH 7 (Annexe 2) additionné de MgSO₄ à 0.005 M pendant 15 ou 10min. On élimine le tampon avant de déposer une grosse goutte de chromomycine A₃ (0.2 µl/ml). (Annexe 2). On laisse colorer pendant 1h à l'obscurité puis on rince rapidement avec le même tampon avant d'effectuer une contre coloration par du vert de méthyle (0.1% dans le tampon McIlvaine à pH 5.5) pendant 10min à l'obscurité également. Les préparations sont ensuite rincées avec le même tampon, drainées puis montées dans une goutte de Citifluor AF1 (Agar Ltd).

Les lames colorées à la chromomycine ont été décolorées dans un fixateur (3:1; V/V d'éthanol: acide acétique glacial), déshydratées dans une série de bains d'éthanol à concentrations croissantes (70%, 90%, 100%) (3min/chaque bain), séchées à température ambiante pendant au moins 12h, et ensuite utilisées pour l'hybridation *in situ* par fluorescence.

2-1-2-2- Hybridation *in situ* par fluorescence

La FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization) repose sur la capacité des fragments d'ADN marqués par un ou plusieurs fluorochromes, employés comme sondes, de s'hybrider avec un ADN complémentaire présent dans des cellules fixées et observées en microscopie photonique à fluorescence.

- Préparation des sondes

Nous avons hybridé *in situ* deux types de sondes pour localiser les sites d'ADN ribosomal: la sonde d'ADNr 35S est un clone d'un fragment EcoRI de 4 kb contenant une partie de l'ADNr (35S) d'*Arabidopsis thaliana*. La sonde d'ADNr 5S est un clone pTa794 contenant un fragment BamHI de 410 pb du gène 5S provenant du blé (Gerlach et Dyer 1980). Les sondes 5S et 35S ont été marquées respectivement avec les fluorochromes digoxigénine-11-dUTP (vert) (Roche Diagnostics) par la technique de Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR), et cyanine (CY3: rouge) (Amersham) par la technique enzymatique Nick-Translation en suivant les instructions du fabricant du kit Amersham. L'hybridation *in situ* ADN/ADN est réalisée selon la méthode de Heslop-Harrison *et al.* (1991) avec de légères modifications.

- Traitement des protoplastes

Dans le cas où les lames sont préparées depuis deux semaines, pour bien conserver la morphologie des chromosomes, une re-fixation dans l'éthanol acétique (3:1; V/V) pendant 10min est conseillée. Les lames sont ensuite traitées à la RNase (Annexe 2). Les lames reçoivent 200 µl de solution et sont recouvertes d'une lamelle plastique. Elles sont placées dans une chambre humide imbibées de tampon 2 x SSC, et laissées incuber pendant 1h, dans une étuve à 37°C. Après 3 lavages de 5min chacun à température ambiante dans du 2 x SSC, les lames sont placées 2min dans une solution d'HCl 0.01M, puis traitées avec 60 µl de solution de pepsine (Annexe 2) et recouvertes par une lamelle plastique pendant 5min (selon l'espèce et la quantité de cytoplasme). La pepsine libère les chromosomes d'une partie des protéines par digestion et les rend plus accessibles à la sonde. Si les chromosomes sont sans cytoplasme, le traitement à la pepsine n'est pas nécessaire.

Les lames sont ensuite lavées 3 fois/ 5min dans une solution de 2 x SSC à température ambiante. Elles sont déshydratées dans une série de bains d'éthanol froid (-20°C) à concentrations croissantes: 70%, 90% et 100% (3min chacun) puis mises à sécher à température ambiante en position verticale au moins 30min (ne jamais dépasser 2h). Pendant ce temps, nous préparons la mixture de sondes d'hybridation dont la composition est reportée dans le tableau 3.

Tableau 3. Composition du mélange d'hybridation

Produits	Quantité pour 1 lame (µl)	Quantité pour 9 lames (µl)	Concentration finale	Rôles
Formamide pur	25	225	50%	Améliore la dénaturation
Dextran sulfate	10	90	10% m/v	Forme un réseau autour de la sonde
SDS 10%*	3	27	0.1% m/v	Détergent
Sperme de saumon	1.5	13.5	250 µl/mg	Bloque les sites pour éviter les fixations aspécifiques
20 x SSC	5	45		Solution saline
H₂O pure	q.s.p. à déterminer			Le volume ajouté dépend du volume de sonde ajouté
ADN 35S		9		Sonde préparée par Nick-Translation
ADN 5S	20 à 30 ng/lame		9	Sonde préparée par PCR
Volume final	50	450		

q.s.p: quantité suffisante pour, (*): préparé dans l'eau ultra pure.

- Dénaturation de la sonde

Le mélange d'hybridation est placé 10min à 70°C (70% formamide dans 2 x SSC) afin de dénaturer les sondes puis refroidit immédiatement dans de la glace pendant au moins 5min. Les sondes peuvent être aussi dénaturées en même temps que les chromosomes.

- Hybridation

L'hybridation est réalisée en déposant 50 µl du mélange de la mixture de la sonde dénaturée par lame et on recouvre le tout d'une lamelle plastique. Les lames sont placées dans une boîte hermétique mise dans un bain-marie à 72°C pendant 10min afin de dénaturer les chromosomes, 5min à 55°C, puis incubées toute une nuit dans une chambre humide à 37°C, température d'hybridation (le temps d'incubation peut varier jusqu'à quatre jours afin que les chromosomes et les sondes se renaturent et s'hybrident).

- Lavages

Les lavages sont destinés à débarrasser les lames de l'ADN sonde non hybridé spécifiquement. Ils sont réalisés à température ambiante et à 42°C. Une température plus élevée augmente la spécificité d'hybridation, mais diminue l'intensité du signal fluorescent. Sous agitation lente, une série de lavages de stringence est alors pratiquée (la composition des solutions de lavage est donnée en annexe 2):

- 3min dans du 2 x SSC à température ambiante,
- 3 x 5min dans du 2 x SSC à 42°C,
- 2 x 5min dans du formamide à 20% 2 x SSC à 42°C,
- 5min dans du 0.1 x SSC à 42°C,
- 3 x 5min dans du 2 x SSC à 42°C,
- 5min dans du 4 x SSCT à 42°C,
- 5min dans du 4 x SSCT à température ambiante.

Après le dernier lavage, les lames sont drainées sur un papier buvard et laissées sécher quelques instants à température ambiante.

- Traitement des lames avec un tampon de détection (préparé extemporanément)

Les lames sont traitées avec un tampon de détection; 100 µl/lame de BSA 5% (Bovine serum albumin) (Annexe 2). Les préparations sont recouvertes d'une lamelle plastique pendant 5min à température ambiante puis l'excès de BSA est éliminé sans rinçage et la lamelle est enlevée délicatement.

- Détection avec l'anti-digoxigénine-fluorescéine

Les sondes marquées sont détectées avec de l'anti-digoxigénine conjugué à la fluorescéine. On prépare la solution d'incubation en mettant 6 µl anti-digoxigénine dans 444 µl de tampon de détection BSA 5%. On dépose 50 µl de cette solution par lame, puis on la recouvre d'une lamelle plastique. Les lames sont incubées à 37°C pendant 1h dans une chambre humide. Trois (3) lavages de 5min chacun dans du 4 x SSC sont réalisés sous agitation lente et à température ambiante.

- Contre-coloration

La contre-coloration est destinée à colorer entièrement les chromosomes. Les préparations sont contre colorées par du DAPI à 2 µl/ml dans le tampon McIlvaine à pH 7, pendant 10 à 20min. Un rinçage est ensuite effectué avec du 4 x SSCT. Les lames sont ensuite montées dans une goutte de

Citifluor AF₂. Les préparations peuvent être montées directement dans un milieu de montage (Vectashield) contenant le DAPI. Dans ce cas la contre coloration au DAPI n'est pas nécessaire. Une lamelle de verre est délicatement posée au dessus en évitant la formation de bulles. L'excédent de liquide est éliminé en pressant doucement la lame à travers le papier filtre (une couche trop épaisse de milieu de montage rend la mise au point au microscope très difficile, surtout à l'objectif 100). Les lames sont ensuite scellées avec du Rubber Cement.

- *Observations*

Les observations sont effectuées à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot équipé d'un coulisseau portant les filtres d'excitation et d'émission adaptés aux fluorochromes utilisés: 07 pour la chromomycine A₃ (excitation 436-460 nm, émission > 520 nm); 01 pour le DAPI (longueur d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission > 397 nm); 09 (excitation 490 nm, émission 525 nm) pour les marquages de l'ADNr 35S et le filtre 15 (excitation 540-560 nm, émission 580nm) pour les marquages de l'ADNr 5S. Les signaux d'hybridation sont analysés en utilisant une caméra CCD de haute sensibilité (Princeton Instrument, Evry, France) couplée à un logiciel d'acquisition et de traitement d'images (Metavue). Deux images sont prises pour chaque champ de vue: une image de d'ADN 35S (en rouge) et une image de l'ADNr 5S (en vert). Les deux images (rouge et verte) sont superposées.

Un récapitulatif du principe de la technique de l'hybridation *in situ* est représenté en annexe 2.

2-1-3- Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent permet de dénombrer les nucléoles qui indiquent l'activité transcriptionnelle des gènes 35S. Elle est réalisée selon la méthode proposée par Howell et Black (1980) avec une modification mineure. Les jeunes racines sont rincées à l'eau distillée 5 fois jusqu'à l'élimination totale du fixateur et plongées dans une solution de nitrate d'argent (AgNO₃) à 7.5%, pH 5.5 à 60°C pendant toute une nuit.

La révélation s'est effectuée dans le mélange hydroquinone 1% et formaldéhyde 10 % (V/V) pendant 15min jusqu'à ce qu'elles deviennent jaune marron. Les racines sont rincées à l'eau distillée et écrasées dans l'acide acétique à 45%. Le nombre de nucléoles est déterminé chez cinq individus pour chacune des populations et 50 noyaux en interphase pour chaque individu sont observés au microscope photonique.

2-2- Etude de la méiose

Les comportements méiotiques sont analysés au niveau des cellules mères des grains de pollen (CMP) afin de déterminer les associations chromosomiques et de noter les anomalies. La méiose est généralement observée dans la partie médiane des inflorescences en grappe. La gaméto-genèse est asynchrone au niveau de la grappe. Les meilleurs moments de prélèvement, à forte activité méiotique, sont réalisés en début de matinée (température fraîche et humidité élevée). Les jeunes boutons floraux sont fixés dans la solution de Carnoy I (Ethanol-acide acétique 3:1; V/V) pendant 48h et conservés à l'éthanol à 70% à 4°C. Après lavage, une hydrolyse acide est réalisée pendant 1 à 3min dans une solution d'HCl 1N à 60°C. La coloration des boutons floraux se fait dans le réactif de Schiff pendant une demi-heure à l'obscurité et à température ambiante ou dans du carmin acétique à 1%. Le montage est effectué après dissection des anthères sous loupe binoculaire. L'observation des lames et la prise des photographies sont réalisées de la même manière que pour la coloration au Feulgen et au Giemsa.

2-3- Test de viabilité et mesure des grains de pollen

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

Le dénombrement des grains de pollen est réalisé au microscope photonique (x10). L'observation a porté sur 300 grains de pollen par fleur. Cinq pieds par population ont été ainsi traités. La viabilité pollinique est exprimée en pourcentage (V%) par le rapport du nombre de grains de pollen viables (NGPV) sur le nombre total de grains de pollen viables et non viables (NGPT):

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

- Mesure du pollen

La méthode de Wodehouse (1935) est utilisée pour s'assurer de l'abondance relative des grains de pollen et de leur état dans chaque échantillon prélevé. Le pollen est lavé plusieurs fois dans l'alcool absolu directement sur la lame, puis monté dans la gélatine glycéinée colorée par la fuschine.

Les préparations du pollen montées dans la gélatine glycéinée se conservent de façon durable, mais il est fortement déconseillé d'entreprendre les mesures avant la stabilisation définitive du volume des grains de pollen. Il est connu que les grains de pollen continuent à gonfler dans le milieu de montage pendant un certain temps. Ce temps de "maturation" peut varier d'une espèce à l'autre et dans les meilleurs des cas, il faut attendre au moins 4 semaines avant de commencer les mesures (Reitsma 1969 in Siljak-Yakovlev 1986). Faegri et Deuse (1960) ont démontré qu'un long séjour dans la gélatine glycéinée peut entraîner un gonflement de l'ordre de 10% au moins du diamètre de certains grains. Pons et Boulos (1972) ont trouvé 8 à 9% de différence entre les mesures effectuées juste après le montage et celles faites un mois plus tard. Les mêmes auteurs indiquent que ce gonflement peut s'étaler sur quatre mois. En outre, la taille du pollen change et se trouve directement proportionnelle au taux de compression imposé au grain par la lamelle.

La terminologie utilisée pour la description des grains de pollen est celle d'Erdtman (1952) et de Punt *et al.* (1994) dont les principaux termes sont reportés dans l'annexe 4. Elle concerne:

- la forme et la symétrie du grain de pollen,
- les dimensions de l'axe polaire (P) et de l'axe équatorial (E),
- le nombre des apertures.

Des mesures effectuées sur les grains de pollen ont contribué à leur identification. L'axe polaire (P) et l'axe équatorial (E) sont mesurés sur 50 grains pour pouvoir calculer la moyenne. Les observations et les photographies sont réalisées avec un photomicroscope type LEICA DM4000 B LED (x10). Les mesures sont effectuées avec un logiciel Méta Morph MM AF 1.8.

2-4- Cytométrie en flux

La CMF repose sur le principe de la mesure de la fluorescence émise par des objets isolés et colorés. L'ADN total de trois espèces du genre *Hedysarum* est déterminé par cytométrie en flux selon la méthode de Marie et Brown (1993). L'analyse est effectuée sur une suspension de noyaux pour éliminer l'autofluorescence des nombreux pigments présents dans la cellule. Les jeunes feuilles bien développées sont considérées comme un tissu représentatif de la ploïdie de la plante. *Petunia hybrida* (Hook) Vilm. cv. 'PxPc6' ($2C = 2.85$ pg) pour les diploïdes *H. naudinianum* et *H. pallidum* et *Pisum sativum* L. cv. 'Long Express' ($2C = 8.37$ pg) pour l'espèce tétraploïde *H. perrauderianum* sont utilisés comme standards pour calibrer l'appareil et étalonner (étalon interne) l'échelle de fluorescence. Les morceaux des feuilles des espèces étudiées et des étalons standards, de 1 à 2 cm² sont placés dans une boîte de Pétri, coupés finement et rapidement à l'aide d'une lame de rasoir dans 600 µl de tampon afin de libérer des milliers de noyaux. Le choix du tampon dépend de l'espèce et du fluorochrome utilisé. C'est le tampon Galbraith (Galbraith *et al.* 1983), additionné de 0.1% (m/v) de Triton X-100, 10 mM de métabisulfite de sodium et 1% polyvinylpyrrolidone (PVP 10.000), qui s'est révélé être le plus efficace. La suspension est ensuite filtrée avec des filtres en Nylon à maille de 48 µm de diamètre et récupérée dans un tube à hémolyse placé à 4°C. Il est par contre nécessaire d'ajouter dans la suspension filtrée de la RNase (2.5 U/ml, Roche) à 4°C pendant 15min afin d'éviter le marquage de l'ARN. Les noyaux sont traités avec 50 µg /ml d'iodure de propidium, un intercalant fluorescent spécifique de l'ADN, pendant 5min. Il se positionne entre toutes les bases de la séquence double brin et produit donc une fluorescence directement proportionnelle à la taille du génome. La fluorescence rouge des noyaux est considérée comme une fonction linéaire de la teneur relative en ADN (Brown *et al.* 1991). Environ 5000 à 10.000 noyaux pour chaque échantillon sont analysés pour générer chaque histogramme.

Pour estimer la taille du génome, cinq échantillons pour chaque espèce sont analysés séparément et au moins 3 mesures par individu sont effectuées dans les mêmes conditions d'expérimentation. La moyenne, l'erreur standard et un coefficient de variation sont calculés pour chaque espèce. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un cytomètre en flux EPICS Elite EPS (Beckman-Coulter, Roissy, France) utilisant le Laser Argon à 532 nm pour l'iodure de propidium à une intensité lumineuse de 20Mw ou avec un cytomètre en flux PARTEC (des essais répétés ont confirmé que les deux machines donnent les mêmes résultats).

La quantité d'intercalant fixée mesure un critère standardisé: la valeur C qui correspond à la quantité d'ADN nucléaire haploïde, c'est-à-dire la taille du génome du lot haploïde de chromosomes et est exprimée en picogrammes (1pg ADN = 978 Mpb d'après Dolezel *et al.* 2003). Le volume total d'ADN évalué à partir de la phase G1 du cycle cellulaire correspond à la quantité 2C ADN d'un individu (Bennett *et al.* 1998).

La quantité totale 2C ADN est calculée entre l'échantillon et le standard selon la formule suivante:

$$\text{Quantité d'ADN 2C de l'échantillon en (pg)} = \frac{\text{intensité de l'échantillon 2C} \times \text{quantité d'ADN 2C du standard}}{\text{intensité du standard 2C}}$$

$$\text{Quantité d'ADN 1C en méga paires de base (Mpb)} = \frac{\text{valeur 2C ADN de l'échantillon (pg)} \times 978 \text{ Mpb}}{2}$$

Cx = quantité du génome monoploïde avec pour nombre chromosomique de base x (calculé en divisant la valeur 2C par le niveau de ploïdie) (Greilhuber *et al.* 2005).

Chapitre 3

Résultats

Au cours de ce travail, rappelons que nous avons réalisé pour la première fois une étude cytogénétique classique et moléculaire sur les espèces *H. naudinianum* et *H. perrauderianum*. Cette dernière a fait l'objet d'une publication (Benhizia *et al.* 2013). *H. pallidum* a fait l'objet d'une étude cytogénétique classique (Benhizia 2001; Benhizia *et al.* 2003), nous l'avons complété par une étude moléculaire.

1- Dénombrement chromosomique

Toutes les populations récoltées d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum* ont fait l'objet de dénombrement chromosomique aussi bien en mitose somatique, qu'en méiose pollinique. L'observation des plaques métaphasiques et des cellules méiotiques au stade diacinèse d'*H. naudinianum* montre un nombre chromosomique constant $2n = 2x = 16$ chromosomes et 8 bivalents chez les trois populations. Cette espèce a donc un caryotype diploïde (Fig. 5a, d). Pour *H. perrauderianum*, le nombre chromosomique tétraploïde $2n = 4x = 32$ a été trouvé dans toutes les populations étudiées. Cependant, dans deux populations de bord de route, nous avons observé en mitose et en méiose et au sein d'un même individu, des cellules à 32 et à 18 chromosomes (Fig. 5b, c) et à 16 et 9 bivalents (Fig. 5e, f). Le nombre des plaques métaphasiques à $2n = 32$ chromosomes est nettement supérieur.

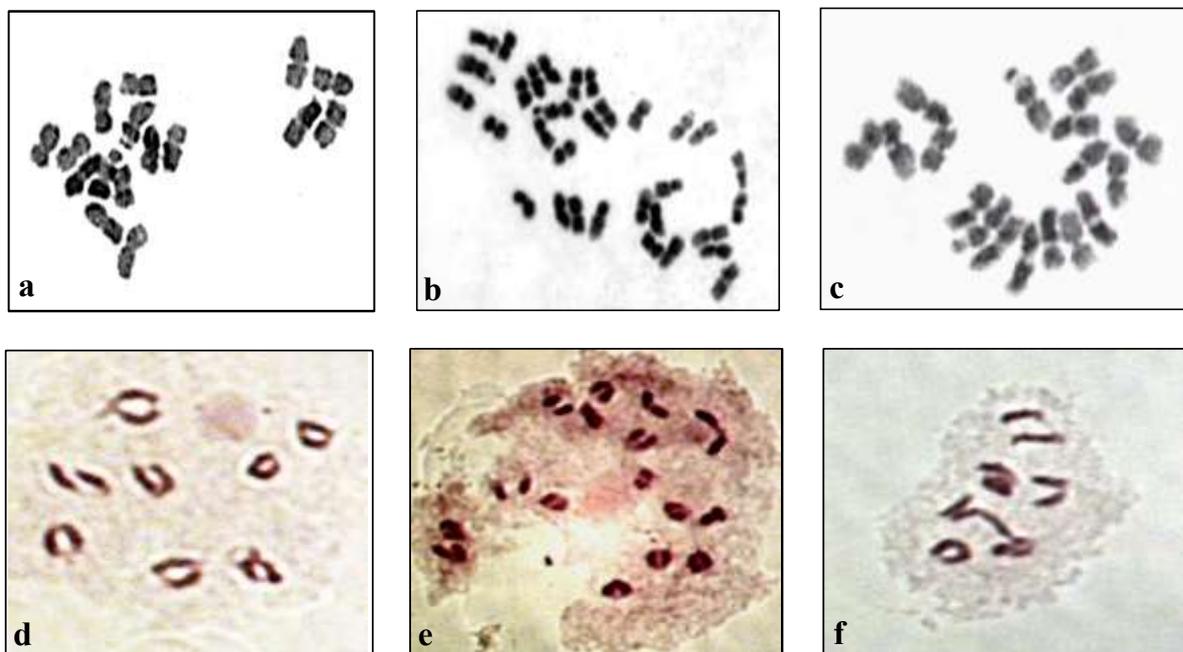


Figure 5. Mitose et méiose pollinique: (a, b, c) plaques métaphasiques à $2n = 2x = 16$ chromosomes chez *H. naudinianum*; $2n = 4x = 32$ et $2n = 18$ chromosomes chez *H. perrauderianum* respectivement; (d, e, f) stades diacinèse à 8 bivalents chez *H. naudinianum*; 16 et 9 bivalents chez *H. perrauderianum* respectivement.

2- Caryotype

Les données morphométriques sont regroupées dans le tableau 4 pour le diploïde *H. naudinianum* et 5 pour le tétraploïde *H. perrauderianum*. Des caryogrammes pour chacune des espèces ont pu être établis. Le calcul des données numériques du caryotype a permis d'élaborer les idiogrammes haploïdes selon la longueur décroissante des chromosomes.

Le caryotype d'*H. naudinianum* est caractérisé par la présence de huit (8) paires de chromosomes, dont une paire satellifère. Les satellites se trouvent sur les bras courts et ont une longueur moyenne de $0.53 \pm 0.04 \mu\text{m}$. Le caryogramme présente le même type chromosomique (métacentrique) à l'exception de la paire satellifère (N°6) qui est submétacentrique. Cette dernière présente une constriction secondaire sur le bras long (sm-cs) (Fig. 6b). La formule chromosomique est la suivante:

$$2n = 2x = 16 = 7 m + 1 \text{ sm-cs-sat}$$

Nous n'avons pas observé de grandes variations dans la taille des chromosomes pour les trois populations. La longueur totale moyenne des chromosomes varie de 2.04 à $3.06 \mu\text{m}$. Tous les chromosomes sont sensiblement de la même dimension (Fig. 6c). Les valeurs du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte ($R_S = 1.35$; $R_R = 1.23$; $R_{M_0} = 1.40$) et les valeurs de l'indice d'asymétrie ($IAS_S\% = 56.12$; $IAS_R\% = 56.51$; $IAS_{M_0}\% = 56.25$) sont faibles.

Le caryotype du tétraploïde *H. perrauderianum* est caractérisé par la présence de 16 paires de chromosomes, dont deux satellifères (paires 6 et 11). Les satellites dont la longueur moyenne varie de $0.40 \pm 0.12 \mu\text{m}$ pour la paire 6 à $0.66 \pm 0.08 \mu\text{m}$ pour la paire 11 se trouvent sur les bras courts. La taille, le type morphologique des chromosomes sont sensiblement les mêmes pour l'ensemble des populations. Pour cela, les données numériques concernant la garniture chromosomique, de seulement de deux populations (P2 et P5) provenant de milieux écologiques différents, sont présentées dans le tableau 5 (les données morphométriques des populations P1, P3, P4 et P6 sont consignées dans l'annexe 3).

Le calcul de l'indice centromérique (I_c) et le rapport du bras long sur le bras court (BL/BC) montrent que les chromosomes sont de type métacentrique pour la majorité sauf pour la dixième paire qui est submétacentrique (Fig. 7b). La formule chromosomique est donc la suivante:

$$2n = 4x = 32 = 13m + 1sm + 2m\text{-sat}$$

Tableau 4. Données morphométriques du caryotype d'*H. naudinianum*

Population de Aïn Sfa

PCh	BL (µm)	BC (µm)	LT (µm)	r	Ic	LR(‰)	t
1	1.58 (0.03)*	1.18 (0.02)	2.76	1.34	42.75	142.12	m
2	1.44 (0.01)	1.32 (0.00)	2.76	1.09	47.82	142.12	m
3	1.50 (0.15)	1.02 (0.10)	2.52	1.47	40.48	129.76	m
4	1.28 (0.15)	1.22 (0.05)	2.50	1.05	48.80	128.73	m
5	1.32 (0.13)	1.08 (0.18)	2.40	1.22	45.00	132.58	m
6	1.48 (0.03)	0.76 (0.11)	2.24	1.95	33.93	115.34	sm-cs-sat
7	1.22 (0.08)	0.98 (0.06)	2.20	1.24	44.55	113.28	m
8	1.08 (0.02)	0.96 (0.09)	2.04	1.12	47.06	105.04	m
IAs%	56.12						
R	1.35						

Population de Aïn Roua

1	1.62 (0.10)	1.10 (0.00)	2.72	1.47	40.44	135.19	m
2	1.45 (0.10)	1.24 (0.03)	2.69	1.17	46.10	133.70	m
3	1.50 (0.02)	1.12 (0.07)	2.62	1.34	42.75	130.22	m
4	1.60 (0.10)	0.97 (0.04)	2.57	1.65	37.74	127.73	m
5	1.32 (0.02)	1.22 (0.02)	2.54	1.08	48.03	126.24	m
6	1.27 (0.02)	0.80 (0.12)	2.26	1.82	35.39	116.20	sm-cs-sat
7	1.27 (0.02)	1.00 (0.10)	2.27	1.27	44.05	112.82	m
8	1.20 (0.00)	1.00 (0.16)	2.20	1.12	40.55	109.34	m
IAs%	56.51						
R	1.23						

Population de Maoklane

1	1.70 (0.00)	1.36 (0.18)	3.06	1.25	44.44	149.41	m
2	1.50 (0.10)	1.22 (0.08)	2.72	1.23	44.85	132.81	m
3	1.53 (0.37)	1.15 (0.08)	2.68	1.33	42.91	130.86	m
4	1.36 (0.06)	1.25 (0.05)	2.61	1.09	47.89	127.44	m
5	1.40 (0.00)	1.17 (0.09)	2.57	1.20	45.53	125.49	m
6	1.54 (0.10)	0.82 (0.18)	2.36	1.87	34.74	115.23	sm-cs-sat
7	1.31 (0.09)	0.99 (0.06)	2.30	1.32	43.04	112.30	m
8	1.18 (0.15)	1.00 (0.20)	2.18	1.18	45.87	106.45	m
IAs%	56.25						
R	1.40						

PCh: paire chromosomique; BL: bras long, BC: bras court; LT: longueur totale des chromosomes = BL+ BC; r: rapport bras long sur bras court = BL/ BC; Ic: indice centromérique = 100 x BC / LT; LR (‰): longueur relative = 1000 x LT / ΣLT; t: type morphologique des chromosomes selon Levan et al. (1964), sat: satellites; IAs % : indice d'asymétrie = 100 x ΣBL / ΣLT selon Arano et Saito (1980) R: rapport entre la paire la plus longue et la plus courte des chromosomes; cs: constriction secondaire = 0.53µm; (*) = écart type.

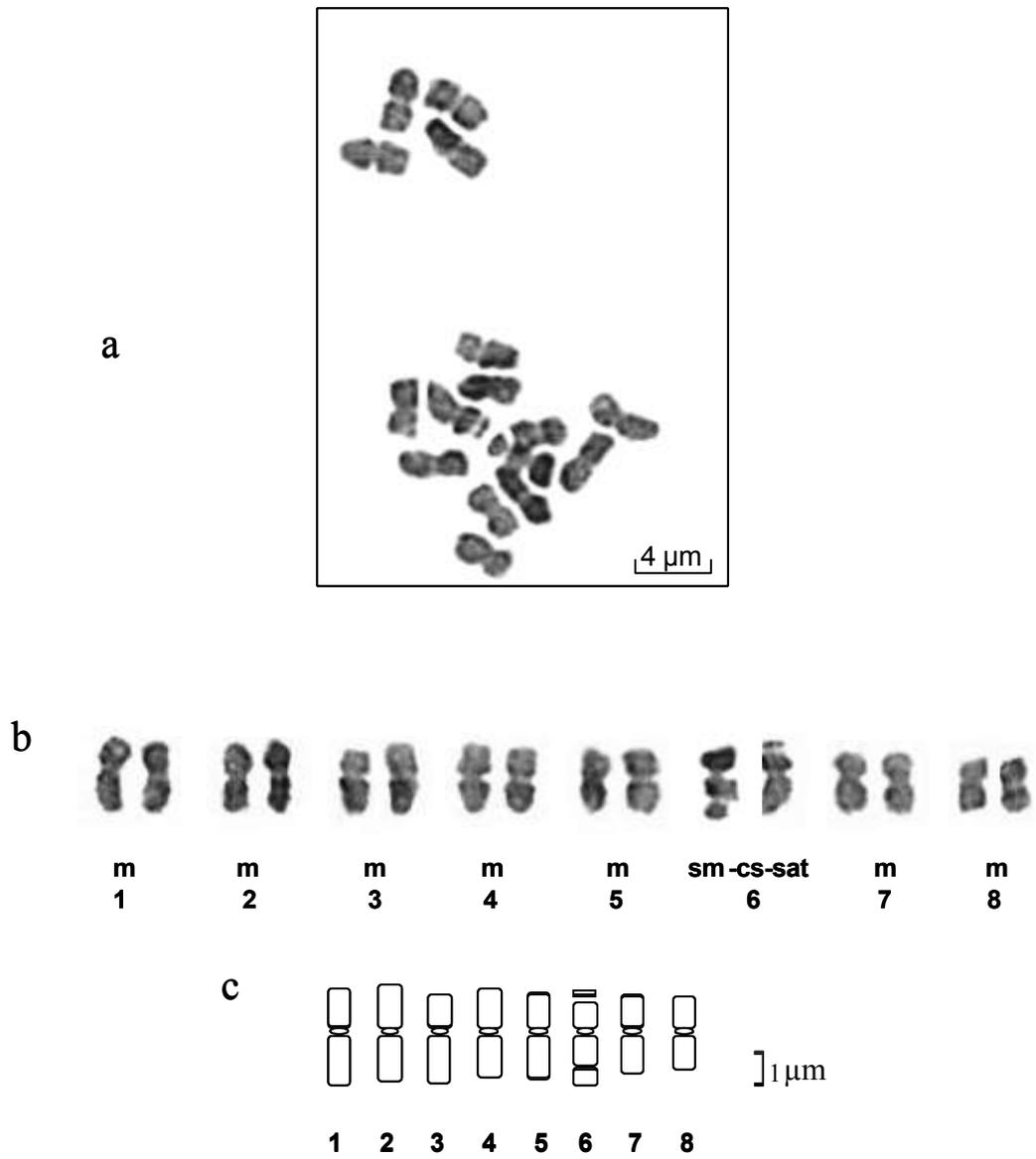


Figure 6. Caryotype d' *H. naudinianum* (population de Aïn Sfa)
 (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme.

Tableau 5. Données morphométriques du caryotype d'*Hedysarum perrauderianum*
Population 2 (Bord de route)

PCh	BL (µm)	BC (µm)	LT (µm)	r	Ic	LR(‰)	t
1	2.20 (0.02)*	1.60 (0.06)	3.80	1.38	42.11	73.86	m
2	2.00 (0.00)	1.60 (0.13)	3.60	1.25	44.44	69.97	m
3	2.20 (0.15)	1.30 (0.15)	3.50	1.69	37.14	68.03	m
4	2.16 (0.15)	1.31 (0.01)	3.47	1.65	37.75	67.44	m
5	2.00 (0.13)	1.43 (0.19)	3.43	1.40	41.69	66.67	m
6	2.00 (0.03)	1.33 (0.16)	3.33	1.50	39.94	64.72	m-sat
7	1.93 (0.07)	1.40 (0.00)	3.33	1.38	42.04	64.72	m
8	1.70 (0.08)	1.63 (0.04)	3.33	1.04	48.95	64.72	m
9	1.76 (0.02)	1.53 (0.06)	3.29	1.15	46.50	63.88	m
10	2.10 (0.17)	1.10 (0.19)	3.20	1.91	34.38	62.19	sm
11	1.83 (0.09)	1.26 (0.01)	3.09	1.45	40.78	60.06	m-sat
12	1.63 (0.02)	1.40 (0.05)	3.03	1.16	46.20	58.90	m
13	1.53 (0.06)	1.40 (0.02)	2.93	1.09	47.78	56.95	m
14	1.60 (0.17)	1.23 (0.13)	2.83	1.30	43.46	55.00	m
15	1.46 (0.00)	1.20 (0.06)	2.66	1.22	45.11	51.70	m
16	1.40 (0.01)	1.23 (0.00)	2.63	1.14	46.77	51.12	m
IAs%	57.33						
R	1.44						

Population 5 (Forêt de Pin d'Alep: *Pinus halepensis*)

1	2.46 (0.02)*	1.70 (0.06)	4.16	1.45	40.87	75.40	m
2	2.40 (0.00)	1.60 (0.13)	4.00	1.50	40.00	72.50	m
3	2.30 (0.08)	1.60 (0.15)	3.90	1.44	41.03	70.69	m
4	2.30 (0.00)	1.40 (0.01)	3.70	1.64	37.84	67.06	m
5	2.00 (0.01)	1.66 (0.19)	3.66	1.20	45.36	66.34	m
6	2.00 (0.20)	1.63 (0.16)	3.63	1.23	44.90	65.80	m-sat
7	2.20 (0.00)	1.40 (0.00)	3.60	1.57	38.89	65.25	m
8	2.00 (0.06)	1.60 (0.04)	3.60	1.25	44.44	65.25	m
9	2.00 (0.02)	1.60 (0.06)	3.60	1.25	44.44	65.25	m
10	2.24 (0.08)	1.22 (0.19)	3.46	1.84	35.26	62.71	sm
11	1.90 (0.17)	1.50 (0.01)	3.40	1.26	44.11	61.63	m-sat
12	1.80 (0.09)	1.34 (0.05)	3.14	1.34	42.68	56.91	m
13	1.60 (0.02)	1.36 (0.02)	2.96	1.18	45.95	53.65	m
14	1.46 (0.06)	1.40 (0.13)	2.86	1.04	48.95	51.84	m
15	1.60 (0.17)	1.20 (0.06)	2.80	1.33	42.86	50.75	m
16	1.50 (0.01)	1.20 (0.00)	2.70	1.25	44.44	48.94	m
IAs%	57.56						
R	1.54						

(*) = écart type.

La longueur totale moyenne des chromosomes varie de 2.63 μm à 4.16 μm pour l'ensemble des populations étudiées. L'idiogramme ne montre pas de grandes variations dans la taille des chromosomes qui sont sensiblement de la même dimension (Fig. 7c). Les différentes valeurs du rapport de la taille entre la paire la plus longue et la paire la plus courte ($R_1 = 1.36$; $R_2 = 1.44$; $R_3 = 1.79$; $R_4 = 1.60$; $R_5 = 1.54$ et $R_6 = 1.47$), et les valeurs de l'indice d'asymétrie ($IAS_1\% = 55.09$; $IAS_2\% = 57.33$; $IAS_3\% = 53.32$; $IAS_4\% = 56.33$; $IAS_5\% = 57.56$ et $IAS_6\% = 57.05$) sont assez faibles.

3- Organisation de l'hétérochromatine

L'hétérochromatine se présente sous forme de blocs, de bandes ou de points (l'hétérochromatine diffuse), et sa position peut être terminale (télomère), intercalaire ou centromérique (Siljak-Yakovlev 1986).

3-1- C-banding

Malgré la petite taille des chromosomes des espèces étudiées, nous avons réussi une bonne coloration différentielle montrant de nombreuses bandes et points sur l'ensemble des chromosomes. L'hétérochromatine est localisée dans les régions terminales, centromériques et intercalaires (Fig. 7a et 8). Chez *H. naudinianum* (diploïde), les chromosomes homologues ne présentent pas le même nombre de bandes à l'exception de la paire satellifère (N°6) qui montre deux bandes télomériques au niveau du bras court et deux bandes (points) intercalaires au niveau du bras long. Les satellites ne sont pas hétérochromatiques. Chez le tétraploïde certaines paires chromosomiques présentent le même pattern et peuvent être regroupées 2 par 2, par exemple les paires 1 et 5, 4 et 10, 6 et 11 et 12 et 16. Les paires satellifères (N°6 et 11) présentent quatre bandes télomériques, huit dans la région centromérique et quatre intercalaires. Les satellites sont de nature hétérochromatique.

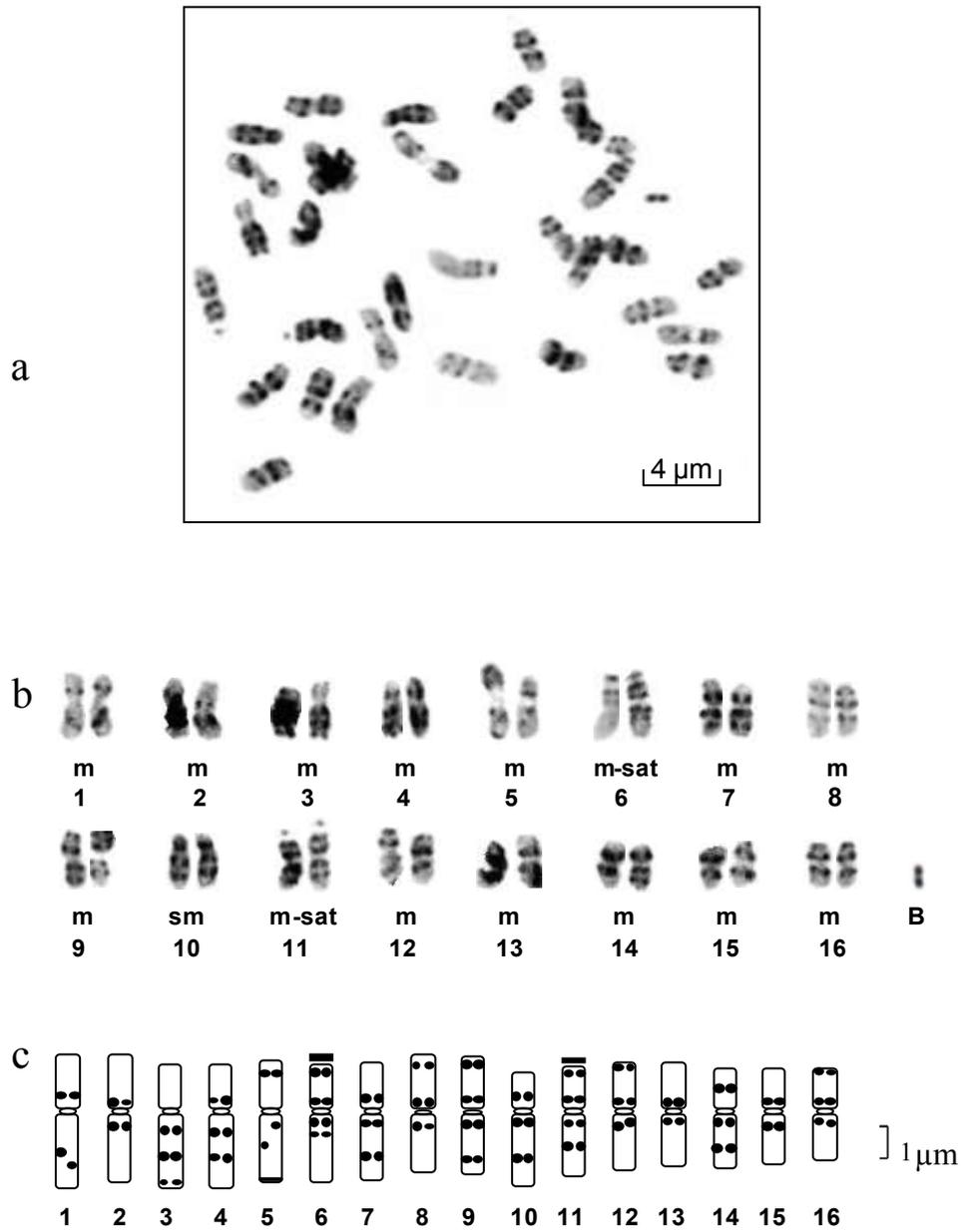


Figure 7. Caryotype et hétérochromatine constitutive d'*H. perrauderianum*
 (a) plaque métaphasique; (b) caryogramme; (c) idiogramme.



Figure 8. L'hétérochromatine constitutive chez *H. naudinianum*

3-2- Fluorochrome banding chez les trois espèces

La coloration à la chromomycine (CMA₃) chez les diploïdes, a révélé une paire fortement marquée riche en bandes GC chez *H. naudinianum* et moins intense chez *H. pallidum* (Fig. 9b, c). Le tétraploïde présente deux paires également fortement marquées (Fig. 9a). Ces marquages se retrouvent dans des positions télomériques sur les bras courts, qui correspondent aux positions des satellites et aux NOR_S. Chez *H. naudinianum*, on compte 6 bandes centromériques, 2 télomériques et 2 intercalaires. Pour *H. pallidum*, des bandes faibles à moyennes sont surtout observées dans la région centromérique. Le chromosome B présente une bande au niveau télomérique. Pour le tétraploïde, 16 bandes centromériques et 6 faibles bandes télomériques sont observées.

La coloration au DAPI après FISH Chez *H. naudinianum* a révélé 14 bandes d'hétérochromatine constitutive. La majorité des bandes DAPI⁺ sont aussi CMA⁺. Pour *H. pallidum* aucun marquage n'est observé (Fig. 9e, f).

Chez le tétraploïde, 36 bandes d'hétérochromatine constitutive d'intensité variable sont révélées (Fig. 9d). Quatre types de paires de chromosomes peuvent être distingués: 13 paires avec des bandes centromériques (26 bandes), une paire satellifère avec deux bandes télomériques (bras longs et courts) et une bande intercalaire sur le bras court (6 bandes). Une deuxième paire satellifère présente deux bandes télomériques sur le bras long et court (4 bandes), et une paire ne présente aucun marquage (sans signaux). La majorité des bandes DAPI⁺ sont aussi CMA⁺ indiquant la richesse de cette espèce en hétérochromatine riche en bases GC.

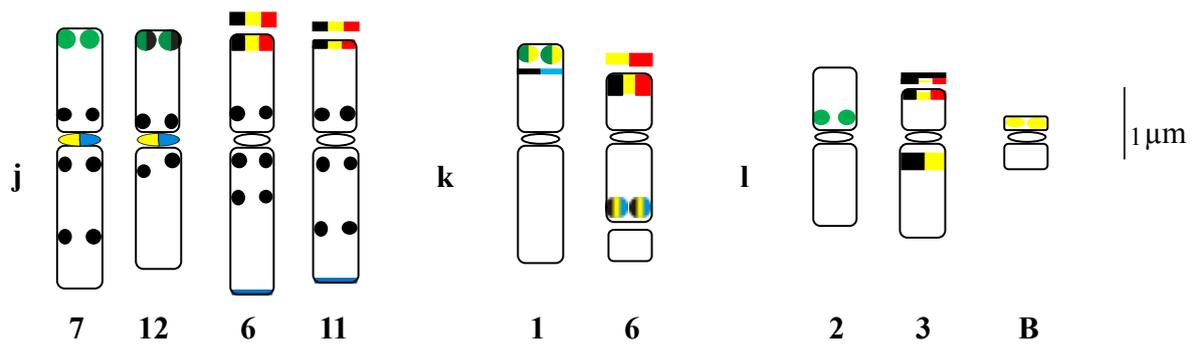
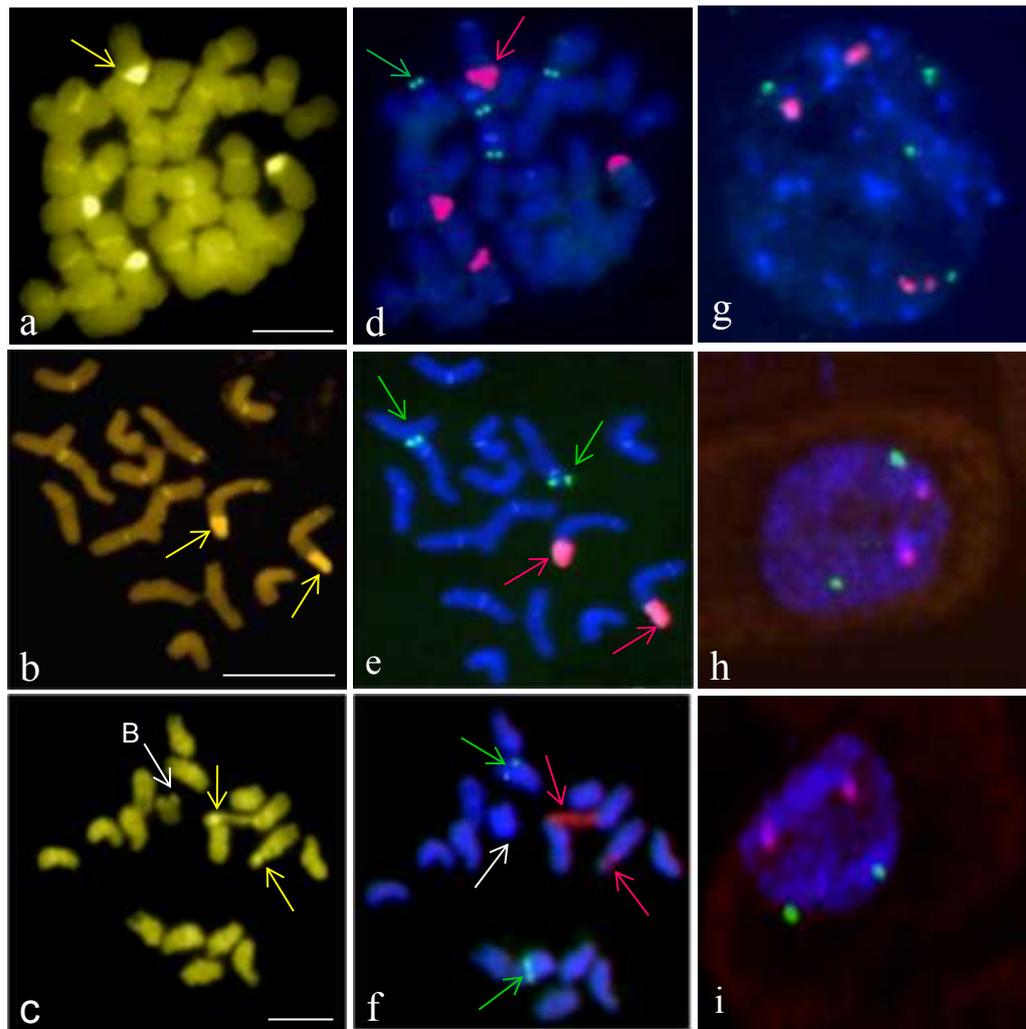


Figure 9. Coloration à la chromomycine, hybridation *in situ* avec les sondes ADNr 5S et 35S sur plaques métaphasiques et noyaux interphasiques et idiogrammes des chromosomes marqueurs: (a, d, g, j) *H. perrauderianum*; (b, e, h, k) *H. naudinianum*; (c, f, i, l) *H. pallidum*. Echelle = 5 μ m.

C-banding ■ CMA⁺ ■ DAPI⁺ ■ 5S ■ 35S ■

4- Nombre et distribution des ADNr (5S et 35S) chez les trois espèces

Nous avons localisé, grâce à la technique d'hybridation *in situ* fluorescente, les sondes spécifiques des séquences codant pour les ARN ribosomiques 35S (ADNr) et pour l'ARN ribosomique 5S sur les trois espèces du genre *Hedysarum*. Un nombre différent de loci est détecté pour chacun des gènes ribosomiques entre les espèces diploïdes et l'espèce tétraploïde.

L'hybridation *In situ* a révélé l'existence d'un locus de chaque famille de gènes ribosomiques (5S et 35S) chez les diploïdes. Les signaux 5S sont observés sur le bras court d'une seule paire chromosomique dans la région télomérique chez *H. naudinianum* et la région centromérique pour *H. pallidum* (Fig. 9e, f, k, l). Deux loci d'ADNr 5S et 35S ont été révélés chez le tétraploïde. Quatre signaux 5S ADNr ont été détectés sur le bras court de deux paires chromosomiques en position terminale (Fig. 9d, j). Les loci 35S pour les trois espèces se situent sur les bras courts des paires satellifères au niveau des régions terminales correspondant aux constriction secondaires (cs) et aux organisateurs nucléolaires (NORs) (Fig. 9d, e, f, j, k, l). En interphase, les régions satellifères restent visibles sous forme de chromocentres de taille et d'intensité différente en fonction de l'activité des gènes ribosomiques (Fig. 9g, h, i).

- *Activité transcriptionnelle de l'ADNr 35S*

De nombreuses études utilisent la chromatine ribosomale comme un modèle pour examiner l'organisation de gènes actifs et inactifs présents dans le même locus pendant l'interphase. Les loci des gènes ribosomiques actifs peuvent être détectés indirectement par le nombre maximal de nucléoles révélés par la coloration au nitrate d'argent, ou directement par la coloration au nitrate d'argent des chromosomes au stade métaphasique ou pro-métaphasique.

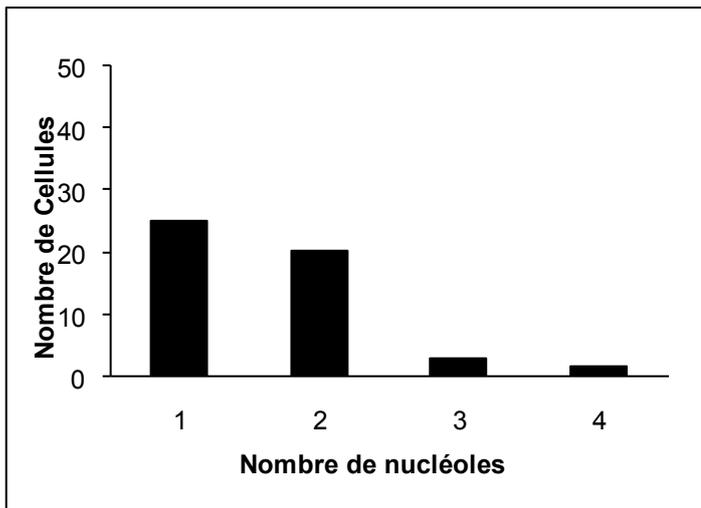
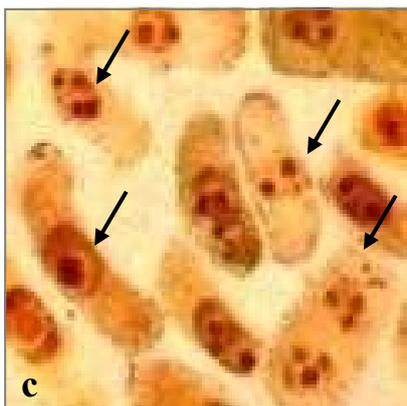
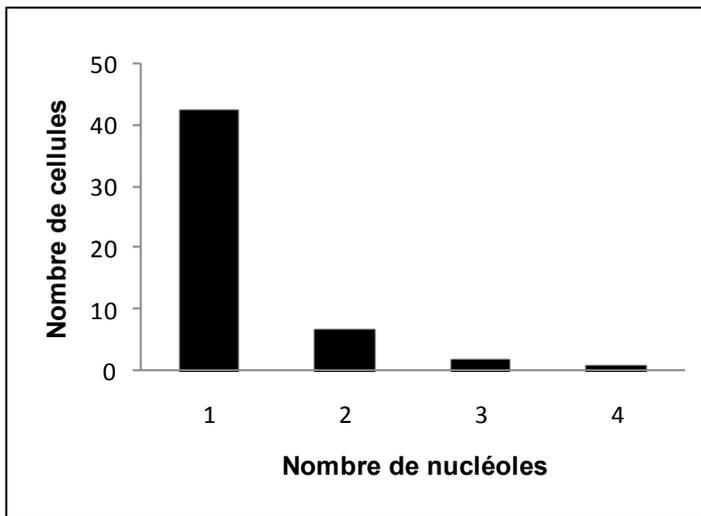
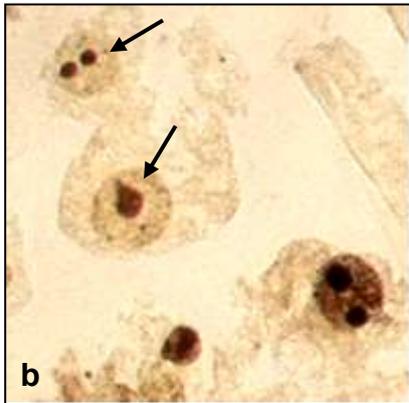
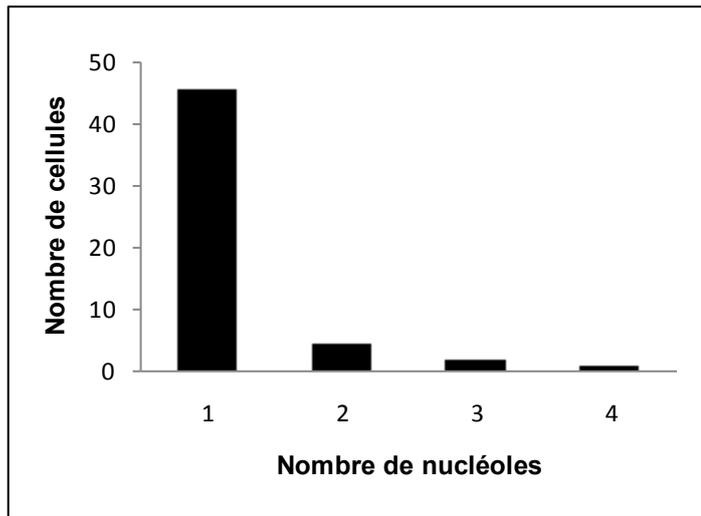
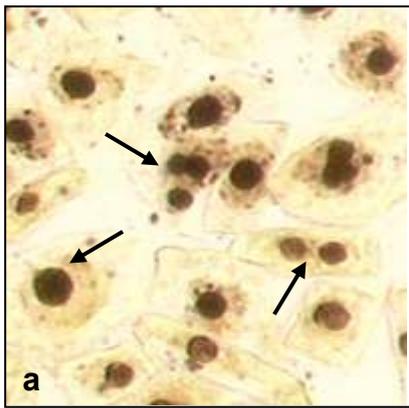


Figure 10. Coloration des nucléoles au nitrate d'argent et histogrammes des nombres de nucléoles par cellule: (a) *H. pallidum*; (b) *H. naudinianum*; (c) *H. perrauderianum*. Les flèches indiquent le nombre de nucléoles par noyau.

La coloration au nitrate d'argent qui révèle l'activité des NORs, a permis de procéder à un comptage des nucléoles dans les noyaux interphasiques des cellules méristématiques des apex racinaires. Deux cent cinquante noyaux de 5 individus par population sont examinés. Les résultats obtenus sont similaires pour l'ensemble des populations pour chaque espèce. Le nombre de nucléoles par cellule varie de 1 à 4 avec une majorité de 1 nucléole par cellule pour les diploïdes et 1 à 2 nucléoles pour le tétraploïde. La taille des nucléoles diffère d'une cellule à une autre (Fig. 10a, b, c) (Annexe 3).

5- Analyse du comportement méiotique

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

Une étude statistique est réalisée sur 3 populations pour l'espèce diploïde et six populations pour l'espèce tétraploïde (5 individus par population et 30 CMP par individu) pour déterminer le type d'appariement chromosomique qui prédomine. Les fréquences des différents types d'associations des chromosomes homologues sont données dans les tableaux 6 et 7.

5-1- La méiose des populations diploïdes

L'étude du comportement méiotique chez les différentes populations d' *H. naudinianum* a montré dans l'ensemble une certaine régularité des divisions. Les différentes configurations méiotiques obtenues sur les cellules analysées au stade diacinèse montrent en général, que l'appariement des chromosomes homologues se fait essentiellement sous forme de bivalents, en anneau et droits.

Les populations se distinguent par un nombre élevé de bivalents en anneau (IIa) avec une fréquence qui varie de 0.38 ± 0.03 à 0.46 ± 0.07 . D'autres types d'appariement, bivalents droits, en croix et en v, trivalents et tétravalents sont également observés mais avec des fréquences moyennes à faibles. La présence des univalents est également remarquable dans les populations de Aïn Sfa et de Aïn Roua. Leurs fréquences sont 0.13 ± 0.04 et 0.12 ± 0.05 respectivement (Tab. 6 et Fig.11a, b). La présence constante de huit bivalents (8) confirme le nombre chromosomique $2n = 2x = 16$ soit $x = 8$ observé en mitose.

L'examen des anaphases et des télophases, a permis de visualiser des irrégularités de la méiose du diploïde, des chromosomes retardataires (CR) et des ponts de chromatine (PC), avec cependant de faibles fréquences (0.03 à 0.04) (Fig. 11e, i et Tab. 8).

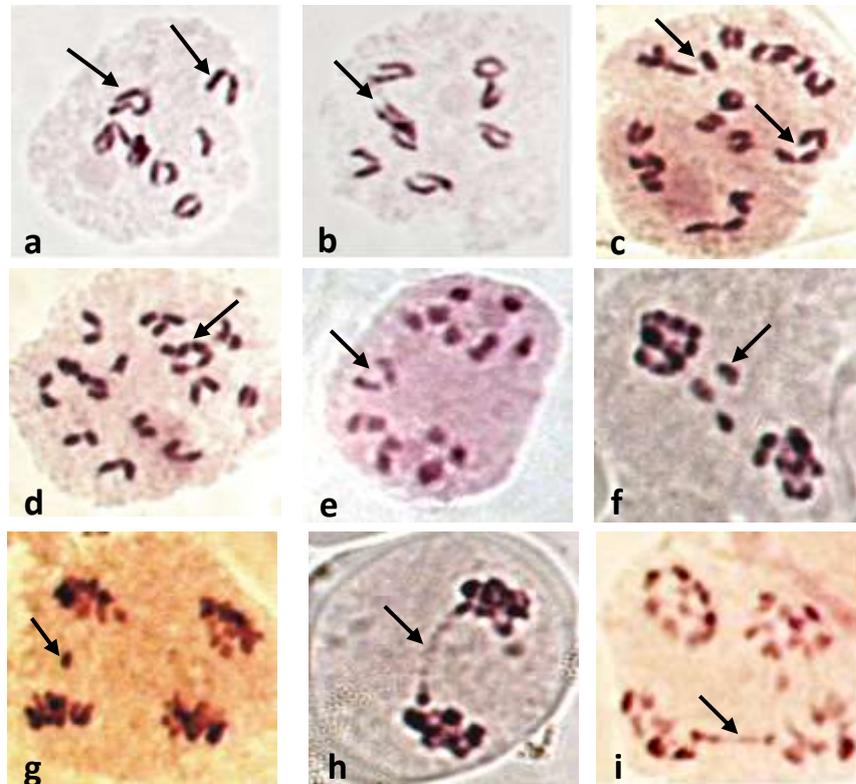


Figure 11. Cellules au stade diacinèse: (a) bivalent en v et trivalent; (b, c) tétravalent et univalent; (d) pentavalent; anomalies méiotiques: (e, f) chromosomes retardataires en anaphase I et (g) en anaphase II; (h, i) pont de chromatine à la fin de l'anaphase I et II; (a, b, e, i) *H. naudinianum*; (c, d, f, g, h) *H. perrauderianum*.

5-2- La méiose des populations tétraploïdes

Nous avons voulu à travers l'étude du comportement méiotique de cette espèce, voir si notre tétraploïde avait un comportement d'un allotétraploïde ou d'un autotétraploïde. Les différentes configurations méiotiques obtenues sur les cellules au stade diacinèse des populations étudiées, montrent des univalents et des chromosomes homologues appariés sous différentes formes: bivalents droits et en anneau, trivalents, tétravalents, pentavalents et hexavalents (Fig. 11c, d.).

On constate que ces appariements différencient deux groupes de populations: Le premier groupe où les univalents prédominent (0.26 ± 0.04 à 0.39 ± 0.05) comprend les populations 1, 2, 3 et 4 provenant des bords de route où l'influence anthropique est importante.

Le deuxième groupe où les bivalents en anneau (0.20 ± 0.06 à 0.31 ± 0.07) et droit (0.33 ± 0.04 à 0.39 ± 0.03) dominant, comprend les populations 5 et 6 récoltées dans une station sous forêt de Pin d'Alep, c'est-à-dire dans un habitat plus protégé et non perturbé. Les trivalents (III), les tétravalents (IV), les pentavalents (V) et les hexavalents (VI) présentent des fréquences faibles chez les six populations (Tab.7).

Tableau 6. Fréquences des appariements chromosomiques chez les trois populations d'*H. naudinianum* au stade diacynèse (5 individus / population; 30 CMP / individu).

Populations	Appariements chromosomiques							
	I	IId	IIda	IIdx	IIdv	III	IV	AI
Aïn Sfa	0.13 (0.04)*	0.24 (0.05)	0.38 (0.03)	0.04 (0.01)	0.09 (0.01)	0.03 (0.02)	0.07 (0.03)	0.02
Maoklane	0.09 (0.02)	0.14 (0.04)	0.46 (0.05)	0.03 (0.02)	0.13 (0.04)	-	0.04 (0.01)	0.11
Aïn Roua	0.12 (0.05)	0.06 (0.02)	0.46 (0.07)	0.12 (0.06)	0.08 (0.02)	0.01 (0.01)	0.03 (0.02)	0.12

Tableau 7. Fréquences des appariements chromosomiques au stade de diacynèse chez les six populations d'*H. perrauderianum* (5 individus / population; 30 CMP / individu).

Populations	Appariements chromosomiques									
	I	IId	IIda	IIdc	IIdd	IIdv	IIdd	Vc	VIId	AI
P1	0.38 (0.04)*	0.10 (0.03)	0.17 (0.02)	0.04 (0.01)	0.02 (0.02)	0.04 (0.02)	0.03 (0.01)	0.01 (0.02)	0.01 (0.01)	0.20
P2	0.33 (0.06)	0.17 (0.05)	0.22 (0.04)	0.05 (0.02)	0.02 (0.02)	0.03 (0.01)	0.03 (0.03)	0.01 (0.01)	0.09 (0.02)	0.05
P3	0.39 (0.05)	0.30 (0.06)	0.14 (0.05)	0.03 (0.03)	0.02 (0.02)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	-	0.01 (0.01)	0.09
P4	0.26 (0.04)	0.24 (0.04)	0.21 (0.04)	0.06 (0.02)	0.05 (0.02)	0.04 (0.03)	0.04 (0.04)	-	-	0.10
P5	0.20 (0.04)	0.31 (0.07)	0.30 (0.03)	0.05 (0.03)	0.02 (0.01)	0.05 (0.03)	0.05 (0.03)	0.02 (0.00)	-	0.00
P6	0.14 (0.03)	0.20 (0.06)	0.33 (0.04)	0.01 (0.01)	0.01 (0.02)	0.03 (0.01)	0.02 (0.02)	-	0.03 (0.01)	0.23

I: univalents, II: bivalents, III: trivalents, IV: tétravalents, V: pentavalents, VI: hexavalents, (-): non observé, d: droit, a: anneau, c: chaîne, x: croix, v = v, AI: appariements indistinguables (*): écart type.

L'étude de la méiose a également révélé l'existence de quelques anomalies affectant la première et la deuxième division: chromosomes retardataires au stade de l'anaphase I et II et ponts de chromatine au stade de l'anaphase I (Fig. 11f, g, h). Selon la fréquence des anomalies méiotiques, les deux groupes de populations sont également distingués: les populations qui proviennent des bords de route montrent une fréquence élevée des chromosomes retardataires (0.04 ± 0.02 à 0.14 ± 0.07) et ponts de chromatine (0.02 ± 0.02 à 0.14 ± 0.05) que celle des populations se trouvant sous forêt de Pin d'Alep (Tab. 9).

Tableau 8. Fréquences des anomalies méiotiques chez les populations d'*H. naudinianum* (5 individus/population; 30 CMP/individu).

Populations	Anomalies méiotiques	
	CR	PC
Aïn Sfa	0.04 (0.01) *	0.04 (0.01)
Maoklane	0.03 (0.02)	0.04 (0.00)
Aïn Roua	0.04 (0.02)	0.04 (0.02)

Tableau 9. Fréquences des anomalies méiotiques chez les populations d'*H. perrauderianum* (5 individus/population; 30 CMP/individu).

Populations	Anomalies méiotiques				
	CR1	CR2	CR3	CR4	PC
P1	0.10 (0.04) *	0.13 (0.05)	0.01 (0.01)	-	0.06 (0.02)
P2	0.12 (0.05)	0.08 (0.03)	0.03 (0.02)	0.01 (0.01)	0.02 (0.02)
P3	0.04 (0.02)	0.05 (0.02)	0.02 (0.02)	-	0.04 (0.03)
P4	0.14 (0.07)	0.14 (0.06)	0.01 (0.01)	0.01 (0.01)	0.14 (0.05)
P5	0.01 (0.01)	0.02 (0.02)	0.01 (0.02)	-	0.03 (0.03)
P6	0.01 (0.01)	0.04 (0.02)	-	-	-

CR1-4: nombre des chromosomes retardataires, PC: pont de chromatine, (-): non observé, (*): écart type.

6- Chromosomes B

L'observation des mitoses et des méioses d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum* a montré la présence des chromosomes B. Pour déterminer leur fréquence, nous avons effectué un comptage de 300 cellules par individu chez cinq individus par population. Leur nombre varie de 1 à 3 chez le diploïde et leur taille de $0.92 \pm 0.01 \mu\text{m}$ à $1.20 \pm 0.03 \mu\text{m}$ (Fig. 12 a, b, c).

L'étude statistique montre que la fréquence d'un seul chromosome B est la plus élevée chez les trois populations, Aïn Roua = 0.11 ± 0.05 ; Maoklane = 0.07 ± 0.04 et Aïn Sfa = 0.06 ± 0.03 (Tab.10).

Chez le tétraploïde, leur nombre varie de 1 à 4 et leur taille de $1.2 \pm 0.05 \mu\text{m}$ à $1.8 \pm 0.02 \mu\text{m}$ (Fig.12d, e, f). Les résultats obtenus montrent que la fréquence la plus élevée dans les six populations est celle où l'on compte un seul chromosome B. Deux populations de bord de route (P2 et P3) qui présentent une mosaïque du nombre chromosomique ($2n = 18$ et $2n = 32$) ont les fréquences de chromosomes B les plus élevées (Tab. 11).

La coloration différentielle au Giemsa confirme la nature hétérochromatique des chromosomes B (Fig. 7a). Le fluorochrome banding met en évidence une bande GC dans les populations contaminées d'*H. pallidum* (Fig. 9c).

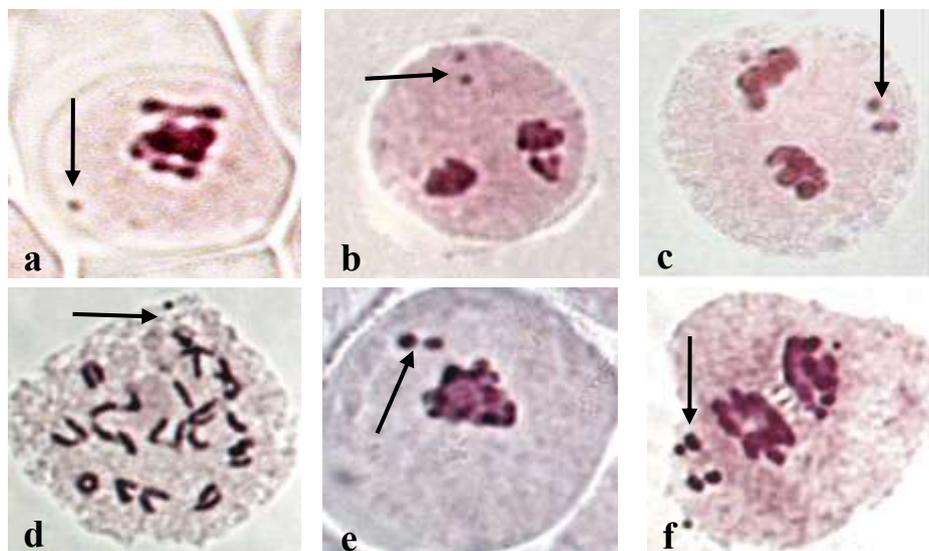


Figure 12. Chromosomes B en méiose: (a, b, c) 1 à 3 chromosomes B chez *H. naudinianum*; (d, e, f) 1 à 4 chromosomes B chez *H. perrauderianum*.

Tableau 10. Fréquences des chromosomes B chez les populations d'*H. naudinianum* (5 individus / population; 300 cellules / individu).

Populations	Chromosomes B		
	1B	2B	3B
Aïn Sfa	0.06 (0.03)*	0.03 (0.06)	-
Maoklane	0.07 (0.04)	0.01 (0.01)	0.001 (0.01)
Aïn Roua	0.11 (0.05)	0.02 (0.01)	0.001 (0.01)

Tableau 11. Fréquences des chromosomes B chez les populations d'*H. perrauderianum* (5 individus / population; 300 cellules / individu).

Populations	Chromosomes B			
	1B	2B	3B	4B
P1	0.02 (0.009)*	0.01 (0.002)	0.001(0.001)	-
P2	0.05 (0.024)	0.03 (0.005)	0.010 (0.007)	0.009 (0.006)
P3	0.07 (0.017)	0.02 (0.009)	0.005 (0.004)	-
P4	0.03 (0.011)	0.01 (0.006)	0.004 (0.002)	-
P5	0.01 (0.004)	0.004(0.003)	0.001 (0.001)	-
P6	0.02 (0.006)	0.01 (0.004)	0.001 (0.002)	0.001 (0.001)

(*) = écart type.

7- Viabilité et taille des grains de pollen

La viabilité du pollen estimée par le carmin acétique est très importante chez les deux espèces étudiées. Les résultats donnés dans le tableau 12, indiquent une viabilité pollinique supérieure à 80%. En moyenne 85.21% de viabilité pour le diploïde *H. naudinianum* et 90.14% pour le tétraploïde *H. perrauderianum*. Les grains de pollen colorés en rose, sont considérés comme viables (Fig. 13a).

La viabilité s'exprime différemment entre les populations. La population diploïde de Aïn Sfa semble avoir le taux le plus faible de viabilité, 59.16%. Chez le tétraploïde, les populations 1 et 2 (P1 et P2: bord de route) présentent respectivement le taux le plus faible de viabilité du pollen, 80.59 % et 86.11% (Tab. 12).

Tableau 12. Viabilité du pollen des populations diploïdes (*H. naudinianum*) et des populations tétraploïdes (*H. perrauderianum*)

Populations	Ploidie	Viabilité (%)
Aïn Sfa	2x	59.16
Aïn Roua	2x	99.32
Maoklane	2x	97.16
Moyenne		85.21
P1	4x	80.59
P2	4x	86.11
P3	4x	94.66
P4	4x	96.66
P5	4x	90.98
P6	4x	91.88
Moyenne		90.14

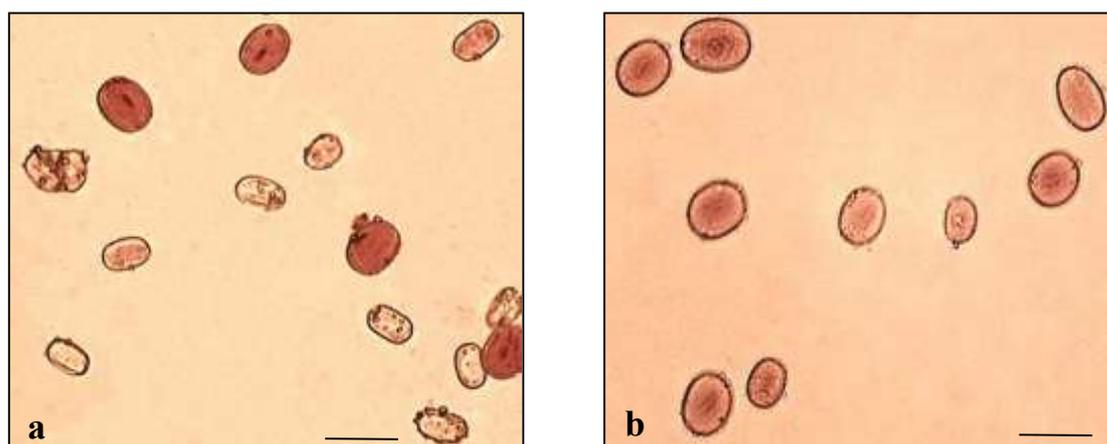


Figure 13. Pollen observé au microscope photonique chez *H. naudinianum* et *H. perrauderianum* (a) pollen viable (rose) et pollen non viable (transparent); (b) pollen de taille variable. Echelle= 40µm.

Le diamètre polaire moyen (P) des grains de pollen des populations diploïdes est de 23.17µm et il est de 24.15 µm pour les populations tétraploïdes. Le tableau 13 montre une variabilité intra et interspécifique.

Nous avons observé les grains de pollen d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum*, ceux-ci ont une forme allongée et simple (les grains se séparent après la méiose: eumonades) (Fig. 14a, b). En vue équatoriale, le pollen des deux espèces est petit ($20\mu\text{m} < P < 30\mu\text{m}$), longiaxe ($P > E$), isopolaire, prolata et subprolata (pour l'ensemble des populations sauf la population P4) et tricolpé (trois ouvertures en forme de sillons). En vue polaire, la forme du grain de pollen est lobée ou circulaire (Tab. 13 et Fig. 14c, d).

Tableau 13. Données morphométriques des grains de pollen des populations diploïdes (*H. naudinianum*) et des populations tétraploïdes (*H. perrauderianum*).

Populations	Ploïdie	P (µm)	E (µm)	Rapport (P/E) et forme du pollen
Aïn Sfa	2x	22.69 (1.87)*	16.39 (2.52)	1.47 Prolate
Aïn Roua	2x	23.80 (1.42)	17.56 (1.49)	1.36 Prolate
Maoklane	2x	23.02 (1.60)	18.24 (2.37)	1.37 Prolate
P1	4x	25.30 (1.98)	18.73 (2.78)	1.35 Prolate
P2	4x	25.64 (2.75)	18.41 (4.65)	1.54 Prolate
P3	4x	24.22 (2.13)	18.42 (4.07)	1.57 Prolate
P4	4x	26.21 (1.79)	20.31 (1.85)	1.30 Subprolata
P5	4x	21.65 (1.55)	16.14 (1.67)	1.34 Prolate
P6	4x	21.90 (1.65)	16.38 (1.38)	1.34 Prolate

P: diamètre polaire; E: diamètre équatorial; (*): écart type.

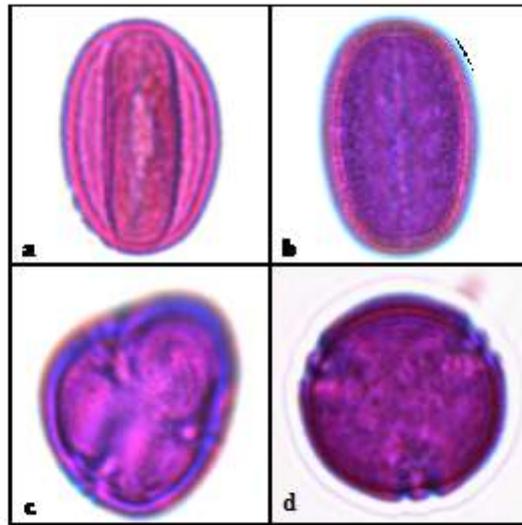


Figure 14. Pollen observé au microscope photonique: (a, c) *H. naudinianum*; (b, d) *H. perrauderianum*; (a, b,) vue équatoriale et colpus; (c, d) vue polaire.

8- Quantification de l'ADN par cytométrie en flux des trois espèces

En complément aux dénombrements chromosomiques, nous avons estimé la taille des génomes diploïdes et du génome tétraploïde. La quantité d'ADN est mesurée par cytométrie en flux. 15 échantillons des trois espèces étudiées sont analysés. Les résultats sont reportés sur le tableau 14 et les histogrammes correspondants sont illustrés par la figure 15.

La taille du génome est conventionnellement exprimée en valeur C, la masse d'ADN dans un noyau haploïde, et elle est le plus souvent présentée par la valeur 2C (diploïde). Elle est exprimée en picogrammes (1pg = 978 Mpb d'après Dolezel *et al.* 2003).

Les valeurs moyennes de la quantité de l'ADN mesurée sont de 1.5 pg chez *H. pallidum* (diploïde) avec un coefficient de variation de 0.44, de 3.36 pg chez *H. naudinianum* (diploïde) avec un coefficient de variation de 0.85 et de 6.64 pg chez *H. perrauderianum* (tétraploïde avec un coefficient de variation de 1.47. Le tétraploïde présente le coefficient de variation le plus élevé (Tab. 14).

Tableau 14. Estimation de la taille du génome par cytométrie en flux des espèces étudiées

Espèces	2n	Niveau de ploïdie	2C ADN/pg	CV%	2C ADN/pg Min-Max	1C ADN/Mpb	Cx/pg	N
<i>H. pallidum</i>	16	2x	1.50 (0.01)*	0.44	1.49 - 1.51	733.50	0.75	5
<i>H. naudinianum</i>	16	2x	3.36 (0.03)	0.85	3.32 - 3.39	1643.04	1.68	5
<i>H. perrauderianum</i>	32	4x	6.64 (0.10)	1.47	6.51 - 6.76	3246.96	1.66	5

pg = picogramme; Mpb = méga-paires de base; CV% = coefficient de variation; Min = minimum; Max = maximum; Cx = valeur monoploïde de la taille du génome; N = nombre des échantillons; (*): écart type.

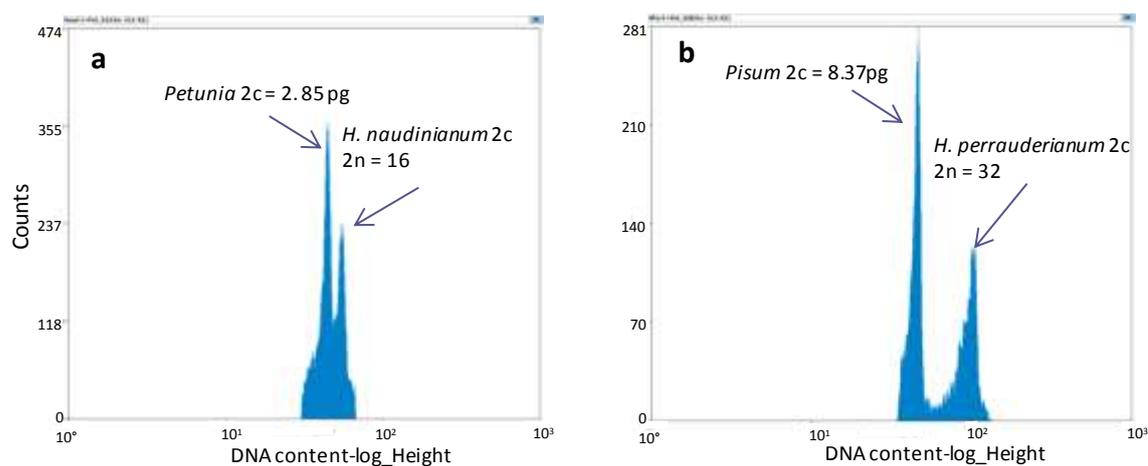


Figure 15. Histogrammes des quantités d'ADN nucléaire déterminées par cytométrie en flux des espèces étudiées: (a) espèce diploïde; (b) espèce tétraploïde.

Chapitre 4

Discussion générale

1- Dénombrement chromosomique et caractéristiques du caryotype

Il existe très peu de travaux cytogénétiques sur les espèces du genre *Hedysarum*. Quelques espèces (*H. coronarium*, *H. pallidum*, *H. aculeolatum* et *H. syriacum*...etc) ont fait l'objet d'études caryologiques (Falistocco et Maurelli 1990; Sadaoui 1999; Benhizia *et al.* 2003; Arslan *et al.* 2012). Le nombre chromosomique est de $2n = 16$ chez le diploïde *H. naudinianum* et de $2n = 32$ chez le tétraploïde *H. perrauderianum* soit $x = 8$. Ces nombres ont été signalés pour la première fois par Abdelguerfi- Berrekia *et al.* (1988) et Bousba (1992) et confirmés dans notre travail.

Les dénombrements chromosomiques effectués sur les six populations du tétraploïde ont permis de mettre en évidence deux nombres chromosomiques différents $2n = 32$ et $2n = 18$ au sein d'un même individu aussi bien en mitose qu'en méiose. Cette observation a été faite dans deux populations de bord de route (P2 et P3) avec une prédominance de cellules à 32 chromosomes. Bousba (1992) a observé chez *H. perrauderianum*, au sein de deux populations, des individus où toutes les cellules étaient à $2n = 18$. Il s'agit des seules populations signalées comme étant diploïdes. Nos prospections à ce jour, ne nous ont pas permis de retrouver ces populations.

Chez les diploïdes, le nombre 18 a été observé chez *H. coronarium* dans des populations algériennes (Issolah *et al.* 2006). Chez *H. pallidum*, deux nombres chromosomiques sont également signalés: $2n = 16$ (Abdelguerfi Berrekia *et al.* 1988; Benhizia *et al.* 2003) et $2n = 18$ (Abdelguerfi Berrekia *et al.* 1988). Il semble donc qu'il existe une variabilité du nombre chromosomique au niveau intra individu, intrapopulation et interpopulations chez certaines espèces du genre *Hedysarum* appartenant au groupe méditerranéen.

Akpinar et Yildiz (1999); Yildiz et Gücel (2006); Arslan *et al.* (2012), ont confirmé deux nombres chromosomiques de base $x = 7$ et $x = 8$ chez les espèces turques. En Méditerranée, $x = 8$ est considéré comme le nombre de base. Dans le cas des populations à $2n = 18$, signalées dans les travaux antérieurs deux cas de figure sont possibles:

- soit une erreur d'observation où les satellites, les constriction secondaires ou les chromosomes B ont pu être ajoutés au nombre chromosomique,
- soit une anomalie méiotique entraînant une disjonction non équilibrée du matériel génétique en anaphase.

Les travaux en cours sur d'autres populations et d'autres espèces du complexe *Hedysarum* (*H. carnosum*, *H. flexuosum* et *H. spinosissimum*) pourraient ouvrir des pistes de recherche en vue d'apporter des clarifications à ce phénomène.

La longueur moyenne des chromosomes des espèces étudiées du genre *Hedysarum*, reste petite comparée à la longueur moyenne commune des chromosomes végétaux qui est d'environ 6 μm (Jahier *et al.* 1992). Les chromosomes sont en outre de morphologie semblable, ce qui rend l'identification des homologues et leur classification particulièrement délicates (Benhizia *et al.* 2003; Falistocco et Maurelli 1990).

La taille des chromosomes du diploïde et du tétraploïde varie entre 2.04 μm à 3.06 μm et 2.63 μm à 4.16 μm respectivement. Ces valeurs montrent que les chromosomes de ces espèces ont une taille plus grande que les autres espèces algériennes étudiées comme *H. pallidum* 1.43 μm à 2.05 μm (Benhizia *et al.* 2003), *H. coronarium* 1.28 μm à 1.97 μm (Issolah *et al.* 2006) et *H. aculeolatum* 1.44 μm à 1.99 μm (Sadaoui 1999).

Pour l'ensemble des espèces étudiées, les chromosomes sont de type métacentrique et submétacentrique. Le nombre des paires chromosomiques de type submétacentrique varie selon l'espèce: aucune paire chez *H. coronarium* (Issolah *et al.* 2006) et *H. syriacum* (Arslan *et al.* 2012), une (1) paire chez *H. pannosum* (Arslan *et al.* 2012), deux (2) paires chez *H. pallidum* (Benhizia *et al.* 2003), cinq (5) paires chez *H. aculeolatum* (Sadaoui 1999). Chez le diploïde *H. naudinianum* et le tétraploïde *H. perrauderianum*, une (1) paire de chromosomes submétacentrique est observée.

Stebbins (1971) définit le caryotype symétrique avec des chromosomes approximativement de la même taille et de type méta ou submétacentrique et le caryotype asymétrique avec des chromosomes de tailles différentes et de type non seulement métacentrique, mais également télocentrique et acrocentrique. Selon ce même auteur, l'évolution s'est faite à partir de caryotypes homogènes vers des caryotypes hétérogènes; les caryotypes les plus évolués sont asymétriques alors que les moins évolués sont symétriques.

L'indice d'asymétrie dont les valeurs sont comprises entre 53.32% et 57.56%, le rapport (R) entre la plus grande et la plus petite paire de chromosomes et le type de chromosomes métacentriques et submétacentriques indiquent que les caryotypes d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum* sont symétriques et primitifs tant pour la forme que pour la taille et les longueurs relatives des chromosomes. Ceci a été également signalé chez *H. pallidum* (IAs = 59.44%) (Benhizia *et al.* 2003), chez *H. coronarium* (IAs = 58%) (Issolah *et al.* 2006) et chez *Picea omorika* et *Picea abies* (IAs = 55% et 56%) (Siljak-Yakovlev *et al.* 2002). En comparant les indices d'asymétries des espèces étudiées, on constate que les caryotypes. d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum* sont moins évolués que celui d'*H. pallidum*.

2- Organisation de l'hétérochromatine et cartographie et activité de l'ADNr

La coloration différentielle au Giemsa montre que l'hétérochromatine constitutive chez *H. perrauderianum* et *H. naudinianum* se trouve sous forme de points et de fines bandes localisées dans les régions centromériques, intercalaires et télomériques alors que chez *H. pallidum*, elle est sous forme de larges bandes intercalaires et télomériques. Trois types de bandes (centromériques, intercalaires et télomériques) ont été signalés chez *H. coronarium* (Issolah *et al.* 2006).

La présence d'un nombre faible de bandes chez le diploïde *H. naudinianum* peut être liée au faible contenu en hétérochromatine des chromosomes comme le soulignent Falistocco et Maurelli (1990) pour les populations italiennes de l'espèce *H. coronarium*. Selon ces auteurs, l'hétérochromatine est localisée dans les régions centromériques. Une fine bande terminale a été observée sur le chromosome 4 et une bande au niveau du satellite relatif au chromosome 8. Les bandes intercalaires n'ont été observées sur aucun des chromosomes.

Chez le tétraploïde, le C-banding nous a permis de regrouper deux par deux certaines paires chromosomiques qui présentent le même pattern: les paires 1 et 5, 4 et 10, 6 et 11 et 12 et 16. La présence de quelques chromosomes similaires (par quatre) et d'autres partiellement différents, nous amène à supposer que ce tétraploïde pourrait avoir une origine autotétraploïde.

La majorité des chromosomes ont des bandes DAPI-positifs dans la région centromérique, en dehors des paires satellifères, qui ont des bandes DAPI-positifs dans les régions télomériques des bras longs pour *perrauderianum* et dans la région subtélomérique pour *naudinianum*. Pour le diploïde *pallidum*, toutes les bandes CMA-positives se trouvent dans la région centromérique à l'exception de la paire satellifère, qui présente des bandes télomériques et centromériques et le chromosome B qui présente une bande télomérique. La majorité des espèces du genre *Lathyrus* (un genre étroitement lié au genre *Hedysarum*) et *Medicago truncatula* (proposé comme plante modèle pour les Fabaceae) montrent aussi des bandes DAPI-positifs dans la région centromérique (Ali *et al.* 2000; Cerbah *et al.* 1999).

Le nombre et la position des gènes ribosomiques sont normalement constants pour une espèce mais peuvent être différents entre les espèces même très proches (Zoldos 2000). Pour cela, les gènes ribosomiques sont considérés comme de bons marqueurs cytogénétiques pour comprendre l'évolution chromosomique et systématique d'un genre (Cerbah *et al.* 1998). Les loci 5S et 35S ne sont pas colocalisés chez les trois espèces et montrent des différences dans la taille et l'intensité des spots. Ceci reflète sans doute la différence dans le nombre de copies d'ADNr

présentes dans chaque locus (Li *et al.* 1997; Murata *et al.* 1997; Ansari *et al.* 1999). Les signaux 5S sont situés dans la région télomérique pour *H. naudinianum* et *H. perrauderianum* et dans la région intercalaire près du centromère pour *H. pallidum*. Par contre les signaux 35S portés sur le bras court des paires satellifères sont localisés dans la région télomérique chez *H. naudinianum* et *H. perrauderianum* et au niveau de la constriction secondaire et dans la région subterminale du satellite chez *H. pallidum*. Ces signaux sont émis avec une intensité importante chez le diploïde *H. naudinianum* et le tétraploïde *H. perrauderianum*. Il est intéressant de noter que les signaux 35S sont associés aux régions d'hétérochromatine riches en base GC chez les trois espèces. Cette colocalisation a été fréquemment reportée (Zoldos *et al.* 1999; Siljak-Yakovlev *et al.* 2002; Chiche *et al.* 2003).

Toutes les populations étudiées présentent le même pattern dans l'organisation des ADNr. Le nombre constant des signaux observé chez toutes les populations étudiées est en accord avec la faible variabilité des marqueurs moléculaires signalée pour les espèces de la famille des Fabacées (Seijo *et al.* 2004).

Le nombre de loci des ADNr 5S et 35S est en corrélation avec le niveau de ploïdie. En effet, les diploïdes $2n = 16$ et le tétraploïde $2n = 32$ présentent respectivement 2 et 4 signaux. Srisuwan *et al.* (2006) ont constaté dans le complexe d'*Ipomea batatas* une augmentation régulière entre le niveau de ploïdie et le nombre de l'ADNr 5S.

Le nombre maximal de nucléoles par cellule pour le tétraploïde est étroitement corrélé avec le nombre de constriction secondaires, le nombre de bandes chromomycines positives (fortement marquées) et le nombre de NORs. La colocalisation d'hétérochromatine riche en bases GC et des organisateurs nucléolaires a fréquemment été décrite dans la littérature (Muratovic *et al.* 2005; Garcia *et al.* 2007). Le fait qu'il y ait une variabilité du nombre de nucléoles par noyau peut être le résultat d'une fusion de sites actifs pour former un seul nucléole ou indiquer l'activation de certains des organisateurs nucléolaires (Chiche *et al.* 2003; Srisuwan *et al.* 2006).

Chez les diploïdes, la majorité des noyaux interphasiques présente un seul nucléole de grande taille. Moins de 10% des noyaux en présentent deux, trois et rarement quatre. Il semble que tous les chromosomes NORs participent à la formation d'un unique nucléole de grande taille.

Rappelons que les nucléoles sont des endroits spécifiques où l'ADNr est actif (transcription). Ils sont formés par une ou plusieurs paires de chromosomes nucléolaires, et leur nombre par noyau peut être équivalent au nombre de ces derniers. Par contre, chez les espèces à génome de petite taille, on trouve souvent un seul nucléole (Hasterok et Maluszynska 2000). Dans ce cas, il est

difficile de détecter le nombre de chromosomes avec des NORs actifs qui participent dans la formation de l'unique nucléole. Par conséquent, la coloration au nitrate d'argent sur les chromosomes est nécessaire pour révéler l'expression des gènes 35S. Cette technique est basée sur la détection de la protéine argyrophillique qui est associée aux gènes ribosomiaux actifs pendant l'interphase (Sumner 1990; Sanchez *et al.* 1995; Dobigny *et al.* 2002).

3- Comportement méiotique

Les formes de bivalents en anneau sont considérées comme signe d'une plus grande homologie entre les chromosomes (Sybenga 1975), par contre les autres formes sont signe d'une homéologie entre les chromosomes ce qui explique les difficultés rencontrées lors de l'établissement du caryogramme du diploïde *H. naudinianum*. Dans l'ensemble, la méiose se déroule de façon régulière pour les populations diploïdes.

En plus de la variation du nombre chromosomique, le comportement méiotique s'est révélé différent entre les populations du tétraploïde *H. perrauderianum*. Les populations se trouvant en bord de route ont une méiose plus perturbée (moins de bivalents, plus d'univalents et plus d'anomalies méiotiques) que les populations poussant sous forêt de Pin d'Alep qui présentent une méiose plus régulière. Selon Jackson *et al.* (2002), les chromosomes B augmentent la fréquence des univalents formés par les chromosomes A ce qui pourrait expliquer la plus grande fréquence des univalents dans les populations dont les fréquences des chromosomes B sont les plus élevées. D'après Amirouche-Hamza (2007), chez le dactyle, les fréquences des chiasmas et de multivalents sont élevées dans les stations à fortes contraintes écologiques.

La présence de bivalents et de tétravalents chez le tétraploïde, indique que la diploïdisation n'est pas terminée. Cette diploïdisation est définie par Gorenflot et Raicu (1980) comme "le processus de différenciation structurale et génique des génomes d'un polyploïde, ayant comme conséquence un comportement méiotique et une ségrégation génétique de type diploïde".

4- Chromosomes B

Les chromosomes B sont observés en mitose et en méiose chez le diploïde *H. pallidum* (Benhizia 2001), par contre chez le diploïde *naudinianum* et le tétraploïde *perrauderianum*, ils sont observés chez toutes les populations en méiose mais rarement en mitose et uniquement à la première division méiotique. Un mécanisme de régulation du nombre de chromosomes a été observé et

démontré pour la première fois chez le Mil par Khalfallah *et al.* (1988) et Khalfallah (1990). Lorsque ce nombre atteint un seuil critique (surcharge en hétérochromatine), les chromosomes B forment un multivalent en étoile et sont éliminés de la cellule à la télophase I de la méiose. Selon Siljak-Yakovlev (2000), ce mécanisme est très utile chez la plante puisque par la suite, la télophase II est tout à fait régulière, sans formation de micro-noyaux et donc de micro-pollens.

En méiose, les chromosomes B se présentent sous forme d'univalents ou de bivalents, ne s'apparient pas avec les chromosomes A et présentent un nombre et une taille variables. Les travaux effectués sur les chromosomes B ont souvent montré l'existence d'une corrélation entre leur présence et des facteurs écologiques spécifiques comme la quantité de pluie (Hewitt et John 1967), la température (Hewitt et Brown 1970) ou la teneur en argile du sol (Bosemark 1967). Certains auteurs ont noté une corrélation entre le nombre de chromosomes B et les conditions défavorables de l'environnement. Par exemple, chez *Allium schoenoprasum*, les individus possédant des chromosomes B seraient plus résistants et survivent mieux que ceux qui n'ont en pas (Gorenflot et Raicu 1980).

Chez *H. pallidum*, seules les populations provenant d'un milieu contaminé par l'antimoine (zone minière) présentent des chromosomes B (Benhizia *et al.* 2003). Dans notre étude, la présence des chromosomes B dans toutes les populations d'*H. perrauderianum* pourrait être liée aux conditions du milieu dont une altitude élevée (1600m) et un climat semi-aride. Les pressions anthropiques pourraient expliquer leur nombre plus élevé dans les populations de bord de route. Selon Camacho *et al.* (2000) le rôle des chromosomes B est encore mal déterminé.

5- Caractères palynologiques

La palynologie s'intéresse à l'étude du pollen, organe reproducteur mâle des plantes à fleurs. Un pollen est souvent spécifique d'un groupe végétal (famille, genre), parfois même de l'espèce. Il est maintenant admis que les caractères palynologiques sont susceptibles de donner des renseignements intéressants dans les études de systématique et permettent de comprendre l'évolution des végétaux.

La viabilité des grains de pollen est l'un des facteurs qui influent le pouvoir germinatif. Chez *H. naudinianum* et *H. perrauderianum*, la viabilité pollinique est très importante (plus de 80%). Les populations diploïdes présentent un taux de viabilité (85.21%) légèrement inférieur que chez les tétraploïdes (90.14%).

A l'observation, nous avons également noté que la quantité de pollen produite est très importante. Le facteur qui influence le mode de reproduction sexuée chez les végétaux est surtout la production de pollen.

H. naudinianum et *H. perrauderianum* présentent des grains de pollen de petite taille, inférieure à 25 μm . Le diamètre polaire moyen des populations diploïdes est de 23.17 μm et il est de 24.15 μm pour les populations tétraploïdes. La règle générale admettant que les diploïdes ont des grains de pollen de taille plus petite que celle des tétraploïdes semble donc confirmée dans cette étude même si la différence n'est pas importante.

Observés au microscope photonique, les grains de pollen des deux espèces ont une seule forme, allongée, retrouvée chez d'autres espèces du genre *Hedysarum* comme *H. coronarium*, *H. carnosum* et *H. flexuosum* par Béji (1976).

Le pollen d'*H. naudinianum* et d'*H. perrauderianum* est longiaxe, prolata ou subprolata, isopolaire et tricolpé. Béji (1980), rapporte que des travaux concernant le pollen des *Hedysarum* diploïdes ont montré que celui-ci est longiaxe, isopolaire, tricolpé ou tétracolpé. Pavlova *et al.* (2000) signalent également un pollen prolata et tricolpé avec un diamètre polaire inférieur à 25 μm chez deux espèces du genre *Hedysarum* (*H. tauricum* et *H. grandiflorum*) de la Bulgarie.

6- Taille du génome

Le contenu en ADN nucléaire des angiospermes a été publié dans de nombreux articles. Les chercheurs ont montré que la teneur en ADN par génome est en général constante et est donc caractéristique de chaque espèce. Toutefois, des variations considérables interspécifiques de la teneur en ADN par génome ont été notées. Les changements des séquences d'ADN nucléaire sont dus à la divergence et au processus d'évolution des espèces.

Leitch *et al.* (1988) ont fourni un histogramme des valeurs C de 2802 espèces incluant 1794 diploïdes, 658 polyploïdes et 350 de niveaux de ploïdie inconnus. En se basant sur ces données, ils ont classé les espèces en cinq catégories:

- 1- très petit génome: les valeurs de 1C sont ≤ 1.4 pg,
- 2- petit génome: 1.41 - 3.5 pg,
- 3- génome moyen: 3.51 - 13.99 pg,
- 4- génome grand: 14 - 34.99 pg
- 5- génome très grand: ≥ 35 pg.

D'après cette classification, deux types de génomes sont identifiés:

- très petit génome (0.75 pg/1C) chez le diploïde *H. pallidum*.
- petit génome (1.68 - 3.32 pg/1C) chez le diploïde *H. naudinianum* et le tétraploïde *H. perrauderianum*.

La présente analyse montre que la taille du génome des espèces étudiées est relativement petite. Dans la littérature seules six espèces d'*Hedysarum* ont fait l'objet de mesure de la taille du génome. Il s'agit des six espèces diploïdes endémiques de la Turquie dont les valeurs varient de 4.65 à 6.75 pg/2C (Akpınar et Yildiz 1999). Elles présentent un génome petit à moyen d'après la classification de Leitch *et al.* (1988). Ces valeurs montrent que dans le genre *Hedysarum*, les espèces diploïdes endémiques turques ont une taille du génome supérieur à celles des diploïdes endémiques algériennes et sont plutôt proches de l'espèce tétraploïde.

La taille du génome mesurée chez les angiospermes varie de 0.0648 pg chez *Genlisea margaretae* à 152.23 pg chez *Paris japonica* pour la valeur 1 C (Bennett et Leitch 2011), nous pouvons dire que la taille des espèces algériennes et turques du genre *Hedysarum* (0.75 à 3.375 pg pour la valeur 1C) se classe parmi les valeurs les plus basses. Siljak-Yakovlev *et al.* (2010), ont montré aussi que sur 343 taxons végétaux, 73% appartiennent au groupe de très petit à petit génome. Leitch *et al.* (2005), ont conclu à partir de la valeur-C comprise entre ≤ 1.4 pg et ≥ 3.5 pg, que la taille du génome ancestral des angiospermes était relativement petite.

Les diploïdes montrent une différence significative de la quantité d'ADN. L'ADN 2C d'*H. naudinianum* (3.36 pg) est nettement supérieure à celle d' *H. pallidum* (1.5 pg). La variation de la teneur en ADN nucléaire n'est pas liée au nombre de chromosomes ($2n = 16$). Cette même observation a été faite par Akpınar et Yildiz (1999) sur les espèces diploïdes turques ($2n = 16$) du genre *Hedysarum* dont les valeurs varient de 4.65 à 6.75 pg/2C et par Trivers *et al.* (2004). La variabilité de la teneur en ADN parmi les espèces diploïdes peut-être le résultat de plusieurs événements évolutifs indépendants. En effet, il a été rapporté par Bennetzen *et al.* (2005) que la différence de la taille du génome entre les espèces est le résultat du changement de l'ADN non codant. Dans la plupart des cas, ceci concerne surtout, les séquences répétées comme les éléments transposables. La présence des séquences hautement répétées au niveau des sites d'ADNr peut conduire à une différence de la taille du génome entre espèces d'un même niveau de ploïdie (Ozias-Akins et Jarret 1994). Nos résultats obtenus à partir de l'application de la technique FISH sur l'ADNr 5S et 35S semblent indiquer une différence entre *H. pallidum* et *H. naudinianum*.

La quantité d'ADN augmente avec la taille des chromosomes. En effet, *H. naudinianum* est caractérisée par une taille des chromosomes plus grande que celle d'*H. pallidum*. Cette corrélation positive entre la quantité d'ADN et la taille des chromosomes observée dans notre étude a été aussi rapportée chez plusieurs taxa, dans les genres *Echinops*, *Centaurea* et *Ipomoea* (Garnatje *et al.* 2004; Siljak-Yakovlev *et al.* 2005; Srisuwan *et al.* 2006). Dans notre cas, la différence dans la taille du génome des diploïdes serait plutôt due à une différence dans la taille des chromosomes et l'apport que peut avoir la présence de séquences répétées.

Théoriquement, les polyploïdes devraient avoir une augmentation des valeurs C par rapport à leurs ancêtres diploïdes, cette augmentation étant en proportion directe avec leur niveau de ploïdie. Trois principales tendances relatives à l'évolution de la taille du génome chez les polyploïdes se dégagent: i) la plupart des polyploïdes ont des quantités d'ADN directement proportionnelles à celles des diploïdes les plus proches; ii) beaucoup de polyploïdes présentent une quantité d'ADN plus faible que prévue; iii) quelques polyploïdes montrent au contraire une quantité d'ADN plus élevée que celle attendue par la proportionnalité à partir des diploïdes les plus proches (Leitch et Bennett 2004). Le tétraploïde *H. perrauderianum* présente une quantité d'ADN (6.64 pg) qui se rapproche du double de celle du diploïde *H. naudinianum* (3.36 pg), ce qui est proportionnel au nombre de chromosomes. La valeur monoploïde de la taille du génome (Cx) indique que ces deux espèces sont très proches.

7- Origine possible du tétraploïde *H. perrauderianum*

Il est souvent difficile de déterminer s'il s'agit d'allopolyploïdie ou d'autopolyploïdie, cette tâche peut être facilitée par une analyse fine du caryotype et par l'observation de la méiose. Cependant, dans le cas des paléopolyploïdes, chez qui la diploïdisation est achevée depuis longtemps et les restructurations chromosomiques se sont accumulées, cela devient presque impossible au niveau caryologique (Siljak-Yakovlev 1986).

Les résultats obtenus permettent de discuter l'origine possible du tétraploïde *H. perrauderianum*. L'étude de l'organisation des chromosomes montre des caryotypes très similaires entre le diploïde *H. naudinianum* et le tétraploïde *H. perrauderianum*. En effet, plusieurs paramètres permettent d'avancer l'hypothèse sur l'origine d'*H. perrauderianum* à partir de l'espèce diploïde *H. naudinianum* par autopolyploïdie:

- la grande ressemblance morphologique entre *H. naudinianum* et *H. perrauderianum*,

- la similitude de certaines paires chromosomiques marquées par les bandes C qu'on peut regrouper deux par deux et d'autres partiellement différentes,
- le nombre, la localisation et l'intensité des signaux 5S et 35S offrent la possibilité de tester l'hypothèse concernant l'origine auto ou allopolyploïde du tétraploïde. Dans le cas d'autopolyploïdie, un marqueur génétique serait d'abord présent en double exemplaire chez l'autotétraploïde. Dans le cas d'allopolyploïdie, le nombre de marqueurs dans la descendance tétraploïde serait la somme de celui présent chez les ancêtres diploïdes. Dans notre cas, le nombre de loci des ADNr 5S et 35S est en double exemplaire. Ces signaux occupent les mêmes positions sur les chromosomes et d'intensité égale à ceux du diploïde *H. naudinianum*,
- la présence de bivalents et de multivalents renforce l'hypothèse de l'autotétraploïdie. Le taux élevé de bivalents peut suggérer la diploïdisation en cours de cette espèce,
- la taille du génome de l'espèce tétraploïde *H. perrauderianum* est pratiquement le double du diploïde *H. naudinianum*.

Ces faits renforcent l'hypothèse que *H. perrauderianum* a une origine autotétraploïde, due au dédoublement des chromosomes d'*H. naudinianum*, et est en voie de diploïdisation.

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette étude était d'évaluer la diversité intra- et interspécifique du caryotype chez trois espèces endémiques du complexe *Hedysarum* L. Des techniques de cytogénétique classique et moléculaire sont appliquées pour étudier les mécanismes cytogénétiques de la microévolution et de mieux comprendre les relations phylogénétiques existant au sein d'un ensemble de taxons.

Les résultats présentés dans cette étude apportent de nouvelles connaissances sur l'organisation du génome chez le genre *Hedysarum* L. à travers l'étude du caryotype, de l'hétérochromatine, des gènes ribosomiques, de quelques caractères palynologiques, de la méiose et de la taille du génome.

Nous avons confirmé à travers cette étude le nombre chromosomique $2n = 16$ chez le diploïde *H. naudinianum* et $2n = 32$ chez le tétraploïde *H. perrauderianum* soit $x = 8$. Les dénombrements chromosomiques effectués sur le tétraploïde ont permis de mettre en évidence deux nombres chromosomiques différents $2n = 32$ et $2n = 18$ au sein d'un même individu. Bousba (1992) a observé, au sein de deux populations d'*H. perrauderianum*, des individus où toutes les cellules étaient à $2n = 18$. Nos prospections à ce jour, ne nous ont pas permis de retrouver ces populations. Le nombre 18 a également été signalé par Issolah *et al.* (2006) et Abdelguerfi-Berrekia *et al.* (1988) chez les diploïdes *H. coronarium* L. et *H. pallidum* Desf.

Le diploïde *H. naudinianum* et le tétraploïde partagent des caractéristiques communes tant sur le plan morphologique que sur le plan moléculaire.

L'analyse des caryogrammes et des idiogrammes révèle une grande similarité dans la forme et la taille des chromosomes. Ces derniers sont en majorité métacentriques, de taille petite, toutes les paires sont sensiblement de la même dimension, ce qui indique des caryotypes symétriques et primitifs. Le caryotype de l'espèce *H. pallidum* est le plus évolué.

La répartition de l'hétérochromatine est semblable entre le diploïde *naudinianum* et le tétraploïde *perrauderianum*. Elle se trouve sous forme de points et de fines bandes localisée dans les régions centromériques, intercalaires et télomériques alors que chez *H. pallidum*, elle est présente sous forme de blocs et de larges bandes intercalaires et télomériques. Chez le tétraploïde, le C-banding nous a permis de regrouper deux par deux certaines paires chromosomiques qui présentent le même pattern. La similitude de certaines paires chromosomiques marquées par les bandes C et d'autres partiellement différentes suggère que *H. perrauderianum* est un autotétraploïde en voie de diploïdisation.

Les loci 5S et 35S ne sont pas colocalisés et montrent des différences dans la taille et l'intensité des spots. Les signaux 35S sont situés au niveau télomérique des bras courts chez les trois espèces par contre les signaux 5S se situent dans la région télomérique pour *H. naudinianum* et *H. perrauderianum* et dans la région centromérique pour *H. pallidum*. Ils sont associés aux régions riches en bases GC. Le nombre de loci d'ADNr 5S et 35S est en corrélation avec le niveau de ploïdie. En effet, les diploïdes $2n = 16$ et le tétraploïde $2n = 32$ présentent respectivement 2 et 4 signaux.

Chez le tétraploïde, le nombre maximal de nucléoles par cellule est étroitement corrélé avec le nombre de constriction secondaires, le nombre de bandes chromomycine positives (fortement marquées) et le nombre de NORs. Chez les diploïdes, la majorité des noyaux interphasiques présente un seul nucléole de grande taille. Il semble que tous les chromosomes NORs participent à la formation d'un unique nucléole de grande taille.

Le comportement méiotique s'est révélé différent entre les populations d' *H. perrauderianum*. Les populations se trouvant en bord de route ont une méiose plus perturbée que les populations poussant sous forêt de Pin d'Alep qui présentent une méiose plus régulière. Les deux groupes de populations se distinguent également par des fréquences d'anomalies plus élevées chez les populations de bord de route. Le diploïde présente une méiose régulière.

Le taux de viabilité pollinique est très important chez *H. naudinianum* et *H. perrauderianum* (plus de 80%). Les grains de pollen sont de petite taille et présentent une seule forme simple et allongée.

Les espèces présentent des chromosomes B de nature hétérochromatique et dont le nombre varie de 1 à 4. Nous avons constaté que chez certaines populations, la présence des chromosomes B augmente la fréquence des univalents formés par les chromosomes A.

D'après la classification de Leitch *et al.* (1988), la taille du génome des espèces étudiées est petite par rapport à d'autres angiospermes. Les diploïdes montrent une différence significative de la quantité d'ADN. La variation de la teneur en ADN nucléaire n'est pas liée au nombre de chromosomes ($2n = 16$) mais elle est liée à leur taille. L'espèce tétraploïde *H. perrauderianum* présente une quantité d'ADN qui se rapproche du double de celle du diploïde *H. naudinianum*, ce qui est proportionnel au nombre de chromosomes.

Compte tenu de toutes les données obtenues à partir de la cytogénétique classique et moléculaire, nous pouvons considérer que *H. perrauderianum* est phylogénétiquement très proche d'*H. naudinianum* que d'*H. pallidum*. *H. naudinianum* pourrait représenter l'ancêtre du tétraploïde par autopolyploïdie. Ces observations méritent d'être poursuivies et analysées sur l'ensemble des espèces du genre *Hedysarum* en Algérie et dans d'autres pays du bassin méditerranéen.

Perspectives

Ce travail de caractérisation nous a permis d'arriver à des résultats intéressants qui nous ouvrent de nouvelles pistes de recherche:

- confirmer ou infirmer le nombre chromosomique 18 observé chez certaines espèces du genre *Hedysarum*, par des travaux sur d'autres espèces et populations de ce complexe;
- déterminer avec certitude la nature du tétraploïde par une hybridation génomique *in situ*;
- établir la relation entre la présence des chromosomes B dans le genre *Hedysarum* et les conditions de l'environnement sur un plus grand nombre d'espèces et de populations de milieux écologiques différents;
- déterminer, au niveau intraspécifique, la taille du génome de populations récoltées de milieux différents pour voir l'influence de l'origine géographique sur la taille du génome.

Références bibliographiques

- Abdelguerfi-Berrekia R., 1985.** Contribution à l'étude du genre *Hedysarum* L. en Algérie. Thèse de Magister, option phytotechnie. I.N.A. Alger, 131p.
- Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N., Guittonneau G.G., 1986.** IOPB. Chromosome Number Reports XC. Taxon, 35 (1): 197p.
- Abdelguerfi-Berrekia R., Abdelguerfi A., Bounaga N., Guittonneau G.G., 1988.** Contribution à l'étude des espèces spontanées du genre *Hedysarum* L. en Algérie. III. Dénombrement chromosomique chez 29 populations de huit (8) espèces. Ann. Inst. Nat. Agro. El-Harrach, 12(1): 233-247.
- Akpinar N., Yildiz B., 1999.** Nuclear DNA contents of some endemic *Hedysarum* L. species. Turkish Journal of Botany, 23: 229-232.
- Ali Mohammed BH., Meister A., Schubert I., 2000.** DNA content, rDNA loci, and DAPI bands reflect the phylogenetic distance between *Lathyrus* species. Genome, 43: 1027-1032.
- Allen O.N., Allen E.K., 1981.** The Leguminosae . A Source Book of Characteristics. Uses and Nodulation . Univ. Wisconsin Press. Madison, WI: 324-325.
- Amirouche-Hamza N., 2007.** Le complexe polyploïde *Dactylis glomerata* L. en Algérie. Diversité génétique et synthèse systématique. Thèse de Doctorat d'Etat. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, 171p.
- Anderson S., 1994.** Area and endemism. The Quarterly Review of Biology, 69.
- Ansari H.A., Ellison N.W., Reader S.M., Badaeva E.D., Friebe B., Miller T.E., Williams W.M., 1999.** Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-16S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. Annals of Botany, 83: 199-206.
- Arano H., Saito H., 1980.** Cytological studies in family Umbelliferae. V. Karyotypes of seven species in subtribe Seselinae. La Kromosomo, II-17: 471-480.
- Arslan E., Ertugrul K., Tugay O., Dural H., 2012.** Karyological studies of the genus *Onobrychis* Mill. and the related genera *Hedysarum* L. and *Sartoria* Boiss. and Heldr. (Fabaceae, Hedysareae) from Turkey. Caryologia, 65(1): 11-17.
- Baatout H., Combes D., Marrakchi M., 1991.** Reproductive system and population structure in two *Hedysarum* subspecies. 1. Genetic variation within and between populations. Genome, 34: 396-406.
- Battandier J.A., Trabut L., 1902.** Flore analytique et synoptique de l'Algérie et de la Tunisie. Ed. Giralt. Alger, 117-118.
- Beji M., 1976.** Premiers essais de polyploïdisation chez *Hedysarum coronarium* L. et *Hedysarum spinosissimum* L. ssp *capitatum* Desf. D.E.A. Faculté des Sciences. Tunis, 37p.
- Beji M., 1980.** Etude des autotétraploïdes d'*Hedysarum coronarium* L. induits expérimentalement. Populations de Maktar. Doctorat 3^{ème} cycle. Faculté des Sciences. Tunis, 64p.
- Beji M., Combes D., Marrakchi M., Kchouk M. L., 1991.** Interaction espèce-tétraploïdie dans le genre *Hedysarum* L. AL Biruniya. Rev. Mar. Pharm., 7(1): 21-36.
- Benhizia H., 2001.** Etude caryologique d'une espèce endémique Nord-Africaine, *Hedysarum pallidum* Desf., provenant d'un milieu contaminé par l'antimoine. Thèse Magister. Univ Mentouri Constantine, 60p.
- Benhizia H., Benhizia Y., Ghernoub L., Siljak-Yakovlev S., Khalfallah N., 2013.** Meiotic behavior and karyotype features of endangered endemic fodder species *Hedysarum perrauderianum* (Fabaceae) in some populations from Algeria. Caryologia, 66(2): 195-204.

- Benhizia H., Rached-Mosbah O., Benhizia Y., Kouachi A., Khalfallah N., 2003.** Etude cytogénétique d'*Hedysarum pallidum* Desf., espèce endémique Nord-africaine, tolérante à l'antimoine. Université de Constantine. Sciences et Technologie, 20: 7-13.
- Bennett M.D., Leitch I.J., 2011.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow. *Annals of Botany*, 107: 467-590.
- Bennett M.D., Bhandol P., Leitch I.J., 2000.** Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. *Annals of Botany*, 86(4): 859-909.
- Bennett M.D., Leitch I.J., Hanson L., 1998.** DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany*, 82: 121-134.
- Bennetzen J.L., Ma J., Devos K.M., 2005.** Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Annals of Botany*, 95(1): 127-132.
- Bolkhoskikh Z., Grif V., Matvejeva T., Zakharyeva O., 1974.** Chromosome numbers of flowering plants. Koenigstein, 299p.
- Bonciarelli F., Monotti M., 1976.** Una nuova varietà di sulla (*Hedysarum coronarium* L.). *Rivista di Agronomia*, 10: 52-56.
- Bonnier G., 1934.** Flore complète illustrée en couleurs de France Suisse et Belgique (comprenant la plupart des plantes d'Europe). Tome troisième: 84-85.
- Bosemark N.O., 1967.** Edaphic factors and the geographical distribution of accessory chromosomes in *Phleum phleoides*. *Hereditas*, 57: 239-262.
- Bousba A., 1992.** Contribution à l'étude morphologique et comparative de deux espèces du genre *Hedysarum* L. (F. des légumineuses) endémiques de l'Algérie. Thèse de Magister. Université de Sétif, 80p.
- Boussaid M., Ben Fadhel N., Trifi-Farah N., Abdelkefi A., Marrakchi M., 1995.** Les espèces Méditerranéennes du genre *Hedysarum* L. In: Ressources génétiques des plantes fourragères et à gazon. BRG/INRA. France, pp: 115-130.
- Brown S.C., Bergounioux C., Tallet S., Marie D., 1991.** Flow cytometry of nuclei for ploidy and cell cycle analyses: In A laboratory guide for cellular and molecular plant biology, Edited by I. Negrutiu and G.B. Gharti-Chherti, Birkhäuser Verlag. Basel, pp: 326-345.
- Camacho J.P.M., Bakkali M., Corral J.M., Cabrero J., Lopez-Leon M.D., Aranda L., Martin-Alganza A., Perfectti F., 2002.** Host recombination is dependent on the degree of parasitism. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 269: 2173-2177.
- Camacho J.P.M., Sharbel T.F., Beukeboom L.W., 2000.** B-chromosome evolution. *Philos R Trans. Soc. Lond. Biol Sci.*, 355: 163-178.
- Cerbah M., Coulaud J., Siljak-Yakovlev S., 1998.** rDNA organization and evolutionary relationships in the genus *Hypochaeris* (Asteraceae). *Journal of Heredity*, 89: 312-318.
- Cerbah M., Kevei Z., Siljak-Yakovlev S., Kondorosi E., Kondorosi A., Trinh T.H., 1999.** FISH Chromosome mapping allowing karyotype analysis in *Medicago truncatula* Lines Jemalong J5 and R-108-1. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 12(11): 947-950.
- Chennaoui S., Marghali M., Marrakchi M., Trifi-Farah N., 2007.** Phylogenetic relationships in the North African genus *Hedysarum* as inferred from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 389-397.
- Chiche J., Brown S.C., Leclerc J.C., Siljak-Yakovlev S., 2003.** Genome size, heterochromatin organization and ribosomal gene mapping in four species of *Ribes*. *Canadian Journal of Botany*, 81(11): 1049-1057.

- Cohen S., Houben A., Segal D., 2008.** Extrachromosomal circular DNA derived from tandemly repeated genomic sequences in plants. *Plant Journal*, 53: 1027-1034.
- Cohen S., Yacobi K., Segal D., 2003.** Extrachromosomal circular DNA of tandemly repeated genomic sequences in *Drosophila*. *Genome Research*, 13: 1133-1145.
- Conger A.D., Fairchild L.M., 1953.** A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technology*, 28: 107-112.
- Contandriopoulos J. 1962.** Recherches sur la flore endémique de la Corse et sur ses origines. Thèse, Université de Montpellier, 354p.
- Contandriopoulos J. 1964.** Recherches sur la flore endémique de la Corse et sur ses origines (II). *Revue Générale de Botanique*, 71: 361-384.
- Cosson E., 1856.** Notes sur quelques espèces nouvelles d'Algérie. *Bull. Soc. Bot. France*, 3: 670-676.
- De Candolle A.P., 1820.** Essai élémentaire de géographie botanique. Strasbourg.
- Dobigny G., Ozouf-Costaz C., Bonillo C., Volobouev V., 2002.** Ag-NORs are not always true NORs: new evidence in mammals. *Cytogenetic and Genome Research*, 98:75-77.
- Dolezel J., Bartos J., Voglmayr H., Greilhuber J., 2003.** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*, 51A: 127-128.
- Erdtman G., 1952.** Pollen morphology and plant taxonomy. Angiosperms. Almqvist and Wiksell. Stockholm, 539p.
- Faegri K., Deuse P., 1960.** Size variation in pollen grains with different treatments. *Pollen et Spores*, 2: 293-298.
- Falisticco E., Maurelli L., 1990.** Chromosome study in *Hedysarum coronarium* L. *Annali di Botanica (Rome)*, 48: 81-86.
- Favarger C., Contandriopoulos J., 1961.** Essai sur l'endémisme. *Bull. Soc. Bot. Suisse.*, 71: 384- 408.
- Favarger C., Siljak-Yakovlev S., 1986.** A propos de la classification des taxons endémiques basée sur la cytotaxonomie et la cytogénétique. Colloque international de botanique pyrénéenne, La Cabanasse (Pyrénées-Orientales). Société Botanique de France. Groupement Scientifique Isard. Paris, pp: 287-303.
- Feulgen R., Rossenbeck H., 1924.** Mikroskopisch-chemischer nachweis einer nuckleinsäure vom typus der tymonukleinsäure und die darauf beruhende elektive färbung von zell hernen in mikropischen präparaten. *F. Hoppe-Seyler's zeitschrift für. Physiologische Chemie*, 135: 203-248.
- Figier J., 1982.** Etude de la variabilité et du déterminisme de la morphologie de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie. Implications concernant l'amélioration de cette plante fourragère dans ce pays. Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Paris-Sud (Orsay), 236p.
- Galbraith D.W., Harkins K.R., Maddox J.M, Ayres N.M, Sharma D.P, Firoozabady E., 1983.** Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049-1051.
- Garcia S., Garnatje T., Hidalgo O., McArthur E.D., Siljak-Yakovlev S., Vallès J., 2007.** Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant Syst Evol.*, 267: 79-92.

- Garcia S., Lim K.Y., Chester M., Garnatje T., Pellicer J., Valles J., Leitch A.R., Kovarik A., 2009.** Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): first evidence from angiosperms. *Chromosoma*, 118: 85-97.
- Garcia S., Panero J.L., Siroky J., Kova A., 2010.** Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes (rDNA) in the Asteraceae family. *Plant Biology*, 10: 176.
- Garnatje T., Vallés J., Garcia S., Hidalgo O., Sanz M., Canela A.M., Siljak-Yakovlev S., 2004.** Genome size in *Echinops* L. and related genera (Asteraceae, Cardueae): Karyological, ecological and phylogenetic implications. *Biology of the Cell*, 96: 117-124.
- Geber G., Schweizer D., 1987.** Cytochemical heterochromatin differentiation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air-drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Systematics and Evolution*, 158: 97-106.
- Gerlach W.L., Dyer T.A., 1980.** Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucleic Acids Research*, 8(21): 4851-4865.
- Gharzouli R., Benahmed A., Benhizia Y., Benguedouar A., 2012.** Influence of carbon source on the production of exopolysaccharides by *Rhizobium sullivanii* and on the nodulation of *Hedysarum coronarium* L. legume. *African Journal of Microbiology Research*, 6(30): 5940-5946.
- Gharzouli R., Carpené M.A., Couderc F., Benguedouar A., Poinot V., 2013.** Relevance of fucose-rich extracellular polysaccharides produced by *Rhizobium sullivanii* nodulating *Hedysarum coronarium* L. legumes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6): 1764-1776.
- Gorenflot R., Raicu P., 1980.** Cytogénétique et évolution. Ed. Masson, 181p.
- Greilhuber J., Dolezel J., Lysak M. A., Bennett M.D., 2005.** The origin evolution and proposed stabilization of the terms 'Genome size' and 'C-value' to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 95: 255-260.
- Hannachi-Salhi A., Combes D., Baatout H., Figier J., Boussaid M., Marrakchi M., Trifi Farah N., 2002.** Evaluation des ressources génétiques des espèces du genre *Hedysarum* dans le bassin méditerranéen. *Plant Genetic Resources Newsletter*, 130: 65-72.
- Hasterok R., Maluszynska J., 2000.** Nucleolar dominance does not occur in root tip cells of allotetraploid *Brassica* species. *Genome*, 43: 574-579.
- Heitz E., 1928.** Das Heterochromatin der Moose. *J.B. Wiss. Bot.*, 69: 762-818.
- Heslop-Harrison J.S., Schwarzacher T., Ananthawat-Jonsson K., Leitch A.R., Shi M., Leitch I.J., 1991.** In situ hybridization with automated chromosome denaturation. *Techniques. Methods in Molecular and Cellular Biology*, 3: 109-116.
- Hewitt G.M., Brown F.M., 1970.** The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* V. A steep cline in East Anglia. *Heredity*, 25: 363-371.
- Hewitt G.M., John B., 1967.** The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb) III. The statistics. *Chromosoma*, 21: 140-162.
- Houben A., Nasuda S., Endo T.R., 2011.** Plant B chromosomes. *Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 701: 97- 111.
- Howell W.M., Black D.A., 1980.** Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014-1015.

- Issolah R., Benhizia H., Khalfallah N., 2006.** Karyotype variation within some natural populations of sulla (*Hedysarum coronarium* L., Fabaceae) in Algeria. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 1653-1664.
- Jackson R.C., Ngan N., Hao N., 2002.** Chromosome-specific desynapsis in the $n = 2$ race of *Haplopappus gracilis* (Compositae). *American Journal of Botany*, 89(5): 777-782.
- Jahandiez E., Maire R., 1932.** Catalogue des plantes du Maroc. Tome deuxième. Dicotylédones Archichlamydées: 422-423.
- Jahier J., Chèvre A.M., Delourme R., Eber F., Tanguy A.M., 1992.** Techniques de cytogénétique végétale. Ed INRA. Paris, 184p.
- John B. Hewitt G. M., 1965.** The B chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb). I. The mechanics. *Chromosoma (Berl)*, 16: 548-578.
- Jones R.N., 1975.** B chromosomes systems in flowering and animal species. *International Review of Cytology*, 40: 1-100.
- Jones R.N., Rees H., 1982.** B chromosomes. Ed Academic Press. London et New York.
- Jones R.N., 1985.** Are B chromosomes Selfish? In: Cavalier-Smith T (Ed) The evolution of genome size. Wiley Chichester UK, pp: 397-425.
- Jones R.N., Viegas W., Houben A., 2008.** A Century of B Chromosomes in plants – so what? *Annals of Botany*, 101: 767-775.
- Jones R. N., 2012.** B chromosomes in plants. *Plant Biosystems*, 146 (3): 727-737.
- Kamaté K., Brown S.C., Durand P., Bureau M.J., Nay de D., Trinh H.T. 2001.** Nuclear DNA content and base composition in 28 taxa of *Musa*. *Genome*, 44: 622-627.
- Khalfallah N., 1990.** Les relations génétiques entre formes sauvages et cultivées du pool primaire du mil, *Pennisetum typhoides* Stapf et Hubb. Analyses cytogénétiques et biométriques conjointes de l'organisation de la variabilité. Thèse de doctorat d'Etat. Université de Constantine, 75p.
- Khalfallah N., Sarr A., Barghi N., Siljak-Yakovlev S., 1988.** Evidence of karyotypic particularities in Pearl Millet (*Pennisetum typhoides* Stapf and Hubb) and their incidence on chromosomal behavior. *Genome*, 30 (supply, 1): 284.
- Le Comber S.C., Ainouche M.L., Kovarik A., and Leitch A.R., 2010.** Making a functional diploid: from polysomic to disomic inheritance. *New Phytologist*, 186(1): 113-122.
- Leitch I. J., Chase M. W., Bennett M.D., 1988.** Phylogenetic analysis of DNA C-Values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany*. 82: 85-94.
- Leitch I.J., Bennett M.D., 2004.** Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82: 651-663.
- Leitch I.J., Soltis D.E., Soltis P.S., Bennett M.D., 2005.** Evolution of DNA amounts across land plants (Embryophyta). *Annals of Botany*, 95: 207-217.
- Leitch I.J., Bennett M. D., 1997.** Polyploidy in Angiosperms. *Trends in Plant Science*, 8: 470-76.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A.A., 1964.** Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201-220.
- Li X., Guo R., Pedersen C., Hayman D., Langridge P., 1997.** Physical localization of rRNA genes by two-colour fluorescent *in situ* hybridization and sequence analysis of the 5S rRNA gene in *Phalaris coerulescens*. *Hereditas*, 126(3): 289-294.

- López M.G., Wulff A.F., Poggio L., Xifreda C.C., 2005.** Chromosome numbers and meiotic studies in species of *Senecio* (Asteraceae) from Argentina. Bot. J. Linn. Soc., 148: 465-474.
- Maire R., 1955.** Flore de l'Afrique du Nord. Ed. Le Chevalier. Paris, Vol. III: 65-69.
- Marghali S., Ghariani S., Marrakchi M., Trifi-Farah N., 2003.** Diversité génétique révélée par des marqueurs AFLP entre populations d'*Hedysarum coronarium* L. Fourrages, 176 :493-504.
- Marie D., Brown S.C., 1993.** A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. Biology of the Cell, 78: 41-51.
- Munby G., 1866.** Notice sur les noms arabes des plantes d'Algérie, pp: 217-220.
- Moore R.J., 1971.** Index to plant chromosome numbers .1967-71.Utrecht, 238p.
- Murata M., Heslop-Harrison J.S., Motoyoshi F., 1997.** Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. Plant Journal, 12: 31-37.
- Muratovic E., Bogunic F., Soljan D., Siljak-Yakovlev S., 2005.,** Does *Lilium bosniacum* merit species rank? A classical and molecular-cytogenetic analysis. Plant Systematics and Evolution, 252: 97-109.
- Östergren G., Haneen K.W., 1962.** A squash technique for chromosome morphological studies. Hereditas, 48: 332-341.
- Otto S.P., Whitton., 2000.** Polyploid incidence and evolution. Annual Review of Genetics, 34: 401-437.
- Ozias-Akins P., Jarret R.L., 1994.** Nuclear DNA content and ploidy levels in the genus *Ipomea*. Journal of American Society of Horticultural Science, 119: 110-115.
- Pantulu J.V., 1960.** Accessory chromosomes in *Pennisetum typhoides*. Current Science, 29: 28-29.
- Pavlova D.k., Manova V.I., 2000.** Pollen morphology of the genera *Onobrychis* and *Hedysarum* (Hedysareae, Fabaceae) in Bulgaria. Annales Botanici Fennici, 37(3): 207-217.
- Peer Y., Van de Maere S., Meyer A., 2009.** The evolutionary significance of ancient genome duplications. Nature Reviews Genetics, 10(10): 725-732.
- Pires J.C., Lim K.Y., Kovarik A., Matyasek R., Boyd A., Leitch A. R., Leitch I.J., Bennett M.D., Soltis P.S., Soltis D.E., 2004.** Molecular cytogenetic analysis of recently evolved *Tragopogon* (Asteraceae) allopolyploids reveal a karyotypes that is additive of the diploide progenitors. American Journal of Botany. 91(7): 1022-1035.
- Pomel N.A., 1874.** Nouveaux matériaux pour la flore atlantique. Bull. Soc. Hist. Nat. Afrique du Nord, 19: 48-128.
- Pons A., Boulos L., 1972.** Révision systématique du genre *Sonchus* L. III. Etude palynologique. Bot. Nat., 125: 310-319.
- Puertas M.J., Baeza F., De La Pena A., 1986.** The transmission of B chromosomes in populations of *Secale cereale* and *Secale vavilovii* 1. Offspring obtained from OB and 2B plants. Heredity, 57:389-394.
- Punt W., Blackmore S., Nilsson S., Le Thomas A. 1994.** Glossary of pollen and spore terminology. Lab. Palaeobot. Palynol Foundation. Utrecht, 71p.
- Quezel P., Santa S., 1962.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed.CNRS. France. Tome I, pp: 539-541.

- Ramsey J., Schemske D.W., 1998.** Pathways, mechanisms and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 467- 501.
- Sadaoui S., 1999.** Contribution à l'étude de l'espèce *Hedysarum aculeolatum* Munby (Papilionacée) en Algérie. Morphologie, caryologie, biologie florale et mode de reproduction. Thèse de Magister. Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumédiène (USTHB) Alger, 102p.
- Samouelian F., Gaudin V., Boccara M., 2009.** Génétique moléculaire des plantes. Quae Ed., 208p.
- Sanchez A., Jiménez R., Burgos M., Stitou S., Zurita F., Daiz de la Guardia R., 1995.** Cytogenetic peculiarities in the Algerian hedgehog: silver stains not only NORs but also heterochromatic blocks. *Heredity*, 75: 10-16.
- Schmidt T., Kubis S., Heslop-Harrison J.S., 1995.** Analysis and chromosomal localization of retrotransposons in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) LINEs and TY1-Copia-like elements as major components of the genome. *Chromosome Research*, 3: 335-345.
- Schweizer D., 1976.** Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. *Chromosoma*, 58: 307-324.
- Seijo G.J., Lavia I.G., Fernández A., Krapovickas A., Ducasse D., Moscone A.E., 2004.** Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 91: 1294-1303.
- Siljak-Yakovlev S., Peruzzi L., 2012.** Cytogenetic characterization of endemics: past and future. *Plant biosystems*, 146(3): 694-702.
- Siljak-Yakovlev S., Cartier D., 1986.** Heterochromatin patterns in some taxa of *Crepis praemorsa* complex. *Caryologia*, 39: 27-32.
- Siljak-Yakovlev S., 1986.** Etude cytogénétique et palynologique de Compositae endémiques ou reliques de la flore yougoslave. Thèse de Doctorat. Université Paris Sud. Centre d'Orsay, 217p.
- Siljak-Yakovlev S., 2000.** Titre et travaux scientifiques. C.N.R.S. Département des sciences de la vie. Laboratoire d'Ecologie, Systématique et Evolution. Université Paris Sud, 54p.
- Siljak-Yakovlev S., Pustahija F., Solic M. E., Bogunic F Muratovic E., Basic N., Catrice O., Brown S. C., 2010.** Towards a genome size and chromosome number database of Balkan flora: C-Values in 343 taxa with novel values for 242. *Advanced Science Letters*, 3(2): 190-213.
- Siljak-Yakovlev S., Solice M.E., Catrice O., Brown S.C., Papes D., 2005.** Nuclear DNA content and chromosome number in some diploid and tetraploid *Centaurea* (Asteraceae: Cardueae) from the Dalmatia region. *Plant Biology*, 7: 397-404.
- Siljak-Yakovlev S., Benmalek S., Cerbah M., Bounaga N., Coba de la Pena T., Brown S.C., Sarr A., 1996.** Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *Sexual Plant Reproduction*, 9: 127-132.
- Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Coulaud J., Stoian V., Brown S. C., Zoldos V., Jelenic S., Papes D., 2002.** Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(2-3): 505-512.

- Srisuwan S., Sihachakr D., Siljak-Yakovlev S., 2006.** The origin and evolution of sweet potato (*Ipomea batatas* Lam.) and its wild relatives through the cytogenetic approaches. *Plant Science*, 171(3): 424-433.
- Stebbins G.L., 1971.** Chromosomal evolution in higher plants. E. London: Arnold, 216p.
- Sumner A.T., 1990.** Chromosome banding. Unwin Hyman Ltd. London. U.K.
- Sybenga J., 1975.** Meiotic configuration. Monographs on the theoretical and applied genetics, 1. Springer edition. Berlin, 251p.
- Torche A., Benhizia Y., Benguedouar A., Gharzouli R., Benhizia H., Khelifi D., Squartini A., 2010.** Caractérisation des bactéries isolées à partir des espèces Légumineuses du genre *Hedysarum*: *H. pallidum* Desf., *H. spinosissimum* subsp. *capitatum*, *H. carnosum* Desf. et *H. naudinianum* Coss. *Université Mentouri Constantine. Sciences et Technologie*, 32:43-50.
- Trifi-Farah N., Marrakchi M., 2001.** *Hedysarum* phylogeny mediated by RFLP analysis of nuclear ribosomal DNA. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48(4): 339-345.
- Trifi-Farah N., Marrakchi M., 2002.** Intra- and interspecific genetic variability in *Hedysarum* revealed by rDNA-RFLP markers. *J.Genet. Breed.*, 56: 127-135.
- Trivers R., Burt A., Palestis B.G. 2004.** B chromosomes and genome size in flowering plants. *Genome*, 47: 1-8.
- Wielgorskaya T., 1995.** Dictionary of Generic Names of Seed Plants. Columbia University Press.
- Winkler H., 1916.** Über die experimentelle Erzeugung von Pflanzen mit abweichenden chromosomenzahlen. *Zeitschr f Bot.*, 8: 417-531.
- Wodehouse R.P. 1935.** Pollen grains their structure, identification and significance in science and medicine. Hafner publish CO. NewYork, pp: 153-200.
- Wood T.E., Takebayashi N., Barker M.S., Mayrose I., Greenspoon P. B., Rieseberg I.H., 2009.** The frequency of polyploid speciation in vascular plants. *Proc.Nat.Acad.Sci. USA.*, 106(33): 13875-13879.
- Yildiz K., Gücel S., 2006.** Chromosome numbers of 16 endemic plants taxa from Northern Cyprus. *Turkish Journal of Botany*, 30: 181-192.
- Zoldos V., 2000.** Organisation du génome et relations évolutives entre quelques espèces du genre *Quercus*. Thèse de Doctorat. Université de Paris Sud et Univ de Zagreb, 50p.
- Zoldos V., Papes D., Cerbah M., Panaud O., Besendorfer V., Siljak-Yakovlev S., 1999.** Molecular cytogenetic studies of ribosomal genes and heterochromatin reveal conserved genome organization among 11 *Quercus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 969-977.

Annexes

Annexe 1

1- La 8-hydroxyquinoléine à 0.002%

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

2- Colchicine à 0.05%

50 mg de colchicine en poudre dans 100 ml d'eau distillée.

3- Carmin acétique à 1%

Dans un grand erlenmeyer, porter 1 litre d'eau acétique (45% acide acétique) à ébullition.

Verser 10 g de carmin et faire mijoter la solution pendant 5 min.

Laisser décanter jusqu'au refroidissement.

Filtrer.

Additionner quelques gouttes de perchlorure de fer dans la solution obtenue pour accentuer l'intensité de la coloration.

La solution de carmin ainsi obtenue, se conserve très longtemps dans un flacon en verre fumé.

4-Réactif de Schiff

Pour 1 litre de solution

Faire bouillir 800 ml d'eau distillée dans un erlenmeyer de 2 l.

Eteindre la source de chaleur, attendre l'arrêt total de l'ébullition.

Verser lentement 4 g de fuschine basique.

Agiter puis laisser refroidir jusqu'à 50°C.

Ajouter 120 ml d'acide chlorhydrique (HCl 1M).

Filtrer.

Ajouter à la solution filtrée 12 g de métabisulfite de potassium.

Si la solution est encore rose ou rouge, ajouter le charbon, agiter fortement (agitateur magnétique), pendant 2 min, puis filtrer.

La conservation se fait dans un flacon en verre fumé, bien bouché.

5-Tampon phosphate

Mettre dans un erlenmeyer contenant 100 ml d'eau distillée, 1.17 g de phosphate dissodique (Na_2HPO_4) avec 0.69 g de phosphate monopotassique (KH_2PO_2).

Mélanger.

Ajuster le pH à 6.8.

Cette préparation doit être extemporanée.

6- Solution saline 2 x SSC (Salt Sodium Citrate)

Mélanger 17.5 g de chlorure de sodium et 8.8 g de citrate de sodium dans un litre d'eau distillée

Annexe 2

1- Tampon citrate

0.01M

Le tampon citrate est formé de deux solutions A et B

A : solution d'acide citrique 0.096g/50ml.

B : solution de citrate de sodium 0.147g/50ml.

Pour un pH 4.6

Prendre 25.5ml d'acide citrique et 24.5ml de citrate de sodium.

Compléter à 100 ml avec l'eau distillée.

0.05M (pour la préparation de l'enzyme R)

Acide citrique 0.48g/ 50ml

Citrate de sodium 0.73g/ 50ml

2- Préparation de l'enzyme R

Hémicellulase 4%

Pectolyase 1%

Cellulase R10 4%

Diluer les trois enzymes dans le tampon citrate 0.05M à pH 4.6

3- Tampon McIlvaine

A: solution d'acide citrique 1.05g/50ml H₂O

B: Na₂HPO₄, H₂O 1.068g/30ml H₂O.

Pour un pH 7

Prendre 6.5ml de la solution A et 43.6ml de la solution B.

Compléter à 100ml par de l'eau distillée.

Pour un pH 5.5

Prendre 43.2 ml de la solution A et 56.8ml de la solution B.

Compléter à 200ml par de l'eau distillée

Tampon McIlvaine pH 7 + MgSO₄

Prendre 50ml du tampon McIlvaine (pH 7).

Ajouter 61.62mg de MgSO₄.

Préparation de la chromomycine

2mg de chromomycine pour 10ml de solution (tampon McIlvaine pH 7 + MgSO₄).

Entourer le flacon avec du papier aluminium pour l'obscurité et conserver à 4°C.

4- Préparations des tampons et des enzymes pour la FISH

20 x SSC

NaCl	175.3g
Citrate de sodium	88.2g
Eau ultra pure	qsp 1000ml

4 x SSC Tween

Tween 20	1ml
20 x SSC	100ml
Eau ultra pure	400ml

4 x SSC

20 x SSC	100ml
Eau ultra pure	400ml

2 x SSC

20 x SSC	100ml
Eau ultra pure	200ml

0.1 x SSC

2 x SSC	13ml
Eau ultra pure	247ml

Formamide 20%

0.1 x SSC	160ml
Formamide	40ml

RNase (stock à 10mg/ml diluée à 1/100)

RNase à 10mg/ml	16 μ l
2 x SSC	1584 μ l

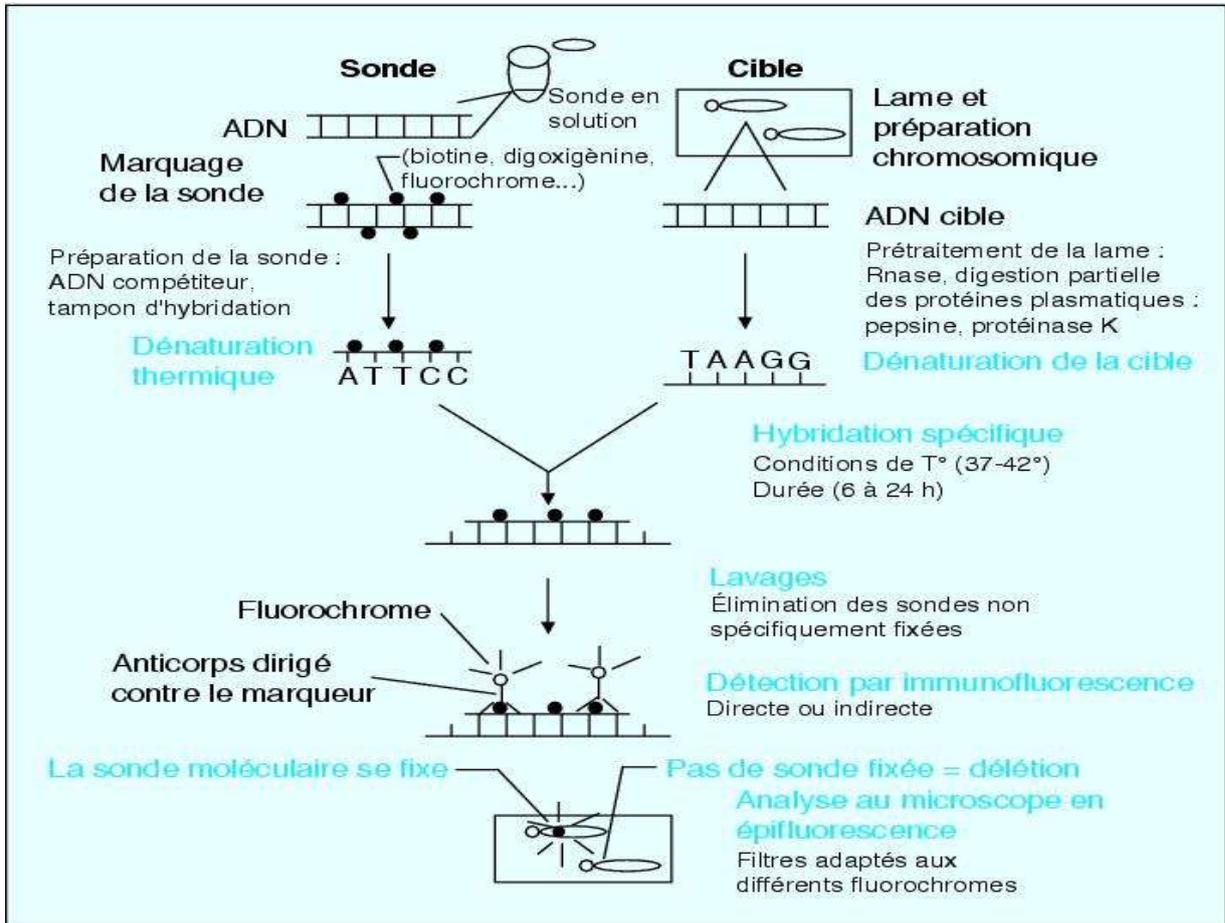
Pepsine (stock à 500mg/ml)

Pepsine 500 mg	500mg
HCl 0.01 M	1ml

Tampon de détection (préparé extemporanément)

5% BSA (Bovine serum albumin): 0.1g de BSA dans 2ml 4 x SSCT.

Diluer dans un petit récipient et laisser à 37°C jusqu'à la dilution complète.



Principe de la technique de l'Hybridation *In Situ* Fluorescente (FISH)

Annexe 3

Données morphométriques du caryotype de quatre populations d'*H. perrauderianum*

Population 1

PCh	BL (µm)	BC (µm)	LT (µm)	r	Ic	LR(‰)	t
1	2.16 (0.02)*	1.93 (0.03)	4.09	1.11	47.19	72.08	m
2	2.00 (0.15)	2.00 (0.00)	4.00	1.00	50.00	70.49	m
3	2.50 (0.00)	1.50 (0.10)	4.00	1.66	37.50	70.49	m
4	2.20 (0.06)	1.60 (0.13)	3.80	1.37	42.10	66.97	m
5	2.06 (0.12)	1.70 (0.10)	3.76	1.21	45.21	66.25	m
6	2.00 (0.02)	1.60 (0.07)	3.60	1.25	44.44	63.44	m-sat
7	2.00 (0.01)	1.60 (0.09)	3.60	1.25	44.44	63.44	m
8	2.00 (0.05)	1.60 (0.00)	3.60	1.25	44.44	63.44	m
9	1.83 (0.18)	1.67 (0.05)	3.50	1.09	47.71	61.68	m
10	2.26 (0.05)	1.15 (0.08)	3.41	1.96	33.72	60.09	sm
11	1.86 (0.10)	1.50 (0.03)	3.36	1.24	44.64	59.21	m-sat
12	1.78 (0.03)	1.52 (0.09)	3.30	1.17	46.06	58.16	m
13	1.66 (0.10)	1.60 (0.00)	3.26	1.04	49.08	57.45	m
14	1.66 (0.00)	1.60 (0.01)	3.26	1.04	49.08	57.45	m
15	1.64 (0.10)	1.56 (0.07)	3.20	1.05	48.75	56.39	m
16	1.65 (0.02)	1.35 (0.08)	3.00	1.22	45.00	52.87	m

Population 3

PCh	BL (µm)	BC (µm)	LT (µm)	r	Ic	LR(‰)	t
1	2.10 (0.00)	1.90 (0.05)	4.00	1.10	47.50	76.17	m
2	2.00 (0.00)	1.70 (0.10)	3.70	1.17	45.94	70.46	m
3	2.00 (0.13)	1.70 (0.12)	3.70	1.17	45.94	70.46	m
4	2.00 (0.02)	1.67 (0.03)	3.67	1.19	45.50	69.89	m
5	1.90 (0.13)	1.65 (0.19)	3.55	1.15	46.47	67.60	m
6	1.81 (0.05)	1.62 (0.16)	3.43	1.11	47.23	65.32	m-sat
7	1.83 (0.08)	1.50 (0.01)	3.33	1.22	45.04	63.41	m
8	1.70 (0.04)	1.63 (0.04)	3.33	1.04	48.04	63.41	m
9	1.70 (0.02)	1.60 (0.06)	3.30	1.06	48.48	62.84	m
10	2.10 (0.17)	1.19 (0.19)	3.29	1.76	36.17	62.65	sm
11	1.60 (0.07)	1.56 (0.01)	3.16	1.02	49.36	60.17	m-sat
12	1.51 (0.02)	1.45 (0.05)	2.96	1.04	48.96	56.37	m
13	1.53 (0.04)	1.40 (0.02)	2.93	1.09	47.78	56.95	m
14	1.40 (0.15)	1.36 (0.10)	2.76	1.02	49.27	48.84	m
15	1.42 (0.00)	1.30 (0.05)	2.72	1.09	47.79	51.79	m
16	1.40 (0.01)	1.28 (0.00)	2.68	1.09	47.76	51.03	m

Population 4

PC	BL (μm)	BC (μm)	LT (μm)	r	Ic	LR(‰)	t
1	2.20 (0.10)	1.90 (0.01)	4.10	1.15	46.34	72.54	m
2	2.00 (0.00)	1.90 (0.00)	3.90	1.05	48.71	69.00	m
3	2.10 (0.02)	1.70 (0.06)	3.80	1.23	44.73	67.23	m
4	2.00 (0.04)	1.80 (0.01)	3.80	1.11	47.36	67.23	m
5	2.00 (0.07)	1.70 (0.00)	3.70	1.17	45.94	65.46	m
6	2.10 (0.01)	1.50 (0.02)	3.60	1.40	41.66	63.69	m-sat
7	2.20 (0.08)	1.37 (0.04)	3.57	1.60	38.37	63.16	m
8	2.00 (0.00)	1.50 (0.13)	3.50	1.33	42.85	61.92	m
9	2.10 (0.15)	1.40 (0.08)	3.50	1.50	40.00	61.92	m
10	2.27 (0.02)	1.23 (0.01)	3.50	1.84	35.14	61.92	sm
11	2.00 (0.08)	1.40 (0.13)	3.40	1.42	41.17	50.15	m-sat
12	1.92 (0.02)	1.48 (0.02)	3.40	1.29	43.52	50.15	m
13	2.00 (0.01)	1.40 (0.04)	3.40	1.42	41.17	50.15	m
14	1.70 (0.10)	1.60 (0.01)	3.30	1.06	48.48	58.38	m
15	1.70 (0.06)	1.40 (0.08)	3.10	1.21	45.16	54.84	m
16	1.55 (0.16)	1.40 (0.01)	2.95	1.10	47.45	52.19	m

Population 6

PCh	BL (μm)	BC (μm)	LT (μm)	r	Ic	LR(‰)	t
1	2.32 (0.00)*	1.80 (0.02)	4.12	1.28	43.68	73.11	m
2	2.28 (0.10)	1.75 (0.15)	4.03	1.30	43.42	71.51	m
3	2.40 (0.02)	1.60 (0.12)	4.00	1.50	40.00	70.98	m
4	2.00 (0.08)	1.80 (0.08)	3.80	1.11	47.36	67.43	m
5	2.00 (0.15)	1.80 (0.17)	3.80	1.11	47.36	67.43	m
6	2.30 (0.01)	1.50 (0.02)	3.80	1.53	39.47	67.43	m-sat
7	2.20 (0.00)	1.40 (0.00)	3.60	1.57	38.88	63.88	m
8	2.00 (0.03)	1.60 (0.01)	3.60	1.25	44.44	63.88	m
9	2.20 (0.05)	1.40 (0.05)	3.60	1.57	38.88	63.88	m
10	2.25 (0.07)	1.15 (0.10)	3.40	1.95	33.82	60.33	sm
11	2.00 (0.12)	1.30 (0.17)	3.30	1.53	39.39	58.56	m-sat
12	1.70 (0.09)	1.60 (0.03)	3.30	1.06	48.48	58.56	m
13	1.80 (0.03)	1.40 (0.05)	3.20	1.28	43.75	56.78	m
14	1.60 (0.08)	1.50 (0.12)	3.10	1.06	48.38	55.01	m
15	1.60 (0.10)	1.30 (0.09)	2.90	1.23	44.82	51.46	m
16	1.50 (0.06)	1.30 (0.04)	2.80	1.15	46.42	49.68	m

(*): écart type.

Nombre moyen de nucléoles chez les espèces étudiées

Espèces	1 nucléole	2 nucléoles	3 nucléoles	4 nucléoles
<i>H. pallidum</i>	45	3.75	1.00	0.25
<i>H. naudinianum</i>	42	6.33	1.33	0.33
<i>H. perrauderianum</i>	25	20.4	3.00	1.60

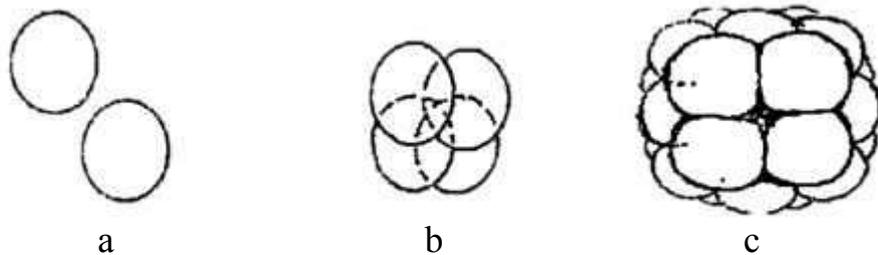
Annexe 4

Terminologie de la palynologie (Punt *et al.* 1994; Erdtman 1952)

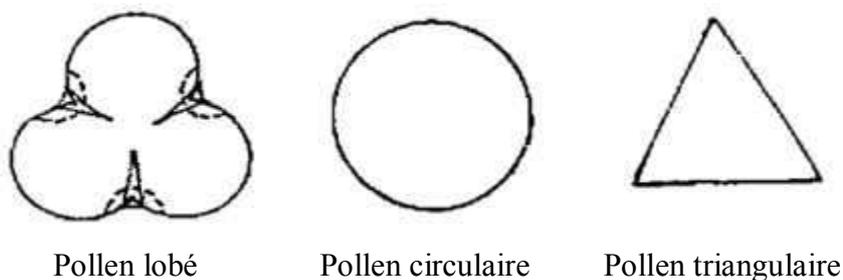
1. Forme et symétrie

La forme du grain de pollen est variable, on peut avoir :

- des grains de pollen simples: (a) eumonades,
- des grains composés: (b) tétrades; (c) polyades.



En vue polaire, la forme du grain de pollen est variable :



En vue équatoriale, le pollen représente un volume pour lequel on définit deux axes :

- l'axe polaire P : ligne joignant les deux pôles,
- l'axe équatorial E : perpendiculaire à l'axe P.

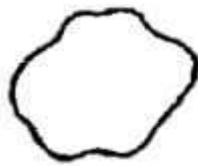
$P > E$: pollen longiaxe, $P < E$: pollen bréviaxe, $P = E$: pollen aquiaxe.

Pollen prolate : $1.33 < P/E < 2$ et pollen subprolate : $1.4 < P/E < 1.33$.

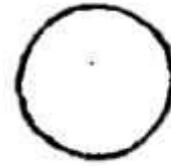
La symétrie des pollens est définie par l'emplacement des zones germinales ou apertures.



Pollen hétéropolaire



Pollen apolaire

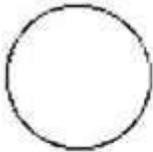


Pollen isopolaire

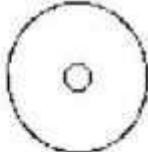
- le pollen apolaire : sans plan de symétrie,
- le pollen isopolaire : vues polaires identiques et symétriques par rapport au plan équatorial,
- le pollen hétéropolaire : présentant un axe de symétrie mais les vues polaires sont différentes au pôle proximal et au pôle distal.

2- Apertures ou zones germinales

L'aperture est une zone de moindre résistance, due à l'amincissement ou à la disparition de l'exine, qui permet la sortie du tube pollinique (Erdtman 1952). Ces apertures peuvent se situer aux pôles, à l'équateur ou être réparties sur l'ensemble du grain. La forme de l'aperture peut être variable.



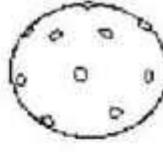
Inaperturé



Monoporé



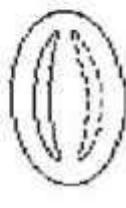
Diporé



Periporé



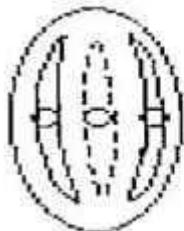
Monocolpé



Dicolpé



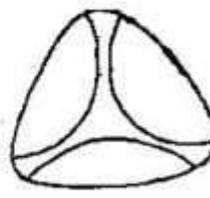
Stephanocolpé



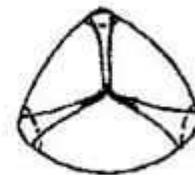
Tricolpé



Stephanocolporé



Syncolpé



Syncolporé