

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE



THÈSE

DE DOCTORATÈs Sciences

Spécialité **Amélioration des Plantes**
Option **Sélection**

Présenté par **Yahia Nourredine**

**Titre : *Diversité génétique d'une collection d'écotypes locaux de
Medicago en relation avec la tolérance au froid***

04 juin 2015

Jury

Pr. Bekki Abdelkader	President	Univ. Oran 1 Ahmed Ben Bella
Dr. Kharoubi Omar	Examineur	Univ. Oran 1 Ahmed Ben Bella
Pr. Lotmani Brahim	Examineur	Univ. Mostaganem
Pr. Djebli Nourredine	Examineur	Univ. Mostaganem
Dr. Benbelkacem Abdelkader	Examineur	INRA Algérie
Dr. Barre Philippe	Invité	INRA France
Pr. Fyad-Lamèche F. Zohra	Directrice de thèse	Univ. Oran 1 Ahmed Ben Bella

Dédicace

A mon frère Abd El Hamid,
A mes parents, mon épouse, ma fille Alia, ainsi qu'à toute la famille.

Remerciements

Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la confiance et la patience de mon directeur de thèse, Mme Fyad-Lamèche Fatima Zohra, Professeur, directeur de recherche et responsable de du laboratoire de Génétique et Amélioration des plantes à l'université d'Oran. Je lui adresse tous mes remerciements pour avoir dirigé cette thèse. Je voudrais aussi la remercier pour la confiance qu'elle m'a accordée et d'avoir cru en mes capacités. De plus, les conseils qu'elle m'a procurés, ont été enrichissants me permettant de finaliser cette thèse.

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon mémoire de thèse :

M Bekki A. Professeur, directeur de recherche et président du laboratoire de recherche Biotechnologie des Rhizobiums et Amélioration des plantes à l'université d'Oran, de m'avoir honoré en présidant ce jury.

M Djebli N. Professeur et directeur du laboratoire de pharmacognosie Api-Phytothérapie à l'université de Mostaganem, pour son obligeance d'avoir accepté d'examiner ce mémoire de thèse.

M Benbelkacem K Docteur, directeur de recherche et directeur de la division de recherche en Biotechnologies et Amélioration des Plantes national à l'INRA Algérie, par qui tout acommencé, à savoir l'intérêt pour cette discipline : l'amélioration des plantes ; alors que je n'étais qu'un jeune étudiant Biologie à l'université Mentouri de Constantine, d'avoir accepté de juger ce travail.

MBarre P. Dr. chercheur à l'Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairie et plantes fourragères (URP3F)/ Génétique-INRA-France, qu'il trouve ici mes sincères remerciements pour toute l'aide qu'il m'a apporté ainsi que pour ses encouragements et son obligeance. Je le remercie aussi pour tous les aspects inhérents aux SSR et à la PCR, ainsi que qu'aux analyses et les interprétations qui ont enrichies ce mémoire.

J'adresse mes remerciements à mon collègue M Kharoubi Omar, Docteur et Maître de conférences au département de Biologie, chercheur au laboratoire de recherche, d'avoir eu l'amabilité d'expertiser ce mémoire et d'apporter son savoir en l'occurrence dans le domaine de la biochimie et son application dans les stress abiotiques.

Je n'oublierais pas les aides permanentes reçues du personnel administratif et technique de Et à leur tête le Responsable de la station, M Guy C. Directeur de la station INRA-Lusignan-Poitou-Charente-France

J'adresse mes remerciements, pour la sympathie qu'ils m'ont témoignée et leur chaleureux accueil, à Pierre Adrien Guy ainsi qu'à sa charmante femme. De plus, ils m'ont été de très bon guide touristique lors de mon court passage à Lusignan.

Merci aussi à tous mes collègues et amis du département de Biologie. Je leur exprime ma profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien et de réussite dans leur travail.

Je n'oublierai pas bien sûr de remercier chaleureusement et fraternellement tous les membres, collègues, et doctorants, du laboratoire de Génétique et Amélioration des Plantes, de leur soutien

Enfin, une pensée émue pour tous les étudiants avec qui j'ai partagé et je partage une salle, un café, ou un repas au cours de mes enseignements et mes recherches à l'université d'Oran.

Cette thèse m'a donné l'occasion de rencontrer et de travailler avec des personnes exceptionnelles. Qu'ils trouvent ici mes vifs remerciements et Ho ! Combien il est difficile de leur dire ici à quel point j'ai été touchée par tout ce qu'ils ont fait pour moi.

Merci aussi à Mohamed Arbaoui, de m'avoir accueilli chez lui à Poitiers durant mon séjour à Lusignan.

Cette thèse a pu voir le jour aussi grâce aux projets de recherches de : l'Office National de l'Environnement et du Développement Durable (Ministère de l'Environnement) (ONED) (Code Projet 67), et aux moyens du Laboratoire Recherche "Biotechnologie des Rhizobium et Amélioration des Plantes" (Code Projet 61) de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique, rattaché à l'université d'Oran.

Avant-propos

Un grand nombre d'études portant sur de multiples espèces animales et végétales ont eu pour objectif de caractériser la répartition de la diversité génétique entre populations et ont tenté d'expliquer l'origine de cette structuration. Les mesures de structuration génétique sont classiquement utilisées pour «mesurer les flux géniques» au sein d'une espèce, en considérant que les populations ont atteint un équilibre entre dérive et migration. Toutefois, l'histoire des populations et notamment leur démographie (expansion, effet de fondation, mélange de populations) ont aussi pu affecter la distribution de la diversité génétique entre populations. La connaissance de la structuration génétique d'une espèce constitue de plus un outil précieux pour la conservation des ressources génétiques d'une espèce. La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes d'un individu, d'une population, d'une espèce ou d'une communauté. En d'autres termes, la diversité génétique est définie par le niveau de similarité ou de différence dans la composition génétique des individus, des populations et des espèces. Elle peut donc se mesurer à différents niveaux : de l'individu à la communauté. Cette diversité génétique est extrêmement importante car elle représente le matériel de base en amélioration des plantes sur lequel peut agir le sélectionneur.

La connaissance de la structure génétique d'une espèce, peut aussi représenter un avantage direct pour la sélection, à l'intérieur des populations, de génotypes "performant", l'idéotype, vis-à-vis des contraintes. Sachant que la valeur adaptative d'un caractère étant généralement supérieure pour un gène présentant plusieurs états alléliques (hétérozygotie) ou pour une population formée d'individus différents et complémentaires. D'ailleurs, Y. Demarly le souligne très bien, *"Le matériel de départ pour un sélectionneur consiste en variétés déjà existantes, en populations entretenues soit par lui-même, soit par des instances nationales ou des centres internationaux, en des peuplements naturels et en des espèces apparentées, ancestrales, spontanées, qu'il est possible d'utiliser comme ressources"*. Elle peut de plus se concevoir comme une assurance permettant l'adaptation à de nouvelles conditions environnementales. Plus une population ou une espèce est diversifiée génétiquement, plus certains de ses membres arriveront à s'adapter aux modifications survenant dans l'environnement. Au sein d'une espèce la diversité génétique présente généralement une variation géographique. Les espèces sont souvent subdivisées en populations dont les fréquences alléliques et génotypiques divergent d'une région à l'autre. Cette variation est la résultante d'un équilibre entre des forces tendant à

créer une divergence entre populations et celles tendant à produire une homogénéité génétique. Les forces créant une divergence génétique sont la mutation, la dérive, due à des tailles de populations finies, et la sélection naturelle quand elle favorise une adaptation locale. Les forces créant une homogénéisation sont les mouvements de gamètes ou d'individus (dispersion), qui contribuent aux flux de gènes entre populations, et la sélection qui favorise une plus forte diversité intra-population.

Résumé- Les contraintes environnementales représentent un des facteurs limitant pour la productivité agricole et jouent un rôle important dans la distribution des espèces végétales à travers différents types d'environnements. L'étude porte sur la diversité et les aptitudes d'acclimatation à un stress par basse température, appliqué pendant la croissance post-germinative de 16 génotypes appartenant à quatre espèces annuelles de *Medicago* (*M. aculeata* Willd., *M. polymorpha* L., *M. truncatula* Gaertn. et *M. ciliaris* Krock.), par une caractérisation de la diversité génétique à l'aide d'outils biométrique (caractères morphologiques), biochimique (peroxydases et estérases) et moléculaire (14 microsatellites (SSR) utilisés). Les résultats révèlent que: (a) les écotypes présentant les meilleurs ratios racines/tiges sous un régime de basse température sont ceux qui présentent une meilleure tolérance au froid ;(b) L'activité globale des peroxydases et des estérases, des plantes soumis à un régime de basse température, est fonction de la durée du traitement et du degré de tolérance des différents écotypes étudiées et est fonction de l'espèce. Cette activité est plus importante chez les écotypes tolérant que les sensibles. Les profils électrophorétiques peroxydases et des estérases ont permis de révéler des bandes d'activité enzymatique qui ne s'exprime que sous stress froid en comparaison avec leurs témoins respectifs. Cette expression de ces isoenzymes est plus importante chez les populations tolérante que chez les populations sensibles ; (c) Un total de 113 allèles a été détecté au niveau des quatorze locus SSR. Le pourcentage de polymorphisme au seuil 99% varie de 7% à 84.62 % respectivement, dénotant d'un grand polymorphisme chez ces populations à travers les locus marqueurs utilisés. Certains allèles détectés au niveau des locus marqueurs Mtic-131, Mtic-432, Mtic-079 semblent avoir une relation avec la tolérance au froid et l'origine géographique des écotypes.

MotsClés : *Medicago*, stress froid, développement post germinatif, peroxydases, estérases, microsatellites (SSR), polymorphisme.

Abstract-The study was carried on 16 accessions of annual *Medicago* species (*M. truncatula* Gaertn. *M. ciliaris* Krock., *M. aculeata* Willd. and *M. polymorpha* L.). a): Seedlings of different accessions collected from sites of contrasting altitudes (10 to 1170 m) were subjected to different durations of low temperature regimes. Root to shoot ratios of acclimated and non-acclimated plants were compared. b): The Comparison of the profiles of esterase and peroxidases between treatment and control groups, showed in most cases an increase in band intensity profile of the treated compared to control. This increase in antioxidant enzyme activity is maintained at a high level throughout the duration of stress in tolerant genotypes. C): Among the 16 accessions studied, 12 were used to assess the degree of genetic polymorphism by SSR microsatellites. Results showed that accessions originate from high altitude had a better root to shoot ratios so best ability to cold acclimation than accessions originate from low altitude (lower ability to cold acclimation). Tests differentiation between species by fisher pair indicated that all species were different from each other. Results showed the high level of homozygosity for all species (> 80 %). Moreover, there were differences between populations of the same species of cold acclimation, which will encourage for a study of association between cold acclimation and molecular polymorphism.

Keywords: Cold acclimation, root: shoot ratios, esterase; peroxidases, molecular polymorphism (SSR), annuals populations, *Medicago*.

المخلص

التأثيرات البيئية تعد اهم العوامل المحددة والمؤثرة على الانتاج الفلاحي كما تساهم في توزيع وتمركز الانواع النباتية في مختلف البيئات. الهدف من هذا البحث هو دراسة التنوع والقدرة على التأقلم تحت تأثير اجهاد البرودة. نضرا لأهمية نبات الفصة في الدورة الزراعية التغذوية الحيوانية وتواجده في مختلف الاوساط البيئية.

تم تفعيل هذه الدراسة على مستوي 16 نمط وراثي تنتمي كلها الي 4 انواع سنوية من جنس

Medicago (*M. aculeata* Willd., *M. polymorpha* L., *M. truncatula* Gaertn. et *M. ciliaris* Krock.)

حيث تم تطبيق اجهاد البرودة على نباتات فتية مباشرة بعد فترة الانتاش. ولأجل تفعيل هذا البحث تم استعمال ثلاث منهجيات مختلفة (ا) الدراسة البيومترية عن طريق قياس الخصائص المورفولوجية (ب) الدراسة بواسطة الكيمياء الحيوية لنشاط انزيمات التأكسج (الدراسة باستعمال تقنية البيولوجيا الجزيئية وذلك باستخدام 14 معلم وراثي جزيئي.

النتائج المحصل عليها بينت ان (ا) الانماط البيئية التي اضرحت أحسن النسب جذر/ ساف تحت تأثير اجهاد البرودة هي التي اعطت قدرة تحمل أفضل لهذا الاجهاد. (ب) النشاط الانزيمي مرتبط بمدة الاجهاد ودرجة قدرة التحمل عند مختلف الانماط البيئية والانواع المدروسة. يعتبر هذا النشاط اكثر اهمية عند الانماط البيئية المقاومة للبرودة مقارنة بالحساسية منها. استعمال تقنية الرحلان الكهربائي للأنزيمات. سمحت بإظهار مركبات ذات نشاط انزيمي موجودة فقط عند النباتات الموجودة تحت اجهاد البرودة مقارنة بالشاهد. يعتبر هذا النشاط الانزيمي اكثر اهمية عند العشائر المتحملة للبرودة مقارنة بالعشائر الحساسة منها.

(ج) الدراسة الجزيئية حددت تواجد 113 البيل على مستوي 14 حيز جزيئي حيث ان نسبة التعدد الشكلي عند عتبة 99 بالمائة يتراوح من 7 الي 84.62 بالمائة على التوالي. مما يدل على التنوع الكبير عند هذه العشائر عن طريق المعالم الوراثية الجزيئية المستعملة. بعض الاليلات التي ظهرت على مستوي الخيز الوراثي للمعالم يبدو ان لها علاقة مع قدرة التحمل للبرودة والمنشأ الجغرافي لمختلف الانماط البيئية.

الكلمات المفتاحية, المعلم الجزيئي SSR, انزيم EST = Estérases, انزيم POD = Peroxydases, *Medicago*, البرد

Liste des abréviations

LTTL	Longueur totale plantules
LTGE	Longueur tige
LRCNE	Longueur racine
Rt/Tt	Ratios Racine traitée/Tige traitée
Rt0/Tt0	Ratios Racine contrôle/Tige contrôle
ANOVA	Analyse de variance factorielle
ABA	Acide abcissique
APX	Ascrobate peroxydase
CAT	Catalase
CBF	C-repeat-binding –factor
COR	Gene (cold regulated)
DREB	Dehydration responsive element binding factor
GPRX	Gaiacol peroxydase
GPX	Glutathione peroxydase
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
O ₂ ^{·-}	Superoxide
OH	Radical d'hydroxyle
POD	Peroxydase
QTL	Quantitative trait locus
ROS	Reactive oxygene species
SOD	Superoxide dismutase
DRE/CRT	Dehydrin repeat element
PCR	Polymerase chain reaction
SSR	Single sequence repeat

Liste des figures	pages
Figure 1. Réponse des plantes aux stress abiotiques	21
Figure 2. Réponse des plantes lors d'un stress froid	30
Figure 3. Les différents récepteurs membranaires impliqués dans la perception du stress	34
Figure 4. Régulation et facteurs de transcriptions sous un stress froid	40
Figure 5. Les différents types de peroxydases	48
Figure 6. Les différentes enzymes impliqués lors d'un stress froid	53
Figure 7. Effet d'un stress par basse température, chez les différentes populations de <i>M. ciliaris</i>	69
Figure 8. Effet d'un stress par basse température, chez les différentes populations de <i>M. polymorpha</i>	70
Figure 9. Effet d'un stress par basse température, chez les différentes populations de <i>M. aculeata</i>	71
Figure 10. Effet d'un stress par basse température, chez les différentes populations de <i>M. truncatula</i>	72
Figure 11. Ratios racine/tige après 5 jours d'acclimatation à 4 °C (Rt1/Tt1) et (Rt01/Tt01)	75
Figure 12. Ratios racine/tige après 8 jours d'acclimatation à 4 °C (Rt2/Tt2) et (Rt02/Tt02)	76
Figure 13. Ratios racine/tige après 11 jours d'acclimatation à 4 °C (Rt3/Tt3) et (Rt03/Tt03)	77
Figure 14. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole. min}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez <i>M. ciliaris</i> .	84
Figure 15. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole. min}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez <i>M. polymorpha</i> .	85
Figure 16. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole. min}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez <i>M. aculeata</i>	86
Figure 17. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole. min}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez <i>M. truncatula</i>	87
Figure 18. Profil des isoenzymes de peroxydase de jeunes plantules acclimatées au froid chez <i>M. ciliaris</i>	89
Figure 19. Profil des isoenzymes de peroxydase de jeunes plantules acclimatées au froid chez <i>M. polymorpha</i>	91
Figure 20. Profil des isoenzymes de peroxydase de jeunes plantules acclimatées au froid chez <i>M. truncatula</i>	93
Figure 21. Profil des isoenzymes de peroxydase de jeunes plantules acclimatées au froid chez <i>M. aculeata</i>	95
Figure 22. Profil des estérases chez <i>M. aculeata</i>	96
Figure 23. Profil des estérases chez <i>M. aculeata</i>	97
Figure 24. Profil des estérases chez <i>M. truncatula</i>	99

Figure 25. Profil des estérases chez <i>M. polymorpha</i>	101
Figure 26. SSR variation pour le locus marqueur MTIC-451	106
Figure 28. Distance de Nei standard	107

Liste des tableaux	pages
Tableau 1. Populations analysées pour la tolérance au froid	65
Tableau 2. Caractéristiques des différents SSR utilisés	66
Tableau 3. Populations analysées pour l'activité peroxydasique et l'expression izoenzymatique des peroxydases et estérases sous un régime de basse température	67
Tableau 4. Analyse de variance des différents paramètres morphologiques étudiés	70
Tableau 5. Moyenne des différents caractères mesurés sous les différents traitements pour les quatre espèces de <i>Medicago</i> étudiées	76
Tableau 6. Analyse de variance factorielle	81
Tableau 7. Groupes homogènes (test Newman-Keuls) pour le paramètre longueur totale (LTTL) de la plantule sous un régime de basse température	82
Tableau 8. Groupes homogènes (test Newman-Keuls) pour le paramètre longueur de la tige (LTGE) sous un régime de basse température	83
Tableau 9. Groupes homogènes (test Newman-Keuls) pour le paramètre longueur de la racine (LRCNE) sous un régime de basse température	84
Tableau 10a. Nombre d'allèles détectés par locus pour les différents microsattellites utilisés	100
Tableau 10b. Nombre moyen d'allèles détectés par locus pour les différentes populations étudiées	101
Tableau 11. Les différents allèles détectés au locus marqueur ATP 456	103
Tableau 12. Les différents allèles détectés au locus marqueur mtic432	104
Tableau 13. Les différents allèles détectés au locus marqueur Fm-13	104
Tableau 14. Les différents allèles détectés au locus marqueur Mtic-79	105
Tableau 15. Les différents allèles détectés au locus marqueur Mtic-332	105
Tableau 16. Les différents allèles détectés au locus marqueur Mtic-338	106
Tableau 17. Les différents allèles détectés au locus marqueur Mtic-134	106
Tableau 18. Les différents allèles détectés au locus marqueur Mtic-365	107
Tableau 19. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-82	107
Tableau 20. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-451	107
Tableau 21. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-343	108
Tableau 22. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-135	108
Tableau 23. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-131	109
Tableau 24. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur B14B03	109
Tableau 25. Allèles détectés chez les populations tolérantes aux loci Mtic432, Mtic079 et Mtic131110	
Tableau 26. Nombre d'allèles détectés sans données manquantes	115
Tableau 27. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, chez les populations de <i>M. aculeata</i>	139
Tableau 28. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, chez les populations de <i>M. ciliaris</i>	139
Tableau 29. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, chez les populations de <i>M. polymorpha</i>	140

Tableau30. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, chez les populations de <i>M. truncatula</i>	140
Tableau 31. Moyenne $\pm \sigma$ de l'activité des peroxydases (POD) en $\mu \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, chez les accessions de <i>M. polymorpha</i> et <i>M. ciliaris</i>	141
Tableau 32. Moyenne $\pm \sigma$ de l'activité des peroxydases (POD) en $\mu \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, chez les accessions de <i>M. aculeata</i> et <i>M. truncatula</i>	141
Tableau33. Loci étudiés pour les différentes populations de <i>Medicago</i>	142
Tableau 34. Fréquences alléliques au locus ATPase- 456	148
Tableau35. Fréquences alléliques au locus FM-13	148
Tableau36. Fréquences alléliques au locus mtic-79	148
Tableau37. Fréquences alléliques au locus mtic-332	149
Tableau38. Fréquences alléliques au locus mtic-338	149
Tableau39. Fréquences alléliques au locus mtic -134	150
Tableau40. Fréquences alléliques au locus mtic-365	150
Tableau41. Fréquences alléliques au locus mtic-082	150
Tableau42. Fréquences alléliques au locus mtic-451	151
Tableau43. Fréquences alléliques au locus B14B03	151
Tableau44. Fréquences alléliques au locus mtic-135	152
Tableau45. Fréquences alléliques au locus mtic-343	152
Tableau46. Fréquences alléliques au locus mtic-131	153
Tableau47. Fréquences alléliques au locus mtic-432	153

Sommaire

Introduction	15
Chapitre I. Développement des plantes sous stress	18
I.1. Les végétaux face aux stress abiotiques	18
I.2. Développement des végétaux au froid	21
I.2.1. Acclimatation des végétaux au froid	21
I.2.2. Influence des basses températures sur la mise en place et la distribution des plantes	22
I.2.2.1. L'acclimatation au froid chez les espèces annuelles légumineuses	23
I.2.2.2. La luzerne et le développement sous stress froid	26
I.3. Perception et transduction du signal lors d'un stress froid	28
I.3.1. Perception du signal et rôle de la membrane plasmique	31
I.3.2. Les osmoprotecteurs	35
I.4. Régulation de l'expression génétique dans la réponse aux basses températures	36
I.4.1. C-repeat binding factor (CBF)	37
I.4.2. Voies ABA	39
I.5. Le stress oxydatif induit par le froid	39
Chapitre II- Stress et systèmes enzymatiques	42
II.1. Stress froid et ROS	42
II.2. Les différents types de ROS	43
II.3. Les systèmes de défense anti oxydatifs	43
II.3.1. Superoxyde dismutase (SOD)	44
II.3.2. Catalase (CAT)	44
II.3.3. Les peroxydases (POD)	45
II.3.3.1. Définition des peroxydases	45
II.3.3.2. Classification des peroxydases	47
II. 3.3.2.1. Classification (IUBMB)	47
II.3.3.2.2. Classification Welinder	47
II.3.4. Les peroxydases végétales	47
II.3.4.1. Rôle des peroxydases de type III	48
II.3.4.2. Stress abiotique et peroxydases	49
II.4. Les estérases	52

Chapitre III- Marqueurs moléculaire	53
III.1. Généralités	53
III.2. Marqueurs codominants : marqueurs microsatellites	55
III.3. Les microsatellites marqueurs de sélection	55
Chapitre IV- Matériel et Méthodes	58
IV.1. Matériel végétal	58
IV.2. Méthodes	58
IV.3. Mise en culture et dispositif expérimental	58
IV.3.1. Mesures	59
IV.3.2. Traitements statistiques	59
IV.4. Extraction d'ADN	59
IV.5. Electrophorèse des peroxydases	62
IV.5.1. Extraction des peroxydases	62
IV.4.2. Dosage des peroxydases	62
IV.6. Electrophorèse des estérases	63
IV.6.1. Extraction des estérases	63
IV.6.2. Séparation des estérases	63
Chapitre V- Résultats et Interprétations	65
VI. Discussion et Conclusion	111
Références Bibliographiques	119
Annexes	142
Publications dans le cadre de ce mémoire de thèse	156

Introduction

Les propriétés agronomiques et alimentaires des légumineuses sont connues depuis plus de 2000 ans. Les légumineuses, caractérisées par leur capacité à fixer l'azote atmosphérique présentent un double intérêt. D'un point de vue agro-environnemental, elles ne nécessitent aucune fertilisation azotée et contribuent naturellement à enrichir le sol en azote. En se substituant aux engrais de synthèse, elles évitent ainsi les pollutions liées à leur fabrication, leur transport et leur épandage. D'un point de vue alimentaire, elles constituent des sources importantes de protéines à la fois pour les hommes et les animaux d'élevage. Les légumineuses qui fournissent des graines sèches pour la consommation humaine sont cultivées dans le monde entier. Certaines fèves fournissent une huile, comme l'arachide et le soja (source oléagineuse), d'autres se consomment principalement cuites ou comme légumes secs. Les graines sont parfois moulues en farine pour la préparation de différents plats. Ce qui reste de la plante une fois les fèves retirées constitue un très bon fourrage ou peut être enfoui sous terre pour la fertiliser. Certaines légumineuses peuvent aussi être cultivées en association avec des céréales et contribuer ainsi à accroître la production et augmenter la fertilité du sol (Nieuwenhuis et Nieuwelink, 2005). En terme de surfaces et de quantité produite, les Légumineuses constituent la seconde famille de plante cultivées après les céréales (Cazaux, 2009). Sur le plan botanique, les légumineuses (*Leguminosae*) sont une famille de plantes à fleurs, également dénommée Fabaceae en classification phylogénétique. La plupart des légumineuses présentent la faculté de fixer l'azote atmosphérique grâce à une symbiose établie avec des bactéries du sol du genre *Rhizobium*, dans des excroissances racinaires appelées nodosités. Cette fixation symbiotique, complétée de prélèvements d'azote naturellement présent dans le sol, leur permet d'assurer leur nutrition. Ces plantes ne nécessitent donc aucune fertilisation azotée pour leur croissance. En agriculture, les légumineuses sont soit cultivées pour leurs graines, riches en protéines (fève, fèverole, soja, pois sec, lentille, haricot...) qui sont utilisées en alimentation humaine et animale, soit pour leur appareil végétatif (luzerne, trèfles, sainfoin) utilisé comme ressource fourragère. Elles comptent plus de 14000 espèces, réparties en 3 sous-familles : les Césalpiniées, les Mimosacées et les Papilionacées, colonisant des biotopes variés sur tous les continents. Les légumineuses cultivées appartiennent aux Papilionacés et se répartissent majoritairement sur deux clades : les Phaseolides, d'origine tropicale (e.g. le soja *Glycine max*, le haricot commun *Phaseolus vulgaris*, le haricot mungo *Vigna radiata*) et les Galégoïdes

d'origine tempérée (e.g. le pois *Pisum sativum*, la lentille *Lens culinaris*, la luzerne cultivée *Medicago sativa*, la luzerne sauvage) (Brunel, 2008).

Le genre *Medicago*, qui fait partie de cette grande famille, comprend une cinquantaine d'espèces annuelles ; ces espèces de bonne qualité fourragère se trouvent à l'état naturel sur tout le pourtour méditerranéen (Lesins et Lesins, 1979).

Dans le Nord de l'Afrique, l'essentiel des ressources fourragères et pastorales provient en général des milieux naturels. Les légumineuses fourragères et pastorales occupent une place importante, elles constituent souvent la base de la flore des pâturages, des jachères et des prairies (Abdelguerfi et al. 2000). Les travaux de recherche menés sur les ressources génétiques n'ont souvent pas abouti à la création variétale et à la production de semences à cause des difficultés anthropiques, socio-économiques, techniques et politiques. Devant la globalisation, le retour vers le développement des pâturages et des fourrages basés sur des légumineuses locales permettrait aux pays de la région d'assurer certaines productions spécifiques.

En Algérie, les productions fourragères connaissent un déficit chronique. Ce déficit se traduit par de faibles productions animales (Senhadri et al. 2000). 50 % des superficies fourragères sont occupées uniquement par les chaumes, pailles et jachères ; alors que les fourrages cultivés ne représentent que 10%. Ces fourrages cultivés n'occupent que 7.23% seulement de la SAU au niveau national avec une faible diversité des espèces fourragères dont les luzernes annuelles. Les ressources génétiques des populations annuelles du genre *Medicago*, dont plusieurs espèces adaptées, peuvent garantir une production conséquente en pâturage en remplacement de la jachère peu productive et dans le système "Ley-Farming" dans les zones où les facteurs limitant sévissent. D'ailleurs, ces auteurs mettent en avant l'importance des ressources génétiques du genre *Medicago* dont plusieurs espèces adaptées, garantissant des productions conséquente dans le système "Ley-Farming" dans certaines zones. Donc, l'intégration céréaliculture-élevage nécessite la création de pâturage d'espèces annuelles de *Medicago* pour la substitution des jachères peu productives.

Dans les milieux naturels, la distribution spatiale des individus au sein des populations dépend souvent des facteurs environnementaux qui affectent l'établissement des jeunes plantes, telles que la température, la pluviométrie, la longueur croissante des saisons et des changements dans la durée des journées en fonction des latitudes (Prosperi et al. 2006). Pendant longtemps, les caractères morphologiques et biochimiques ont été les seuls outils

disponibles pour caractériser des populations pour leur adaptation locale. Cependant, ces derniers sont souvent influencés par l'environnement. Les marqueurs microsatellites, s'affranchissant de cette contrainte, sont souvent utilisés en association avec les caractères phénologiques et biochimique pour caractériser les populations et leur adaptation aux milieux (Badri et al. 2007; Dias et al. 2008; Lazrek et al. 2009; Zeng et al. 2009; Sharma et al. 2010; Bagavathianan et al. 2010; Zaccardelli et al. 2012; Cui et al. 2013 ; Avia et al. 2013).

Ce mémoire de thèse s'inscrit dans le contexte de rechercher à la fois des marqueurs morphologiques, biochimiques, et moléculaire, en relation avec la tolérance au froid d'une collection de populations annuelles appartenant à quatre espèces du genre *Medicago*, par (i) : une approche biométrique, qui consiste en l'évaluation de la variabilité de la tolérance à un régime de basse température (4°C) par des paramètres morphologiques (longueur de la plante, longueur de la tige et longueur de la racine), (ii) : une approche biochimique qui consiste en l'étude de l'effet du stress froid sur l'activité et l'expression isoenzymatique des peroxydases et des estérases, et en fin, (iii) : une approche moléculaire, par une caractérisation à l'aide de marqueurs microsatellites de types SSR, tout en essayant de répondre à la question : existe-il une relation la tolérance au froid des populations étudiées et leur site d'origine (basse ou haute altitude) et les marqueurs étudiés, morphologique, biochimique et moléculaires.

Chapitre I. Développement des plantes sous stress froid

I.1. Les végétaux face aux stress abiotiques

Les plantes sont souvent confrontées à des conditions environnementales défavorables qu'on peut dénommer 'stress' et qui ont pour conséquence une diminution de la croissance. Constamment soumises à toutes sortes de stress environnementaux d'origine biotique (agressions par des agents pathogènes) ou abiotique (excès ou défaut de lumière, fluctuations brutales de température, hypoxie, stress hydrique, salinité, etc.) et incapables de se mouvoir elles ont développé, au cours de l'évolution, des stratégies variées et ingénieuses pour se défendre et s'adapter à leur environnement changeant, en déclenchant des spectres parfois très complexes de réponses moléculaires, métaboliques et morphogénétiques. La connaissance accrue de l'ensemble des métabolites formés (ou métabolome), des gènes correspondants et des facteurs de transcription contrôlant leur expression devrait permettre d'envisager un contrôle raisonné de «l'usine» chimique végétale dans une optique utile à l'homme.

Indépendamment des stress biotiques provoqués par des agents pathogènes des plantes, il y a une multitude de stress abiotiques, tels que l'indisponibilité de l'eau (sécheresse), de température extrême (refroidissement, congélation, chaleur), de salinité, de métaux lourds (toxicité d'ion), d'irradiation photonique (UV-B), d'indisponibilité d'éléments nutritifs, et de structure dans le sol. Les stress abiotiques induisent, séparément ou en association, à des effets néfastes généraux et spécifiques sur la croissance et le développement des plantes, pour arriver finalement aux rendements des récoltes. Les principaux stress abiotiques (sécheresse, salinité, gel) mènent à une disponibilité réduite de l'eau pour des fonctions cellulaires essentielles et à l'entretien de la pression de turgescence. Cependant, au-delà des mécanismes communs, la réponse à ces stress présente des spécificités. La plupart des plantes ont développé de divers mécanismes d'adaptation et de désintoxication pour surmonter ces états de stress. Certaines de ces réponses les plus communes pour la tolérance aux stress abiotiques sont la surproduction de plusieurs corps dissous organiques compatibles nommés des «osmoprotectants» ou des osmolytes (tels que le saccharose, les bêtaïnes, la proline) pour l'ajustement osmotique et protection des structures sous-cellulaires, changements métaboliques cellulaires (production secondaire de métabolite, activité protéolytique, homéostasie ionique, règlement des état redox, activation d'enzymes antioxydants etc.), changements anatomiques et morphologiques des tissus, induction

d'expression de gènes, activation des gènes impliqués dans des voies de transduction de signal (tels les gènes codant pour des protéines kinases) aboutissant à des changements complexes de l'expression de gènes ayant pour résultat l'adaptation des plantes aux stress abiotiques (Avia et Lejeune-Hénaut, 2007).

Les contraintes environnementales représentent un des facteurs limitant pour la productivité agricole et jouent un rôle important dans la distribution des espèces végétales à travers différents types d'environnements (Singh et al. 2002; Dita et al. 2005; Zhang et al. 2008; Saibo et al. 2009). La sécheresse, le froid et la salinité des sols représentent un obstacle pour les espèces cultivées. Ces stress abiotiques entraînent une diminution de 70% du rendement des plantes de grandes cultures, via des altérations morphologiques et physiologiques (Boyer, 1982). De ce fait, la compréhension des mécanismes de tolérance à ces stress constitue un enjeu économique majeur, sachant que les stress abiotiques présentent des éléments communs à la fois pour les dommages occasionnés et pour la réponse de la plante. La mort cellulaire induite par le stress a été la plus étudiée dans le cas des interactions plantes-pathogènes, où il a été établi que les modifications redox, surtout liées à la production de formes actives d'oxygènes comme le H_2O_2 , jouent un rôle important. Tous les stress impliquent des réactions de signalisation capables d'aboutir à la mise en place de défenses ou de déclencher une mort cellulaire programmée. La sécheresse, la salinité et le froid induisent un stress osmotique et un stress oxydatif qui entraînent un déséquilibre de l'homéostasie et une fragilisation des membranes et des protéines. La perception puis la transduction du signal aboutissent à l'expression de gènes régulateurs qui eux-mêmes contrôlent les gènes effecteurs permettant la mise en place des mécanismes de tolérance aux stress (figure. 1).

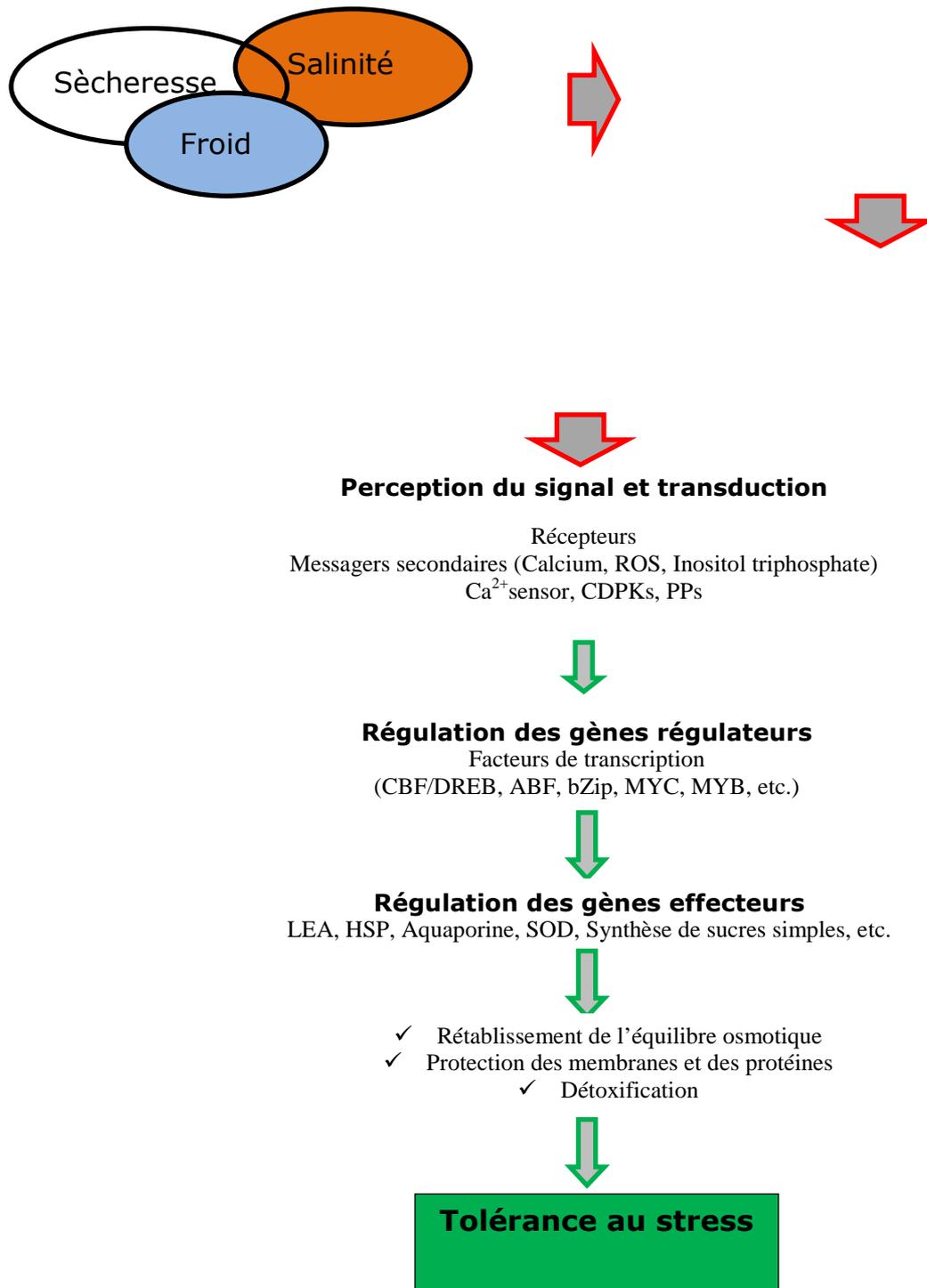


Figure.1 Réponse des plantes aux stress abiotiques (sécheresse, froid et salinité des sols).

Adaptée de Wang et al. 2003.

ROS: Reactive Oxygen Species, CDPK: Calcium Dependent Protein Kinase, PP: Phosphatase Protein, CBF: Crepeat Binding Factor, DREB: DRE Binding factor, ABF: ABRE BindingFactor, LEA: Late Embryogenesis-Abundant, HSP: Heat Shock Protein, SOD: SuperOxide Dismutase.

I.2. Développement des végétaux sous basses températures

I.2.1. Acclimatation des végétaux au froid

Selon Pearce (1999), les espèces sont divisées en trois catégories : Les plantes tolérantes au gel qui sont capables de s'acclimater pour survivre à des températures inférieures à 0° C. Les plantes tolérantes au froid mais sensibles au gel qui sont capables de s'acclimater à des températures inférieures à 12°C mais ne survivent pas au gel. Les plantes sensibles au froid pour lesquelles des températures inférieures à 12°C entraînent des dommages. Quand les plantes sont soumises à des températures sub-optimales (entre 10 et 20°C), des dommages tissulaires et cellulaires apparaissent et à des températures négatives, les parties aériennes meurent. L'acclimatation est l'ensemble des processus induits lors d'une exposition de la plante à des conditions particulières du milieu. Pour les basses températures, elle est induite principalement par les températures modérées. Au sein d'une même espèce la réponse varie en fonction du génotype. Ces différences ont été acquises au cours de l'évolution car chaque population s'est adaptée à des climats différents. Au niveau de la plante, la réponse varie en fonction du stade de développement, des organes ou tissus concernés. Les mécanismes de réponse au stress peuvent être spécifiques ou communs à plusieurs stress. La régulation de l'expression des gènes sous stress peut induire aussi des changements spécifique ou universels au niveau des transcrits des gènes chez certaines plantes (Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Basé sur l'universalité et la spécificité des mécanismes de tolérance aux stress abiotiques, qui peuvent se chevauchées (cross-talking) à des étapes différentes de perception et de transduction, les plantes pourraient avoir de multiples perception du stress et de différentes voies de transduction du signal (Chinnusamy et al. 2003). On parle de cross-tolérance lorsque les même voies de réponse sont employées pour réponde à des stress différents (Pastori et Foyer, 2002). L'acclimatation au froid est aussi définit comme l'endurcissement ou la tolérance au froid elle est décrite comme le développement ou l'augmentation de la tolérance par l'adaptation des mécanismes cellulaires (Pirzadah et al. 2014). L'acclimatation au froid est un caractère quantitatif avec des processus complexe impliquant des changements physiologiques et métaboliques sous contrôle génétique. L'acclimatation au froid implique aussi un grand nombre de gènes et est associée aux changements physiologiques et biochimiques dus à des changements d'expression de gènes (Thomashow, 1990; Hughes et Dunn, 1996; Palva et Heino, 1998; Thomashow, 1999; Lee et al. 2002; Heino et Palva, 2003; Ouellet, 2007; Gupta et al. 2011; Gulzar et al. 2011; Pirzadah et al. 2014).

Les végétaux, immobiles, ne peuvent échapper aux conditions climatiques défavorables. Le froid est la limitation majeure de la distribution des espèces sauvages et la baisse de la productivité des cultures, suite aux gelées soudaines d'automne ou à des températures inhabituellement basses en hiver, est considérable.

Les plantes doivent être capables d'appréhender les fluctuations transitoires aussi bien que les changements saisonniers de température et de répondre à ces changements en ajustant activement leur métabolisme pour y faire face. Une période d'exposition à de basses températures positives conduit, chez beaucoup d'espèces, à une tolérance augmentée aux températures négatives. Dans la nature, les basses températures de la fin de l'automne ou du début de l'hiver sont les principaux déclencheurs de l'acclimatation au froid bien que la qualité de la lumière et la photopériode peuvent aussi être impliquées dans cette réponse. Ainsi, chez le pois, cette adaptation au froid, grâce aux températures basses, n'a pas lieu quand l'intensité lumineuse est faible. Par contre, quand l'intensité lumineuse est normale, les pois d'hiver acquièrent une plus grande tolérance au gel que les pois d'été (Bourion et al. 2003). L'acclimatation est un processus réversible qui disparaît une fois que les températures remontent au-dessus de zéro (un redoux pendant l'hiver ou le retour des conditions printanières). Les plantes qui restent actives pendant l'hiver doivent maintenir leur métabolisme primaire essentiel pour conserver une croissance minimale. Elles doivent lutter contre le froid qui diminue la vitesse des réactions enzymatiques, et modifie la conformation des lipides membranaires et d'autres macromolécules ce qui a des conséquences sur la plupart des processus biologiques (Stitt et Hurry, 2002). De plus, quand la température est inférieure à zéro, la glace se forme dans les espaces intercellulaires où la concentration en solutés est faible ce qui facilite la prise en glace. Cette formation de glace provoque la perte d'eau des cellules d'où la déshydratation de la plante. Ceci explique que les résistances au stress froid et au stress hydrique partagent des mécanismes communs (Thomashow, 2010).

I.2.2 Influence des basses températures sur la mise en place et la distribution des plantes

Les basses températures ont un impact négatif sur la mise en place et l'émergence des cultures limitant ainsi leur distribution. Le froid est parmi les facteurs les plus importants contrôlant et limitant la germination des graines, le développement des jeunes plantules (croissance post germinative), la croissance et le développement de la plante adulte, ainsi

que la distribution des plantes dans le monde (Boyer, 1982; Mohapatra et al. 1989; Yahia et Fyad-Lamèche, 2003; Fyad-Lamèche et al. 2007; Janda et al. 2007; Baruha et al. 2009; Dias et al. 2010; Kim et Tai, 2011). La germination et la croissance post-germinative sont des paramètres peu ciblés par les sélectionneurs, spécialement pour la tolérance aux températures extrêmes (basses et hautes). Augmenter les connaissances sur ces stades peut conduire à des améliorations génétiques indéniables pour la sélection de nouveaux cultivars tolérants au froid (Dias et al. 2010).

I.2.2.1. L'acclimatation au froid chez les espèces annuelles de légumineuses

Parmi les légumineuses, les espèces annuelles sont probablement les plus adaptées et les plus appropriés que les espèces pérennes pour les climats méditerranéens ; souvent elles constituent plus de la moitié de la végétation de la région alors qu'elles représentent rarement plus du un-neuvième dans d'autres parties du monde (Blondel et Aronson, 1999). Les légumineuses annuelles intéressent les utilisateurs comme, fourrage frais, ensilage, ou bien encore comme couverture végétale (Masson et Gintzburger, 2000). Cependant, l'adaptation et la persistance à long terme des légumineuses annuelles en climat méditerranéen dépendent largement dans la capacité des plantes à compléter leur cycle reproductif, assurer la production des graines et leur survie à travers les saisons (Del Pozo et Aronson, 2000). Les légumineuses annuelles tendent à croître et de se reproduire pendant les saisons froides et pluvieuses, parce que la croissance est sérieusement limitée en saison chaude (Shrestha et al. 1998). Pour ces raisons, les plants adaptés au climat et aux conditions méditerranéens ont besoin de croître sous basse température pour pouvoir étendre leur saison de croissance (Sultan et al. 2001). Quand les plantes sont exposées aux basses températures, des séries d'évènements sont initiés qui résultent du fait de l'acclimatation au froid, permettant ainsi à ces plantes d'acquérir plus de résistance aux températures gélives.

Le degré de tolérance dépend à la fois de la température et de la durée d'exposition au stress froid. La tolérance au froid peut permettre de « baliser » pour la résistance au gel. Les plantes originaires des régions tempérées sont tolérantes au froid, cependant assez d'espèces ne sont pas résistantes au gel mais sont capables d'augmenter leur résistance par une exposition au préalable à des températures froides, ce qui est communément connue par « acclimatation au froid », durant laquelle plusieurs changements physiologiques et moléculaires surviennent (Thomashow, 1999). Une foule d'informations concernant les

réponses au froid chez les légumineuses sont focalisées surtout sur les espèces pérennes. En dépit d'un grand intéressement pour l'utilisation des espèces annuelles dans les systèmes d'agriculture, peu de travaux et peu d'informations concernant leur performance durant les saisons hivernales et leurs capacités d'acclimatation au froid et leurs mécanismes de résistance au gel, sont connus (Hekneby et al. 2006). Ces mêmes auteurs, menant des expériences sur la résistance au gel et les changements biochimiques pendant l'acclimatation au froid de quatre types de légumineuses, dont *Medicagopolymorpha* L. cv. Anglona, et *M. truncatula* Gaertn. cv. Paraggio, natives du bassin méditerranéen, révèlent que toutes les espèces diminuent leurs surfaces foliaires spécifiques et que le ratio racine/tige est plus important chez les cultivars tolérants que les sensibles; notamment chez le cultivar "Anglona" (*Medicago polymorpha* L.) que chez le cultivar sensible "Paraggio" (*Medicago truncatula* Gaertn.). Ils rapportent aussi que l'acclimatation au froid induit l'accumulation de solutés au niveau racinaire, spécialement les sucres solubles totaux, couplée avec des changements d'activité de certains enzymes impliqués dans la synthèse du saccharose au niveau des feuilles.

Les travaux de Betty et al. (2000), sur *Brassica oleracea*, et les travaux de Brunel et al. (2009), sur *Medicago truncatula*, ont mis en évidence une forte variabilité génétique pour la germination et la croissance post-germinative sous un stress de basse température.

La détermination de la nature des gènes et des mécanismes responsables de la tolérance et des mécanismes de régulation qui activent l'acclimatation à la réponse au froid fournirait un potentiel pour de nouvelles stratégies d'amélioration la tolérance aux basses températures des plantes agronomiques (Thomashow, 1999). De telles stratégies seraient fortement plus intéressantes que les approches traditionnelles de sélection de plantes qui ont eu un succès limité en améliorant la tolérance au froid (Sarhan et Danyluk, 1998).

Baruah et al. (2009), dans une étude sur la tolérance au froid chez des espèces sauvages et cultivées de riz, à des stades précoces de germination, montrent que le froid affecte la germination ainsi que l'implantation de jeunes pousses. Ces auteurs stipulent d'ailleurs que pour déterminer le degré de la tolérance au froid, particulièrement aux stades précoces de croissance, la croissance post-germinative est l'une des caractéristiques majeures pour différencier les deux sous espèces cultivées de riz pour ce stress. Cependant, les variations génétiques de la tolérance au froid sont étroitement liées aux origines géographiques et la distribution des espèces. Des questions peuvent être soulevées au regard des différences génétiques pour la tolérance au froid. Au regard des bases mêmes de la tolérance au froid, les études récentes, concernant des analyses des «QTLs», révèlent que plusieurs d'entre

eux sont impliqués dans la tolérance au froid et sont répartis sur plusieurs chromosomes suggérant que l'acclimatation aux climats froids doit impérativement impliquer des voies complexes physiologiques et génétiques. En examinant quel était le rôle de la tolérance au froid dans l'adaptation locale, ils montrent, au stade post germinatif, qu'aucune différence n'est trouvée pour la tolérance au froid parmi les différentes espèces des différentes régions. Mais que cette différence est beaucoup plus prononcée à un stade plus avancé, stade plumule, et qu'il y avait une corrélation positive entre la latitude et la tolérance au froid, alors qu'elle n'a pas pu être mise en évidence pour la germination et les premiers stades germinatifs (Burowet al. 2010).

La germination et l'établissement de jeunes plants qui s'en suivent sont affectés par les sols froids et la température de l'air. Les basses températures induisent l'inhibition de la germination et l'émergence en plein champ constituant un problème des espèces originaires des environnements chauds. Il est clairement établi que, chez les jeunes plantules de riz, les méristèmes racinaires et apical sont directement influencés par les basses températures au sol. Il est aussi démontré que le développement des feuilles est étroitement contrôlé par les températures au sol que ce soit en plein champ ou bien en conditions contrôlées de laboratoire (Hundet al. 2008). D'après ces auteurs, deux hypothèses contradictoires se présentent. La première : est que la température agit directement sur le développement des tiges, effet direct. La deuxième : la température entraîne une faible croissance des racines, constituant un effet indirecte sur la croissance des tiges en limitant l'apport en nutriments et en eau. Ceci reflète de différentes stratégies éco physiologiques des génotypes, ainsi que la possibilité de développer une structure racinaire plus importante constitue une voie majeure pour la croissance, la résistance en l'occurrence, sous le stress froid.

Il est évident que les changements imputés au froid ne s'expriment rapidement que chez les cultivars sensibles (i.e. dès les premières heures ou les premiers jours du traitement), alors que pour les cultivars tolérants ces changements ne rentrent en action que bien plus tard.

Concernant le développement végétatif, les plants du cultivar sensible meurent au bout du 14^{ème} jour alors que les plantules du tolérant persistent avec un retard assez important dans leur croissance par rapport au témoin.

I.2.2.2. La luzerne et le développement sous froid

Les espèces adaptées par une sélection naturelle aux environnements froids, ont développés un certain nombre de moyens morphologiques et physiologiques afin d'améliorer leurs survies face à de longues période de froid (Guy, 1999). En règle générale, ces espèces, ont de petites tailles, une faible surface foliaire et un ratio racine/tige important. Les plantes adaptées au froid ont tendance à avoir une croissance lente, un mode photosynthétique des plantes de type C3 et un emmagasinement des sucres au niveau des tissus racinaires. Elles ont mis au point un système respiratoire efficace, qui leur permet de mobiliser rapidement les réserves stockées pendant les courtes saisons de croissance (Janska et al. 2010). Les deux stratégies distinctes mises en place par les plantes pour combattre le stress froid sont l'évitement et la tolérance. L'évitement implique la prévention de la congélation des tissus sensibles. Par exemple, chez les espèces succulentes sont capables d'emmagasinées (grâce à leurs tissus gorgés d'eaux) la chaleur pendant le jour, pour la dissiper graduellement lors de l'abaissement des températures nocturne (Nilsen et Orcutt, 1996).

La survie de la luzerne dépend en grande partie de sa capacité à répondre à des facteurs climatiques pendant les phases critiques de son cycle vital (Ouellet, 2007). Les facteurs abiotiques les plus importants en ce qui concerne le caractère survie à l'hiver des Légumineuses fourragères sont : les températures gélives, la présence d'une couverture de neige, l'humidité du sol, ainsi que l'alternance de gel et de dégel.

Chez la luzerne (*Medicago sativa*) cultivée, une association positive entre la réduction de l'élongation de la tige et la survie en basse température est souvent observée (Castonguay et al. 2009). D'après ces auteurs, les mutations qui surviennent au niveau des gènes de tolérance au froid et au gel sont masquées par la nature même tétraploïde de la luzerne (*Medicago sativa*).

Selon Paquin(1984),les plantes de luzerne acclimatées au froid peuvent survivre à des températures gélives de -20 à -26 °C pendant une brève durée (quelques heures), mais elles sont rapidement endommagées une fois exposées, pendant quelques jours, à des températures de -8 à -10 °C.

McKenzie et al. (1980) rapportent que les paramètres mesurés sous conditions contrôlées de laboratoire sont positivement corrélés avec la vigueur des plantules mesurée sous les conditions de plein champ. Il est clairement établi aussi que la vigueur et le taux de

germination des graines sont étroitement liés avec le poids, la taille, l'épaisseur, et le tégument des gaines (Wang et al. 2010). Ces auteurs relatent d'autre part, que la vitesse et l'uniformité de germination sous différentes conditions sont sous le contrôle de mécanismes génétiques de base similaires; et que les QTLs pour la vigueur des graines coïncident étroitement avec les QTLs pour le poids, et la taille des gaines. La dormance des graines, quant à elle, elle est, en partie, liée avec les mêmes mécanismes génétiques de base.

Les organes des plantes diffèrent dans leur tolérance au froid, typiquement les racines sont plus sensibles que les collets (Mackersie et Leshem, 1994), chose incompréhensible du moment où les collets sont le siège majeur des méristèmes impliqués dans la formation de nouvelles racines à la fin de la période du froid (Janska et al. 2010). Chez les espèces annuelles, la tolérance au froid survient grâce à la dormance des organes et des graines, ou bien encore protéger les méristèmes par des feuilles (Kacperska, 1999).

Une stratégie plus élaborée implique la surfusion (supercooling), procédé par lequel la nucléation des cristaux de glace endogène est inhibée. Dans les cas les plus extrêmes, les plantes très tolérantes au froid ont la capacité de générer à l'intérieur de leurs cellules ce qu'on appelle "liquid glass" une solution hautement visqueuse qui prévient la nucléation de la glace. De telles cellules deviennent osmotiquement, thermodynamiquement et mécaniquement désensibilisées à la présence de glace externe (Wisniewski et Fuller, 1999).

La détection du stress froid est fonction du taux de refroidissement (cooling), dT/dt , qui est la diminution progressive moyenne de la température par rapport à la température absolue T (Solanke et Sharma, 2008). Un certain nombre d'observations indiquent que les cellules végétales sentent le taux de variation de températures. Minorsky et Spanswick (1989) montrent qu'un rapide taux de refroidissement suscite de fortes dépolarisations de jeunes plantules de concombre.

I.3. Acclimatation au froid et changements métaboliques

Les températures froides se divisent en deux catégories : le «chilling» correspondant aux températures fraîches et positives et le «freezing» correspondant aux températures gélives. Ces deux types de froid peuvent affecter la croissance et le développement de la plante ainsi que sa répartition géographique.

La tolérance au froid est la résultante de la tolérance intrinsèque et de la tolérance induite appelée acclimatation. La tolérance intrinsèque dépend de la mise en place, au cours de microévolution des espèces, d'adaptations lentes et progressives ayant des conséquences morphologiques, physiologiques, et métaboliques sous un contrôle génétique (figure. 2)

Les basses températures perturbent l'activité métabolique, empêchent la fonction normale des processus physiologiques et peuvent mener à la mort en causant des dommages permanents. Les températures de congélation peuvent en particulier engendrer des pertes significatives dans la productivité végétale et alors limiter le revenu des agriculteurs. Les plantes subissant les températures négatives peuvent suivre deux stratégies principales pour survivre: une stratégie d'évitement de la congélation, ou une tolérance à la congélation (Sakai et Larcher, 1987). L'action d'éviter la congélation est principalement obtenue par la surgélation de l'eau des tissus. Cependant ce mécanisme est limité aux organes spécifiques tels que des graines ou des bourgeons (Sakai et Larcher, 1987). L'acquisition de la tolérance à la congélation est donc le mécanisme le plus communément développé par les plantes pour survivre aux très basses températures. En conditions normales, la réponse aux basses températures est le facteur primaire qui permet aux plantes d'augmenter leur tolérance, un phénomène connu sous le nom d'acclimatation (ou durcissement) au froid (Levitt, 1980; Sakai et Larcher, 1987; Guy, 1990; Thomashow, 1999; Ouellet, 2007; Gupta et al. 2011). Ainsi, la manière la plus logique d'améliorer la tolérance de congélation des plantes est d'exploiter leurs capacités normales d'acclimatation. Lors de l'abaissement progressif de la température (basses températures positives), les plantes qui tolèrent le gel (basses températures négatives) sont celles qui ont pu ajuster leur métabolisme et leur fonctionnement fondamental cellulaire aux contraintes biophysiques, imposées par le passage aux basses températures positives. Si la plante ne peut ajuster ses processus cellulaires pour un fonctionnement normal durant un long moment d'exposition à des basses températures positives, il est fort improbable qu'elle soit ou qu'elle devienne tolérante au gel (Guy, 1990; Thomashow, 2010).

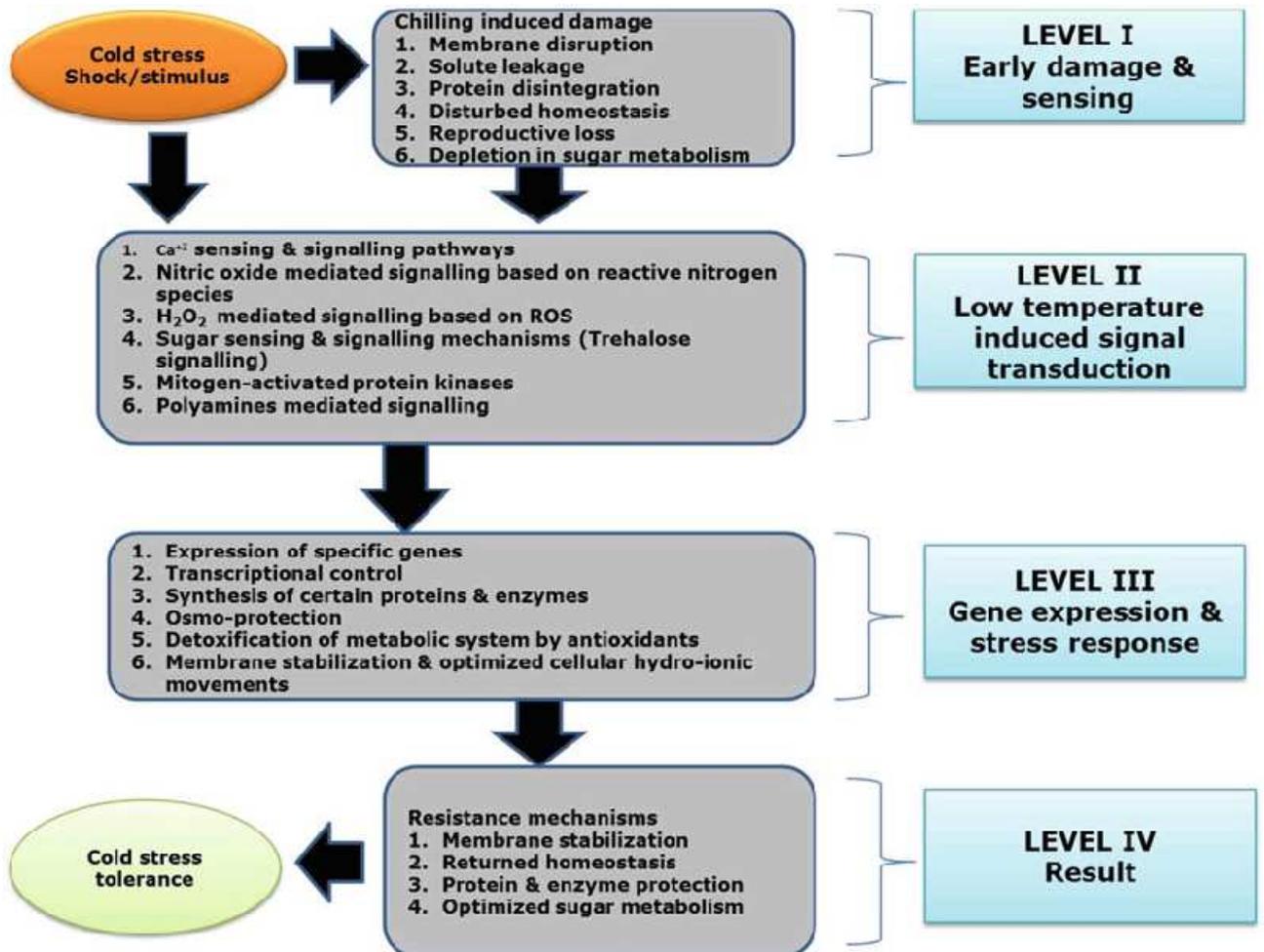


Figure 2. Réponses des plantes lors d'un stress froid (Pirzadah et al. 2014).

La totalité des métabolismes est donc affectée par le froid. En ce qui concerne la photosynthèse, le taux optimum est obtenu quand une balance appropriée entre la vitesse de carboxylation et la synthèse de sucres existe. Öquist et al. (1993) ont montré que la tolérance au gel est fortement corrélée avec la capacité d'augmenter la photosynthèse et les pools de glucides solubles pendant l'acclimatation au froid. Ces relations sont particulièrement importantes dans les feuilles nouvellement formées (Hurry et al. 2000). En effet, elles présentent une augmentation de l'expression des enzymes impliqués dans la synthèse de sucres. Les basses températures semblent, selon ces auteurs, inhiber plus fortement les réactions sombres de la photosynthèse que le transport d'électrons. Le risque devient alors un excédent de pigments photo assimilateurs activés dont la libération risque de générer des radicaux libres et de conduire au stress oxydatif.

Kim et Tai (2011), en quantifiant les changements biochimiques et physiologiques chez les jeunes plantules de deux cultivars de riz, l'un tolérant et l'autre sensible au froid, montrent que le cultivar sensible affiche des augmentations dans les paramètres étudiés durant toute la durée du traitement par le froid, alors que cette augmentation est assez réduite au niveau du cultivar tolérant. Pour la proline et l'acide ascorbique, le cultivar sensible augmente drastiquement ces deux paramètres, dès les premiers jours de traitement par rapport au témoin. Le cultivar tolérant quant à lui, exhibe peu ou pas de changements pour ces deux paramètres comparé au témoin et ceci durant toute la durée du traitement par le froid. Pour le glutathion réduit et le malondialdéhyde, qui sont deux antioxydants, qui rentrent dans certaine chaîne de synthèse d'enzymes tels que les peroxydases, les changements ne surviennent pas les premiers jours du traitement. Le cultivar tolérant affiche des taux similaires au témoin pour le glutathion réduit pendant toute la phase de froid, alors que le cultivar sensible présente des changements considérables sous stress froid. Cependant, le cultivar tolérant montre au 14^{ème} jour du traitement par le froid une augmentation pour les taux de la proline et le malondialdéhyde.

1.3. Perception et transduction du signal lors d'un stress froid

En raison de leur caractère sessile, les plantes sont constamment soumises à de multiples stress de l'environnement à des degrés divers. En conséquence, Les plantes sont équipées de mécanismes de réponse impliquant plusieurs produits de gènes induits par le stress, pour leur permettre de maintenir l'homéostasie cellulaire vis-à-vis de ces contraintes. Le stress est élément central de la signalisation au niveau des plantes soumises aux stress.

En conséquence, les plantes ont conçues des mécanismes à la fois spécifiques et complexes pour percevoir et répondre aux conditions de stress (Akpınar et al. 2012). Pour qu'une plante mette en place des mécanismes efficace de tolérance au froid il faut (i) tout d'abord que les températures basses soient perçues, (ii) puis que le signal soit transmis afin de réguler les gènes appropriés, (iii) et enfin que les protéines soient synthétisées pour limiter les dommages causés par le froid.

Le stress serait perçu par des récepteurs membranaires qui initient un signal, ensuite transmis par l'intermédiaire de messagers secondaires comme le calcium, les espèces actives d'oxygène ou bien l'inositol triphosphate. L'augmentation de calcium cytosolique est analysée par des senseurs de calcium qui provoquent une cascade de phosphorylation donnant lieu à l'activation des gènes impliqués dans la réponse au stress (régulateurs et effecteurs). Ces gènes permettent la mise en place de mécanismes pour la survie de la plante: rétablissement de l'équilibre osmotique, protection des membranes et des protéines, et détoxification par élimination des espèces actives d'oxygène. Donc ces contraintes induisent un stress osmotique et un stress oxydatif qui entraînent un déséquilibre de l'homéostasie et une fragilisation des membranes et des protéines. La perception puis la transduction du signal aboutissent à l'expression de gènes régulateurs qui eux-mêmes contrôlent les gènes effecteurs permettant la mise en place des mécanismes de tolérance aux stress.

1.3.1. Perception du signal et rôle de la membrane plasmique

Lors de l'acclimatation au froid, une augmentation du taux d'insaturation des acides gras constituant des lipides membranaires et une augmentation du rapport phospholipides sur protéines sont observées dans les membranes. L'asymétrie des lipides de la membrane semble contribuer à la stabilité de cette dernière à basse température (Sung et al. 2003). Ces changements empêchent la fuite d'électrolytes ou d'autres molécules de la cellule vers le milieu extérieur et la perturbation du fonctionnement des protéines de transport qui ont un rôle important dans le contrôle des flux métaboliques.

Le stress est perçu en premier lieu par des récepteurs membranaires cellulaires (Smallwood et Bowles, 2002; Solanke et Sharma, 2008; Heidarvand et Amiri, 2010)(figure 3), puis le signal est alors transduit en aval pour générer les seconds messagers tels que le calcium, les ROS et l'inositol phosphate (Mahajan et Tuteja, 2005). Selon Solanke et Sharma (2008), le signal induit par basse température est perçu initialement par la membrane plasmique soit

par la fluidité membranaire, ou bien grâce à des capteurs membranaires tels que le Ca^{2+} , les kinases, les récepteurs de l'histidine kinase, et des phospholipases. Par la suite, la réorganisation du cytosquelette et l'influx Ca^{2+} cytosolique prennent place. L'augmentation du Ca^{2+} cytosolique est captée par les CDPKs, les phosphatases et MAPKs, dont le rôle est la transduction des signaux pour activer la cascade transcriptionnelle. Les appareils photosynthétiques sont eux aussi responsables dans la perception du froid et la transduction du signal. Cependant, le stress dû au froid a des voies de signalisation communes avec d'autres stress biotique et abiotique suggérant un «cross-talking» entre eux (Chinnusamy et al.2004).

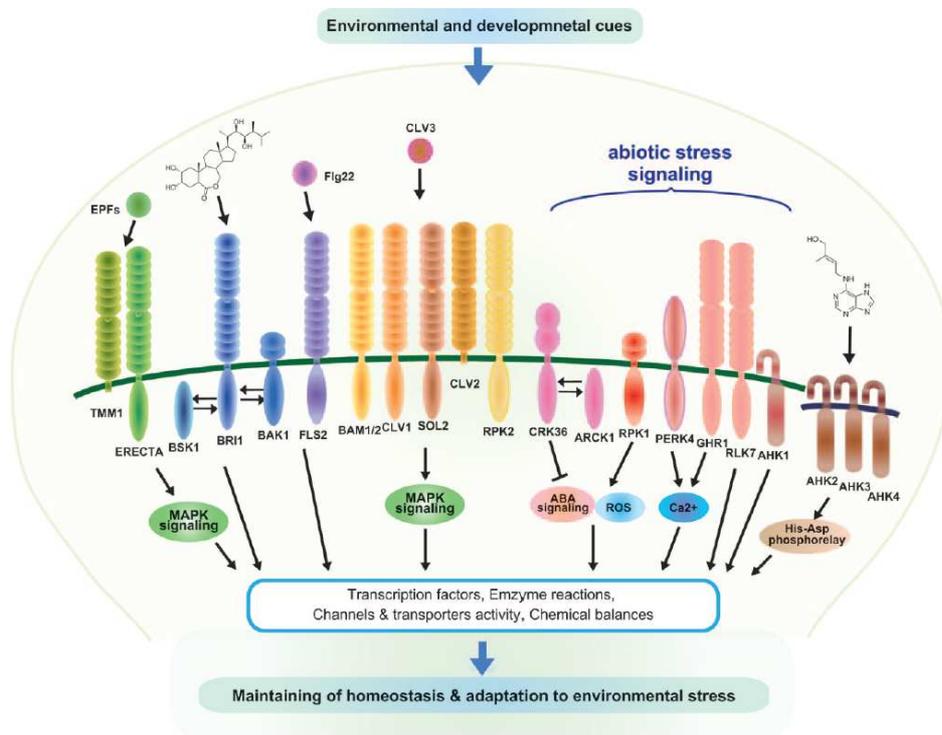


Figure 3. Les différents récepteurs membranaires impliqués dans la perception du stress

Dans une étude Thomashow (2001) souligne les progrès récents dans l'identification de gènes impliqués dans le rôle de l'acclimatation au froid. Environ 20 gènes ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* comme des régulateurs de froid, et il semblerait qu'il pourrait être relativement facile à modéliser le réseau à basse température de régulation transcriptionnelle (Thomashow, 2010). Depuis lors, le développement et l'utilisation de puces à ADN et d'autres outils génomiques ont permis d'apprendre, que l'exposition des plantes à basse température déclenche un programme réglementé très complexe qui aboutit à une réorganisation en profondeur du transcriptome.

Ces changements comprennent des régulations « up et down-régulation » de certains gènes qui se produisent lors de l'exposition des plantes à basse température (Fowler et Thomashow, 2002; Maruyama et al. 2004 ; Hannah et al. 2006 ; Vogel et al. 2005; Oono et al. 2006 ; Kilian et al. 2007; Robinson et Parkin, 2008). Kilian et al. (2007), en étudiant une analyse de classification hiérarchique des données du transcriptome, révèlent clairement ces caractéristiques et provoque un certain nombre de questions fondamentales. Comment les plantes ressentent les basses températures ? Comment cette information est traitée et régulée pour activer la première vague de gènes de froid ? Quelle est la logique réglementaire qui sous-tend le motif en cascade du réseau génique à basse température ? Et quelles fonctions biologiques peuvent être attribuées à des gènes qui constituent les différents circuits du réseau ? À l'heure actuelle, les réponses à ces questions sont loin d'être complètes, mais des connaissances importantes ont été acquises.

L'évolution des stratégies adaptatives permet aussi aux cellules de la plante de sentir les stimuli environnementaux et d'activer les réponses pour la survie. Pour répondre aux basses températures, les plantes doivent donc percevoir le stress, transmettre le signal au noyau et activer l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes d'adaptation.

Le froid est d'abord ressenti par la membrane plasmique ou par des complexes moléculaires cytoplasmiques et chloroplastiques qui transmettent le signal (Breton et al. 2000). Un transmetteur connu dans les cellules est le calcium. Or, aux basses températures, Knight et Knight (2001) ont observé une augmentation rapide de la concentration cytoplasmique de calcium et aussi une augmentation rapide dépendante du calcium de l'activité de la protéine phosphatase IIa. Örvaret al. (2000), quant à eux, ont mené leurs études sur des cultures de cellules de Luzerne en suspension. Ils ont montré que la rigidification de la membrane induit la réorganisation des microfilaments d'actine et l'ouverture des canaux calciques ce qui semble nécessiter que le cytosquelette d'actine soit couplé à la membrane plasmique aussi bien qu'aux canaux calciques. Le signal froid est alors transmis via une cascade de kinases et de phosphatases menant à l'activation de facteurs de transcription spécifiques qui activent la transcription des gènes *cor* (*cold regulated gene*) (Breton et al. 2000). L'expression de ces gènes est responsable de l'ajustement métabolique de la croissance à de basses températures et du développement de la tolérance au gel. Mais pour comprendre les composants du signal en amont menant à l'activation de gènes spécifiques, il existe des difficultés car les gènes répondant aux

basses températures sont souvent aussi induits par d'autres stimuli tels que la sécheresse, la salinité ou l'acide abscissique.

La différence majeure qui existe entre les membranes de plantes acclimatées et non acclimatées est que le matériel membranaire reste intact au cours du cycle de gel et dégel chez les cellules tolérantes. Les cellules des plantes tolérantes sont capables de modifier leur paroi et la membrane plasmique pour protéger la plante des blessures causées par le gel. C'est pour cela que les dommages comme les transitions de la phase lamellaire à la phase hexagonale II (Hrr) et les lyses induites par l'accroissement cellulaire sont beaucoup moins nombreux. En effet, les protoplastes de plantes acclimatées ne forment pas de vésicule endocytotique qui mènerait inévitablement à une perte de surface. En revanche, il y a formation d'extrusions exocytotiques qui permettent à la membrane de retrouver sa surface initiale sans subir de déchirement lors de la période de dégel (Uemura et al. 1995). Plusieurs études ont montré que, lors d'un stress au froid, les teneurs en stérols et en phospholipides de la membrane plasmique augmentent. Par contre, les teneurs en stérols glucosides acétylés et cérébrosides (CER) diminuent. Ces modifications ont été observées chez *Arabidopsis*, le seigle et l'avoine lors de l'acclimatation au froid. Ces changements auraient un rôle dans la cryostabilité de la membrane plasmique lors du gel (Uemura et al. 1995).

Le type de lésion observé chez les plantes non-acclimatées est la transition de la bicouche lipidique d'une phase lamellaire vers une structure non bicouche hexagonale-II qui peut causer la déstabilisation des membranes. Un deuxième type de lésion est la perte du protoplasme chez la plante, lorsqu'elle se réchauffe suite à une exposition à des températures entre 0°C et -5°C. Elle survient parce que suite à une contraction de la cellule, il y a une perte irréversible de la surface membranaire par vésiculation (Uemura et Steponkus 1989). Un autre type de lésion rencontré est la fusion des endomembranes avec la membrane plasmique à des températures plus basse que -5°C. Ce type de lésion est grandement diminué chez les plantes acclimatées à cause de modifications au niveau de lipides (Uemura et Steponkus 1997; Steponkus et al. 1993). Cette modification accrue de la tolérance au froid de plantes est due aux proportions plus élevées de phospholipides insaturés et des changements quantitatifs et qualitatifs au niveau des stérols et cérébrosides (Thomashow, 1998). En outre, il est proposé que des déhydrines, des protéines très hydrophiles et solubles à l'ébullition, peuvent stabiliser les membranes soit

par une interaction directement avec la surface des membranes, ou indirectement, par leur forte interaction avec l'eau environnante (Pearce, 2001).

De plus, plusieurs études ont rapporté l'accumulation d'osmoprotectants durant l'acclimatation telle que le saccharose et d'autres sucres simples (Thomashow, 1998). Ces sucres servent à augmenter la pression osmotique dans le cytoplasme; ils peuvent aussi stabiliser les protéines et les membranes contre la déshydratation associée au stress de gel.

1.3.2. Les osmoprotecteurs

Pendant le phénomène d'endurcissement, les cellules doivent être protégées du gel et en particulier lutter contre la formation de glace qui soustrait l'eau disponible des compartiments cellulaires et provoque des dommages mécaniques aux systèmes membranaires. Des protéines LEA (LateEmbryogenesisAbundant) sont accumulées dans les tissus pendant les périodes d'acclimatation à des stress qui mettent en jeu la déshydratation comme le froid. Ce sont des protéines hautement hydrophiles qui restent stables même après avoir bouilli. Elles ont une composition en acides aminés simple et contiennent des motifs répétés en acides aminés dont certaines régions sont capables de former des hélices α -amphipathiques. Ces hélices permettraient aux protéines de stabiliser les membranes contre les dommages du gel (Thomashow, 1999). Leur tolérance aux conditions dénaturantes suggère que leur rôle pourrait être de stabiliser les structures dans un environnement pauvre en eau. Le groupe 2 des LEA est constitué de déhydrines parmi lesquelles 1 à 5 répondants au froid ont été découvertes par espèce (Pearce, 1999). Les déhydrines par leur action au niveau des cellules sont des cryoprotecteurs tout comme les sucres peuvent l'être.

L'accumulation des sucres est à même de diminuer la température de cristallisation de la glace et la quantité de glace formée. En effet, chez les plantes pérennes tempérées, une forte augmentation en sucres solubles et une diminution de la teneur en amidon dans les tissus en automne et en hiver sont observées (Guy et al. 1992). Bourionet al. (2003), dans leurs études sur le petit pois (*Pisum sativum*), ont montré que la teneur en sucres solubles augmente rapidement pendant les 7 premiers jours de froid et diminue légèrement durant les 7 jours suivant. Le stockage des sucres chez le Pois d'hiver peut avoir un rôle nutritionnel pendant l'acclimatation au froid mais aussi participer directement à la tolérance au gel comme moyen d'assurer, également, la cryoprotection des tissus de la plante surtout ceux comme les feuilles qui sont nécessaires pour amener l'énergie à la

plante. Chez différentes plantes ligneuses, ce serait spécifiquement l'accumulation du raffinose qui est corrélé à la tolérance au gel bien que le rôle exact du raffinose dans la protection contre le gel reste à élucider. Chez les herbacées, ce sont généralement le saccharose et parfois des polymères solubles vacuolaires comme les fructanes (inuline chez la Chicorée et phléanes pour les Poacées) qui sont corrélés à cette tolérance au gel. Des changements de concentration et de distribution des sucres pourraient constituer un mécanisme pour protéger des compartiments spécifiques pendant la déshydratation. Selon Gerhardt et Heldt (1984), il existe des changements considérables dans la localisation des sucres entre le jour (vacuole) et la nuit (cytoplasme) chez l'épinard. Des changements similaires pourraient être observés entre des cellules de plantes acclimatées ou non au froid.

D'autres composés peuvent jouer le rôle d'osmoprotecteurs. Ce sont des protéines solubles, la proline, la glycinebétaines, le sorbitol ou des polyamides mais aussi les sucres solubles (Paquin, 1984). Ces constituants sont hautement solubles et non toxiques pour l'organisme. Les osmoprotecteurs servent à augmenter la pression osmotique dans le cytoplasme et peuvent aussi stabiliser les protéines et les membranes quand les températures sont défavorables (Breton et al. 2000). L'accumulation de ces solutés dans le cytoplasme contribue à la survie des cellules en cas de gel, en réduisant les pertes d'eau durant la déshydratation induite par la cristallisation de l'eau extracellulaire pour former la glace. Ils séquestrent aussi les ions toxiques et protègent les macromolécules de la dénaturation induite par la déshydratation (Steponkus, 1984).

1.4. Régulation de l'expression génétique dans la réponse aux basses températures

Dès 1985, Guy et al., ont observé des changements dans l'expression des gènes pendant l'acclimatation au froid, et en concluent que des gènes répondant au froid permettent de réaliser des changements biochimiques et physiologiques nécessaires pour la croissance et le développement à basse température. Pour Hugues et al. (1996), les études biochimiques montrent que la croissance à basse température est possible grâce à la production d'isoformes de basses températures d'enzymes impliquées dans les fonctions vitales pour les cellules. Ainsi, chez *Arabidopsis thaliana*, une désaturase d'acide gras, FAD8, et chez l'Orge, une protéine de transfert de lipides, BLT4, sont exprimées lors de l'acclimatation au froid pour permettre des changements de composition lipidique membranaire.

Des protéines chaperonnes Hsp70, chez l'épinard, et Hsp90, chez le colza, sont aussi exprimées et stabilisent les protéines contre les dénaturations induites par le gel. Un grand nombre de gènes induits par le froid ont été isolés et caractérisés : des acides gras, des protéines chaperonnes, des protéines impliquées dans la biosynthèse d'osmoprotectants, des protéines antigél et des composants de la régulation génique tels que des facteurs de transcription, des kinases et des phosphatases, mais beaucoup restent encore inconnus (Thomashow, 1999). Parmi ces gènes, ceux codant les déhydrines de la famille WCS120 (*wheat cold-specific*) chez le blé sont au nombre de sept. Ce sont des protéines riches en glycine et thréonine. Le nombre de copies et l'organisation des gènes inductibles chez les cultivars de blé sensibles et tolérants au gel sont les mêmes. Mais l'expression des gènes induits par les basses températures tels que WCS120 dans les espèces tolérantes est maintenue à un haut niveau pendant l'exposition aux basses températures tandis qu'elle diminue dans les espèces moins tolérantes. Le degré de tolérance au gel d'une plante dépend donc de sa capacité à maintenir l'expression de gènes inductibles par le froid à un haut niveau pendant la période d'acclimatation. La principale régulation des gènes inductibles par le froid est une régulation transcriptionnelle. Cette régulation est en grande partie modulée par des protéines se fixant sur des sites spécifiques dans les régions promotrices des gènes. Le motif CCGAC (ou CRT pour C-repeat) forme le motif d'un LTRE (*low temperature responsive element*) ou DRE (*dehydration responsive element*). Ce motif où des variantes sont présents dans les promoteurs de COR15A ou COR6.6 d'*Arabidopsis*, de BLT4.6 de l'Orge, ou de BN115 du Chou. Un autre élément nommé TCA peut aussi intervenir. Il est présent dans une région importante du promoteur de WCS120 et s'il est tronqué, la réponse au stress est beaucoup moins efficace ce qui montre son implication dans cette réponse au stress (Ouellet, 2002).

1.4.1.C-repeat binding factor (CBF)

Les CBF (C-repeat binding factor) sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression de plusieurs gènes en relation avec les stress abiotiques (Zhao et al. 2011 ; Guo et al. 2011)(figure). Les CBF sont des régulateurs des gènes de froid, les COR (cold regulated genes) induits par les basses températures et confèrent la tolérance à des températures sub-zero (acclimatation) (Galiba et al. 2009). Les gènes CBF sont appelés aussi (DRE)-binding factors) gènes qui codent pour la transcription de séquences conservées de gènes COR (CCGAC [C-repeat (CRT)/dehydration element (DRE)]) au niveau des promoteurs de plusieurs gènes de réponses aux stress incluant les gènes de

réponses au stress de déshydratation précoce et du stress froid (Stockinger et al. 1997 ; Liu et al. 1998 ; Shinozaki et Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Thomashow, 2001).

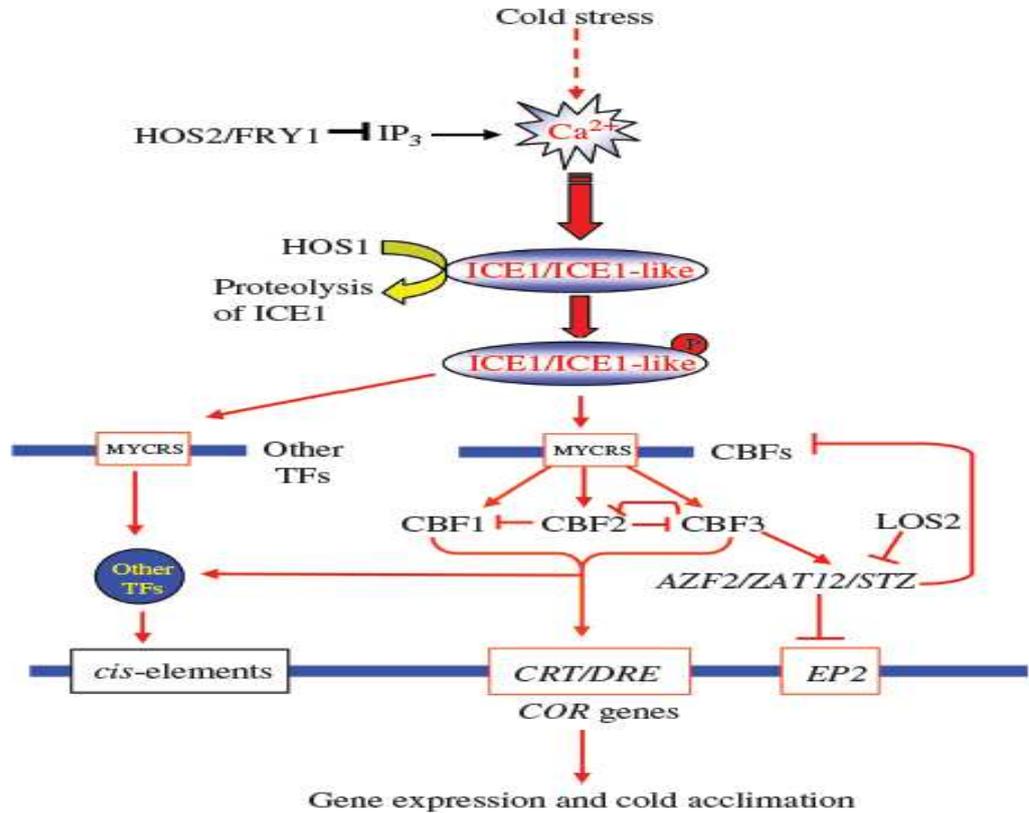


Figure 4. Régulation et facteurs de transcriptions sous un stress froid

Des études ont montré que l'expression des gènes régulés par le froid ne sont pas tous sous le contrôle des CBF/DREB (Fowler et Thomashow, 2002; Sung et al. 2003).

Une multitude de gènes en relation avec la tolérance au froid ont été identifiés et caractérisés. COR15a chez *Arabidopsis thaliana* (Artus et al. 1996; Liu et al. 1998; Gilmour et al. 2004), Cas15 chez la luzerne (*Medicago sativa* L.) (Monroy et al. 1993), chez l'orge (*Hordeum vulgare* L.) (HVA1) (Thomashow, 1999), chez le riz (*Oryza sativa* L.) (Ito et al. 2006). Qui et al. (2004) et Zhang et al. (2004) pour le maïs (*Zea mays* L.) et la tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) respectivement. Xion et Fei (2006) mettent aussi en évidence ces facteurs de transcription au niveau du seigle (*Secale cereale* L.). Les CBF (C-repeat binding factor) ou DREB (dehydration responsive element binding protein) régulent et activent l'expression de plusieurs gènes COR (cold regulated gene) par plusieurs voies distinctes de transduction du signal (Ishitani et al. 1997 ; Shinozaki et Yamaguchi-

Shinozaki, 2000; Fowler et Thomashow, 2002 ; Sung et al. 2003; Galiba et al. 2009; Guo et al. 2011). Ces auteurs trouvent que l'expression des gènes de tolérance au froid (GbCBF1) chez le coton est enclenchée deux heures après un traitement de 4 °C pour atteindre un maximum après 16 heures de traitement au froid et décroît significativement après 24 heures.

1.4.2. Voies ABA

Le stimulus par température basse est transmis via des voies ABA indépendantes et des voies ABA dépendantes. L'ABA est, en effet, impliqué dans la réponse au froid car une augmentation transitoire des concentrations d'ABA endogène (trois fois) est observée chez *Arabidopsis thaliana* et une application d'ABA exogène peut induire une augmentation de la tolérance au gel chez les plantes d'*Arabidopsis* qui ont poussé à 22 °C (Hughes, 1996). Pour cette voie ABA dépendante, les éléments « cis » sont les ABRE (ABA *response element*) avec pour séquence consensus C/TACGTGGC dans le promoteur des gènes répondant à l'ABA et au froid grâce à cette voie. Quant aux éléments « trans », ce sont les AREB1 et AREB2 (ABA *responsive element binding protein*) dont les gènes qui les codent répondent à la sécheresse, au sel et à l'ABA (Heino et Palva, 2002).

1.5. Le stress oxydatif induit par le froid

A cause de leur nature sessile et poikilothermique, les plantes sont constamment exposées à des stress divers (biotique et abiotique). Ceci les a conduits à développer des mécanismes adaptatifs leur permettant de sentir les changements environnementaux et activer des réponses qui augmentent leur tolérance. Le froid non seulement réduit la croissance et la distribution des plantes mais aussi cause de sérieux dommages à de nombreuses cultures (Janska et al. 2010; Sanghera et al. 2011). Différentes espèces de plantes diffèrent largement dans leur habilité à tolérer les basses températures (Levitt, 1980; Sakai et Larcher, 1987). Selon Heino et Palva (2003) les espèces tropicales sensibles au froid peuvent être endommagées de manière irréparable par le froid. Ces dommages peuvent se résumer en une altération du processus du métabolisme, par des altérations des propriétés de la membrane, par les changements dans la structure des protéines et les interactions entre macromolécules ainsi que l'inhibition des réactions enzymatiques. Chez les espèces tolérantes au froid mais sensible au gel, les plantes sont capables de survivre à des températures légèrement au-dessous de zéro, mais sont sévèrement endommagées lors de

la formation de glace dans les tissus. D'autre part, les plantes tolérantes au gel sont capables de survivre à des niveaux variables de températures de congélation, mais le degré réel de tolérance dépend de l'espèce, du stade de développement, et de la durée du stress.

Le dénominateur commun chez plusieurs stress, incluant les basses températures, est la production des espèces réactives d'oxygène (ROS), qui peuvent générer des dommages aux différentes macromolécules au niveau des cellules (McKersie et Bowley, 1998).

Les basses températures en combinaison avec des intensités lumineuses élevées peuvent causer d'excessives productions de ROS et donc la tolérance au gel est corrélée avec l'efficacité du système de piégeage de ces ROS pour faire face à ces stress oxydatifs (Inze et Van Montagu, 1995).

La terminologie de "stress oxydant" est généralement utilisée pour toute agression environnementale ayant pour conséquence une production accrue d'oxydant, molécules toxiques dérivées de l'oxygène. La particularité des végétaux réside dans le fait qu'ils sont producteurs de l'oxygène, molécule à la fois vitale et nocive. La présence de cette molécule entretient de surcroît toute une chaîne de réactions radicalaires ayant pour conséquence la génération de molécules oxydantes couramment appelées "espèces réactives de l'oxygène : Reactive oxygen species (ROS)". Dans les cellules végétales, les chloroplastes, les mitochondries et les peroxysomes sont les principales sources génératrices des ROS (Hernandez et al. 2001; Jithesh et al. 2006).

Les stress d'origine biotique ou abiotique ont pour conséquence une forte accumulation de radicaux libres oxygénés et d'une altération de l'homéostasie cellulaire. Les plantes exposées aux basses températures produisent des formes réactives de l'oxygène qui endommagent les lipides membranaires, les protéines, la chlorophylle et les acides nucléiques. Même si les formes réactives de l'oxygène sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress. Elles peuvent intervenir dans les cascades de signalisation responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défense protéines chaperonnes, enzymes antioxydants, ascorbate peroxydase, gaïacol peroxydase, glutathionne S transférase (Kang et Saltveit, 2001; Funatsuki et al. 2003; Bernardi et al. 2004; Parent et al. 2008) et leur production est une réponse cellulaire commune à de nombreux stress chez les végétaux (Ouellet, 2007; Parent et al. 2008; Mittler et al. 2011).

Pour éliminer les formes réactives de l'oxygène, les plantes ont développé des mécanismes pour et des systèmes enzymatiques antioxydants tels que, les superoxydesdismutases, les

catalases, les estérases et les peroxydases (Omran, 1980; Scebba et al. 1998; Cipollini, 1998; Xiong et Zhu, 2002; Kuk et al. 2003; Janda et al. 2007; Ducic et al. 2003; Jang et al. 2004; Bernardi et al. 2004; Ashraf et Harris, 2004; Simonovicova et al. 2004; Tasgin et al. 2006; Chakroun et al. 2007; Li et al. 2010). Ces systèmes enzymatiques sont considérés comme étant les composés protecteurs principaux engagés dans l'élimination des radicaux libres et des formes réactives de l'oxygène (Bogdanovic et al. 2008).

Chapitre II : Stress et système enzymatiques

Les diverses réponses des enzymes à une variété de facteurs environnementaux peuvent être utiles pour prédire la capacité de survie d'une espèce de plante ou d'une variété aux conditions de stress (Syros et al. 2005). Majourhat et Baaziz (2004) préconisent l'utilisation des peroxydases comme marqueurs pour la caractérisation des ressources génétiques afin d'améliorer la tolérance aux stress biotiques et abiotiques qui entravent le développement de la culture du palmier. D'après Khales et Baaziz(2006) les peroxydases sont fréquemment utilisées comme marqueurs de la résistance aux contraintes.

II.1. Stress froid et ROS

Certains symptômes observés en situation de stress d'origine biotique ou abiotique sont la conséquence d'une forte accumulation de radicaux libres oxygénés et d'une altération de l'homéostasie cellulaire. Les plantes exposées aux basses températures produisent des formes réactives de l'oxygène qui endommagent les lipides membranaires, les protéines, la chlorophylle et les acides nucléiques. Même si les formes réactives de l'oxygène sont formées au cours du métabolisme normal de la plante, l'augmentation de leur concentration intracellulaire est souvent synonyme de stress. Elles peuvent intervenir dans les cascades de signalisation responsables de l'induction et de la régulation de nombreux gènes de défense protéines chaperonnes, enzymes antioxydants, ascorbate peroxydase, glutathione S transférase (Funatsuki et al. 2003; Bernardi et al. 2004; Parent et al. 2008) et leur production est une réponse cellulaire commune à de nombreux stress chez les végétaux (Ouellet, 2007; Parent et al. 2008; Mittler et al. 2011).

Baek et al. (2000) indiquent que l'activité des peroxydases augmente avec l'élévation de la production d' H_2O_2 chez les plantes transgéniques. Ces molécules sont impliquées non seulement dans le développement des symptômes, mais aussi dans la signalisation lors de la réponse des plantes aux stress (Parent et al. 2008). Aussi les plantes réagissent face au stress, qui occasionne la production de ces métabolites toxiques, par une augmentation des systèmes enzymatiques antioxydants. D'après Tasgin et al. (2006) il est crucial que les plantes puissent maintenir les activités de ces enzymes pour s'accommoder de ces stress oxydatifs. Certains auteurs signalent que sous les conditions de stress, il est vital pour toutes les espèces d'ajuster leurs systèmes antioxydants pour changer la concentration des formes réactives de l'oxygène (Janda et al. 2003; Ashraf et Harris, 2004; Roy et Mandal, 2005). D'ailleurs un équilibre entre la production de radicaux oxygénés et leur destruction

est requis si la fonction et l'efficacité métabolique doivent être maintenues à la fois dans les conditions normales et de stress (Gulen et Eris, 2004). D'autant que les formes réactives de l'oxygène (ROS), sont particulièrement délétères vis-à-vis de tous les constituants cellulaires (ADN, protéines, lipides...).

Les ROS sont considérées comme des molécules phytotoxiques qui peuvent être impliqués dans les processus de vieillissement des plantes (Parent et al. 2008). La contribution de certains gènes à contrôler les ROS sous stress froid, chez *Arabidopsis*, a été suggérée par Lee et al. (2002). Les auteurs Seki et al. (2002) et Thomashow (1999) ont montré qu'une contrainte par basse température peut induire, suite à une accumulation de H_2O_2 dans les cellules d'*Arabidopsis*, un certain nombre de gènes de froid comme le RD29A, KIN1, KIN2, COR15A, COR47, DREB1A, DREB2A, et ERD10.

Moon et al. (2003) ont mis en évidence qu'une expression accrue et l'activité enzymatique de la CAT, détectée dans des plantes transgéniques d'*Arabidopsis thaliana*, diminue le niveau de H_2O_2 dans bien plus que celle des plantes de type sauvage.

II.2. Les différents types de ROS

Les ROS sont des produits à divers compartiments cellulaires dans la cellule comme les chloroplastes, les mitochondries, la membrane de plasma, les peroxysomes, l'apoplaste, le réticulum endoplasmique et les parois cellulaires stressées et non stressées. Les espèces réactives de l'oxygène peuvent être classifiées selon les radicaux centrés et les radicaux non-centrés par rapport à l'oxygène. Les radicaux centrés par rapport à l'oxygène sont l'anion de superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle ($\bullet OH$), le radical alcoyle (RO^{\bullet}) et le radical de peroxy (ROO^{\bullet}), alors que les radicaux non-centrés par rapport à l'oxygène sont le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le singulet oxygène (1O_2). Les autres ROS sont des espèces contenant de l'azote telles que le NO^{\bullet} , le bioxyde nitrique (NO_2), et le peroxy nitrite ($OONO^-$) (Simon et al. 2000 ; Huang et al. 2005). Les ROS sont produits à la suite d'une fuite d'électrons d' O_2 au niveau de la chaîne de transport d'électron, ou bien à la suite de plusieurs procédés biochimiques localisés dans divers compartiments cellulaires.

II.3. Les systèmes de défense antioxydatifs

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) sont générées dans des cellules végétales par le métabolisme cellulaire normal ou en raison de conditions environnementales défavorables, telles que la sécheresse, la salinité, les métaux lourds, de la

sécheresse, des herbicides, des carences en éléments nutritifs, ou d'un rayonnement. Leurs productions sont contrôlées par différents systèmes enzymatiques et non enzymatiques. Parmi les systèmes enzymatiques antioxydants on trouve la CAT, APX, POX, SOD, MDHAR, DHAR et GR, et pour les systèmes antioxydants non enzymatiques, on trouve l'ascorbate, le glutathion, les caroténoïdes, composés phénoliques, la proline, la glycine bêtaïne, le sucre, et les polyamines (Ahmad et al. 2008; Gill et Tuteja 2010; Karuppanapandian et al. 2011). La synthèse des ROS par le transport d'électrons par le système photosynthétique, en conditions normale, est contrebalancée par des systèmes de "scavenging", incluant la Cu/Zn-superoxyde dismutase, l'ascorbate peroxidase, le superoxyde dismutase (SOD), la catalase (CAT), la glutathion réductase (GR), la glutathion peroxydase (GPX) ou POD (Noctor et al. 1998; Ruelland et al. 2009).

II.3.1. Superoxyde dismutase (SOD)

Le système SOD Mérallo-enzyme est un antioxydant enzymatique intracellulaire le plus efficace omniprésent dans tous les organismes aérobies et dans tous les compartiments sous-cellulaires. Il est bien établi que le système SOD est très important dans les mécanismes de la tolérance de la plante vis-à-vis des stress et à fournir la première ligne de défense contre les effets toxiques des niveaux élevés des ROS. Les SOD éliminent l' O_2^- en catalysant sa dismutation, en un O_2 réduit à H_2O_2 et un autre oxydé en O_2 (Mettler 2002).

II.3.2. Catalase (CAT) EC 1.11.7.6)

La CAT est une enzyme contenant de l'hème-tétramère qui catalyse les réactions de dismutation de H_2O_2 en H_2O et O_2 et est indispensable pour la désintoxication des ROS dans des conditions de stress.

La CAT est également importante dans l'élimination de H_2O_2 généré dans les peroxysomes au cours de la β -oxydation des acides gras, la photo-respiration et le catabolisme des purines (Ahmad et al. 2008; Gillet Tuteja, 2010; Karuppanapandian et al. 2011). Divers stress abiotiques induisent l'activité de la CAT dans des conditions *in vitro* dans différentes plantes, y compris l'hyperhydricité, la salinité, la sécheresse, et le rayonnement gamma (Saher et al. 2004; Chakrabarty et al. 2005; Rahnama et Ebrahimzadeh, 2005; Erturk et al. 2007) par contre, le stress par la carence en Fer réduit l'activité de la CAT (Mohamed et Aly, 2004). Les activités de la CAT ont été considérablement induites au niveau de clones de *Medicago Sativa*, améliorés par la méthode de sélection *in vitro*, et sous un traitement de PEG, lors d'un

stress salin (Safarnejad, 2004). En outre, les activités de la CAT ont été détectées avec une analyse PAGE-native plus des mesures spectrophotométriques. Chakrabarty et al. (2005) ont indiqué que par la suite de l'analyse PAGE-native, trois bandes d'isoenzymes CAT (CAT-1, CAT-2, et CAT-3) ont été observées sur les gels. Deux d'entre eux (CAT-1 et CAT-3) ont été fortement induits dans les feuilles hyperhydriques de pomme par rapport aux feuilles saines.

II.3.3 Les peroxydases

II.3.3.1. Définition des peroxydases

Les peroxydases firent partie des premières enzymes étudiées lorsque Schonbein, en 1855, observa l'apparition d'une coloration intense en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), de gaïacol et d'extraits animaux ou végétaux (Delannoy et al. 2004).

On distingue deux grandes familles de peroxydases : les peroxydases animales, principalement détectées chez les animaux, et, par opposition, les peroxydases non animales détectées chez les plantes, les champignons, les bactéries et les protistes. Les peroxydases non animales sont actuellement sous-divisées en 3 classes : les *Classes I* contenant les Catalase-Peroxydases (CP), les Ascorbates Peroxydases (APx) et les Cytochrome c Peroxydases (CcP) ; les *Classes II* ou lignine peroxydases uniquement détectées chez les champignons, qui sont capables de dégrader la lignine ; les *Classes III* présentes seulement chez les plantes. Les peroxydases des plantes (Ec.1.11.1.7) appelées aussi peroxydases de classe III, catalysent l'oxydation de plusieurs substrats dont les phénols en présence de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 5).

Ce sont des glycoprotéines contenant de la ferriprotoporphyrine XI comme groupe prosthétique et du calcium. Les peroxydases jouent de grands rôles dans la croissance, le développement et le système de défense des plantes, Ces enzymes forment des familles multigéniques. Ainsi, un séquençage complet a permis de montrer l'existence de 73 gènes codant une peroxydase de classe III chez *Arabidopsis thaliana*. La plupart de ces gènes sont exprimés, soit de façon constitutive, soit à la suite de divers stress (Tognolli et al. 2001).

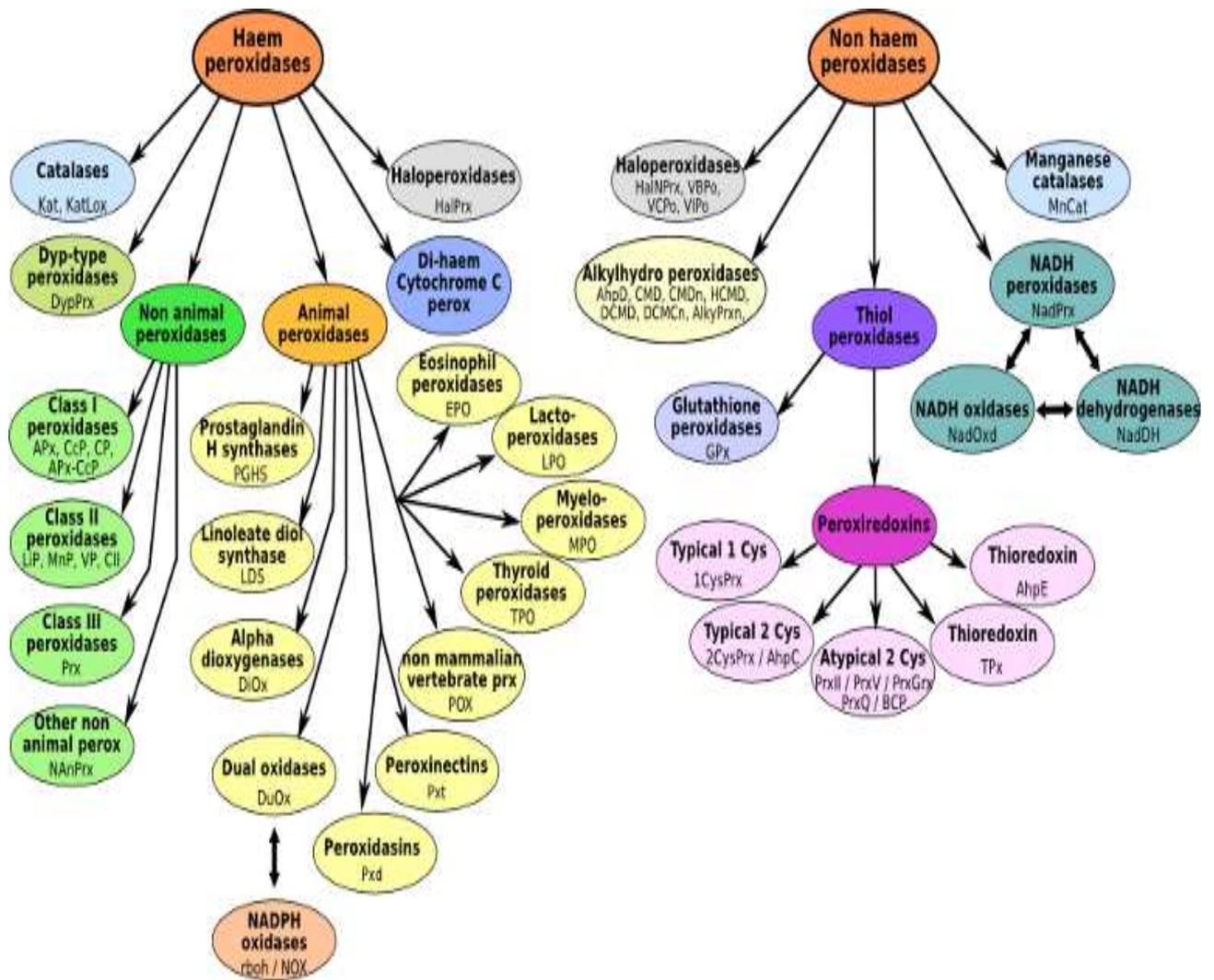


Figure5. Les différents types de peroxydases

Les peroxydases exercent des fonctions diversifiées dans les plantes. Elles utilisent l'eau oxygénée comme accepteur d'électrons provenant de diverses molécules, tels les précurseurs de la lignine ou des phénols (flavonoïdes ou autres). En plus, elles peuvent catalyser l'oxydation de quelques molécules en présence d'oxygène. C'est le cas de l'auxine (acide 3-indolylacétique), une des hormones contrôlant la croissance et la différenciation des plantes (Baaziz et al. 2006).

II.3.3.2. Classification des peroxydases

Selon Delannoy et al (2004) il existe plusieurs classifications des peroxydases établies en fonction du caractère étudié.

II.3.3.2.1. La classification de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire (IUBMB)

Elle est basée sur les mécanismes de réactions et les substrats mis en jeu. Elle est disponible sur le site internet de l'IUBMB (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>) avec des mises à jour récentes. Selon Linossier (1898) et les recommandations de la commission de nomenclature de l'IUBMB (NC-IUBMB), les peroxydases appartiennent au groupe des oxydoreductases (EC I) utilisant les peroxydes (EC 1.11) et dont elles sont d'ailleurs les seules représentantes (EC 1.11.1). Elles sont subdivisées en treize groupes d'EC 1.11.1.1 à EC 1.11.1.14. Ce sont des protéines à hème, sauf les NADH et NADPH-peroxydases (EC 1.11.1.1 et 2) qui sont des flavoprotéines et les glutathion-peroxydases (EC 1.11.1.9) qui sont des séléno-protéines.

II.3.3.2.2. La classification de Welinder

La classification repose sur les caractéristiques de la structure primaire des peroxydases à hème ferrique. Elle exclue les NADH et NADPH peroxydases, les glutathion peroxydases, les peroxydases à deux hèmes, dont le cytochrome c peroxydase (CcP) de *Pseudomonas aeruginosa*, et les haloperoxydases qui catalysent l'halogénéation de composés organiques. Welinder (1992) distingue ainsi trois superfamilles :

- les peroxydases animales comprenant les peroxydases à halogènes et les prostaglandines synthases ADDIN (O'Brien. 2000) ;
- les catalases ;
- les peroxydases végétales.

II. 3.4. Les peroxydases végétales

Les peroxydases végétales présentent une grande variabilité au niveau de leur séquence protéique, bien que partageant entre elles un certain nombre de points dont une structure tertiaire globale similaire, dix hélices communes (Schuller et al. 1996) et un hème de type b relié de manière covalente à la protéine par le groupement imidazole d'une histidine conservée sur le côté proximal. Welinder (1992) les sépare en trois classes.

La première classe renferme les peroxydases d'origine procaryotique dont La cytochrome c peroxydase (CcP) de *Saccharomyces cerevisiae*, les ascorbate peroxydases (AsP) et les catalase peroxydases (CaP) bactériennes. Ce sont toutes des peroxydases intracellulaires (EC 1.11.1.5/6/11) ; la deuxième classe contient les peroxydases secrétées par les champignons (EC 1.11.1.13/14) et dernièrement la troisième classe est les peroxydases secrétées par les cellules des plantes (EC 1.11.1.7).

II.3.4.1. Rôle des peroxydases de classe III dans le métabolisme des parois

Les peroxydases sont depuis longtemps soupçonnées d'être impliquées dans la formation et la modification de la paroi des cellules végétales en raison de leur localisation pariétale et de la nature des substrats. Elles interviennent *via* des réactions de couplage permettant la formation des grandes molécules composant ce compartiment. Néanmoins, l'attribution d'un rôle précis à chacune des nombreuses isoformes présentes reste encore à déterminer.

De nombreuses études ont associées les peroxydases à la synthèse de subérine et de lignine. En effet, les dernières étapes de la formation de la lignine consistent en la polymérisation des monolignols, monomères de la lignine (Boudet, 2000), pour former cette structure macromoléculaire rigidifiant la paroi des cellules végétales. Dans cette dernière étape, plusieurs groupes d'enzymes semblent pouvoir intervenir (Lewis et al. 1999) : les peroxydases, les laccases (EC 1.10.3.2) ainsi que d'autres oxydases. Néanmoins, il n'existe pas encore de preuve indéniable de la participation de l'un ou l'autre de ces groupes dans la lignification, même si, dans le cas des peroxydases, plusieurs arguments militent en faveur de leur implication.

Les peroxydases ont une forte affinité pour les précurseurs de la lignine (Leon et al. 2002) ; leur action sur ces substrats aboutit à la formation d'oligomères proches de ceux que l'on retrouve dans la lignine (Fournand et al. 2003). L'activité ou l'expression de gènes de peroxydases est souvent associée à un dépôt de lignine (Ghanati et al. 2002). L' H_2O_2 nécessaire au fonctionnement des peroxydases pourrait être produit en partie par l'autoxydation des monomères de lignine (Pomar et al. 2002) ou par les peroxydases elles-mêmes en présence de NAD(P)H et de Mn^{2+} (Halliwell, 1978). Par contre, les résultats de suppression de l'expression de certains gènes de peroxydases sont contradictoires concernant la lignification (El Mansouri et al. 1999), laissant planer un doute sur leur rôle exact. Il est possible que ces peroxydases n'influent pas sur la quantité de lignine produite mais sur sa structure et sa composition (Elfstrand et al. 2002). Les peroxydases peuvent

être impliquées dans des modifications de la paroi végétale par l'incorporation d'autres composés tels que des flavonoïdes, des hydroxycoumarines, selon un processus physiologique (Buschmann et al. 2000; Dehon et al. 2002) ou en réponse à un stress. Si l'action des peroxydases sur les parois influe sur les phénomènes de croissance et de développement de la plante, cette influence s'explique également par leur implication dans l'équilibre hormonal de la plante. À l'inverse de ces réactions permettant de renforcer la paroi, certains gènes de peroxydases peuvent être impliqués dans l'augmentation de la croissance (Kawaoka et Ebinuma, 1998; Yoshida et al. 2003).

II.3.4.2. Stress abiotiques et peroxydases

Les mécanismes de résistance des plantes aux stress abiotiques sont extrêmement compliqués, cette résistance est quantitativement contrôlée par plusieurs gènes codant l'activité des iso-enzymes. Les isoenzymes sont souvent examinés par rapport au stress environnementaux. Les diverses réponses des enzymes à une variété de facteurs environnementaux peuvent être utiles pour prédire la capacité de survie d'une espèce de plante ou d'une variété aux conditions de stress (Syros et al. 2005). Majourhat et Baaziz (2004) préconisent l'utilisation des peroxydases comme marqueurs pour la caractérisation des ressources génétiques afin d'améliorer la tolérance aux stress biotiques et abiotiques qui entravent le développement de la culture du palmier. D'après Khales et Baaziz (2006) les peroxydases sont fréquemment utilisées comme marqueurs de la résistance aux contraintes. Le stress d'une manière générale perturbe les processus métaboliques où sont impliquées les peroxydases. Ce phénomène est fréquemment rapporté dans la littérature. Jang et al. (2004) ont montré que l'activité des peroxydases dans les cellules végétales est souvent modulée par les stress environnementaux, à la fois biotiques et abiotiques (figure 6).

Liu et al. (2013) indiquent que l'activité supérieure de la SOD, POD, et CAT ont renforcé la capacité de piégeage des ROS et ont contribué à la tolérance accrue des plantes traitées au stress froid. Ces auteurs stipulent aussi que l'activité des peroxydases est plus importante en condition de stress froid qu'en condition normale. Cette augmentation de l'activité peroxydasique sous un régime de basse température améliore nettement la tolérance des plantes à un certain degré, mais cette activité diminue considérablement si le stress dure dans le temps, indiquant ainsi que le froid a une action inhibitrice sur la transcription des ARN réduisant ainsi la synthèse des peroxydases.

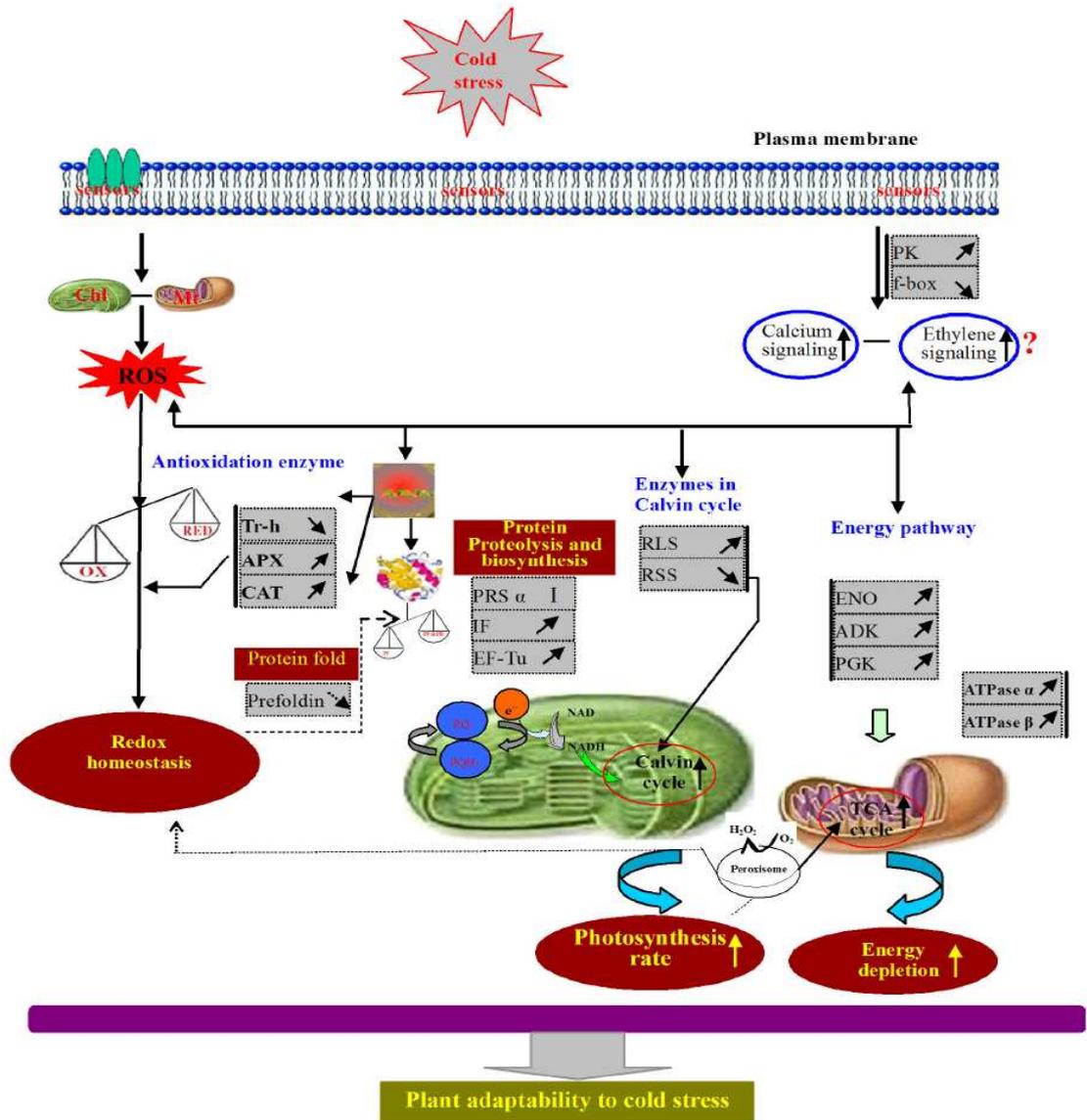


Figure 6. Les différentes enzymes impliqués lors d'un stress froid.

Kang et Saltveit (2001) relatent, d'une manière générale, que deux heures seulement après un stress par basse température de jeunes plants complet de concombre, l'activité de plusieurs enzymes antioxydant examinées (SOD), (CAT), et (POD) est réduite par rapport au témoin. Le froid a plus d'effet sur l'activité des POD par rapport au témoin que pour les autres systèmes.

Les travaux de Zou *et al.* (2007) ont montré, chez *Brassica napus* L., que l'activité des peroxydases, s'accroît sous l'effet de stress froid chez les deux variétés étudiées. Mais

cette augmentation est plus importante chez la variété tolérante que chez la variété sensible.

Ashraf et Harris (2004) et Xiong et Zhu (2002) ont trouvé également que plus l'activité des enzymes est maintenue et augmente sous stress et plus le génotype peut être considéré comme tolérant.

Parvanova et al.(2004) considèrent que la tolérance au stress par le froid est corrélée avec une capacité accrue à éliminer et détoxifier les formes réactives de l'oxygène. Selon Kuk et al.(2003) le mode de protection contre le froid peut-être même spécifique du tissu ; certaines formes d'enzymes anti-oxydants protègent les feuilles alors que d'autres protègent les racines. Les mêmes auteurs (Kuk et al. (2003) montrent aussi que, chez le riz, que l'expression des isoenzymes peroxydasique ainsi que leur l'activité sont significatives sous un régime de basse température. Ils concluent, que les peroxydases sont très importantes dans l'acclimatation et la tolérance au froid.

Jang et al. (2004) ont montré chez la patate douce (*Ipomoea batatas*), que certains gènes de peroxydases sont induits par le stress alors que d'autres ne le sont pas. Ils mettent en évidence l'implication majeure d'un seul gène (Swap4) dont l'expression est fortement induite sous stress parmi l'ensemble des gènes qui déterminent les peroxydases.

Chez le blé, *Triticum aestivum*, des jeunes plantules exposées à un régime de basse température montrent une importante activité des peroxydases chez le cultivar tolérant au froid, alors qu'elle est de moindre importance chez le cultivar sensible (Scebba et al. 1998). Ces auteurs mettent en avant que le cultivar tolérant au froid à une meilleure défense, grâce à cette importante activité, contre la production de ROS sous stress froid. Chez l'orge, Dai et al. (2009) montrent que chez le cultivar tolérant au froid (Mo103) son activité peroxydasique est significativement plus grande que celle du cultivar sensible (Chumai).

Fan et al. (2014) mettent en avant que, chez des plantules de chiendent (*C dactylon*), l'activité des peroxydases est meilleure en condition de régime de basse température qu'en condition normale, et que l'expression des gènes antioxydant, incluant SOD, POD, et APX, est régulée en amont par le stress froid.

Moieni-Korbekandi et al. (2013) en étudiant la réponse au stress froid chez deux cultivars de printemps de colza (*Brassica napus* L.), révèlent qu'il existe une relation linéaire entre l'augmentation de l'activité des peroxydases et la tolérance au froid.

Chez le pois chiche (*Cicer orientum* L.), après une acclimatation au froid, Nazari et al. (2012) rapportent que le génotype tolérant au froid montre une importante activité des peroxydases quand le temps de traitement au froid est assez long.

II. 4. Les estérases(EC 3.1.1.1)

Les estérases ont été les premiers isozymes dont le déterminisme génétique a été analysé (Desborough et Peloquin, 1967). Les estérases cathodiques et les estérases anodiques constituent deux grands groupes. Ce sont des enzymes très variables en fonction des espèces et des populations, et beaucoup plus en fonction des stades de développement (Fyad-Lamèche, 1999). Par exemple, Reyes et al. (1998) avaient détecté un total de 14 bandes réparties en 5 zones d'activité enzymatique en analysant les feuilles de 15 clones de bananier provenant de culture «*in vitro*», ce qui indiquerait que ces bandes pourraient être activées au cours d'autres phases de développement de plante. D'autres systèmes se sont peu à peu développés aussi bien en utilisant les gels de polyacrylamide que les gels d'amidon (Staub et Kuhns, 1979). L'analyse de différents profils d'estérases chez l'espèce *Hydysarum coronarium* (légumineuse) ont permis de révéler l'existence de 13 bandes isoenzymatiques (Trifi-Farah et al. 1989). Il existe chez le maïs (*Zea mais*), des estérases que l'on trouve à tous les stades de développement et d'autres qui sont spécifiques de certains stades de développement.

Le nombre d'allèles identifiés à chaque locus estérase varie de 2 à 9. (Goodman et Stuber, 1983). A notre connaissance, peu de travaux ont fait l'objet de recherche sur la relation entre les stress abiotiques et l'expression isoenzymatique des estérases. L'activité des estérases qui est liée au stade physiologique et métabolique de la cellule, peut être affectée par les facteurs environnementaux tels que la température, le stress hydrique et les agents polluants (Bilkova et al. 1999).

Koretsky (2001) trouve que *Fusariumoxysporum* induit chez le soja, particulièrement à basse température, l'expression des estérases chez les deux variétés (résistante et sensible) mais la réponse est plus forte et plus rapide chez la variété la plus résistante.

Chapitre III- Marqueurs moléculaires

III.1. Généralités

Historiquement, les premiers marqueurs disponibles ont été les marqueurs morphologiques. Chez les légumineuses, la couleur des fleurs chez la luzerne (*Medicago sativa*), le trèfle violet (*Trifolium pratense*) et le lotier corniculé (*Lotus corniculatus*), le nanisme chez la luzerne, le sens d'enroulement des gousses chez *M. truncatula*, les taches foliaires chez le trèfle violet et *M. truncatula* servent de marqueurs. Puis, des marqueurs biochimiques (ou isoenzymes) ont été mis au point. Basés sur des différences de poids moléculaires de protéines ayant une activité enzymatique, ils ont l'avantage d'être codominants et l'inconvénient d'être peu nombreux. Il en existe chez les graminées et les légumineuses, la méthodologie de révélation étant souvent transposable entre espèces proches.

Parmi les marqueurs moléculaires, on distingue les marqueurs pouvant être révélés en grand nombre et les marqueurs spécifiques de locus. Les marqueurs révélés en grand nombre (AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism ; RAPD : Randomly Amplified Polymorphism DNA ; ISSR : Inter Simple Sequence Repeat) ne requièrent pas d'information préalable sur les génomes, sont nombreux mais peu informatifs car dominants et difficilement transposables d'un croisement à un autre ou d'une espèce à une autre. Les marqueurs spécifiques, issus de données de séquences d'ADN (RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism ; microsatellites ou SSR : Simple Sequence Repeats ; STS : Sequence Tagged Site ; SNP : Single Nucleotide Polymorphism), sont révélés individuellement, coûteux à mettre au point mais très informatifs : ils sont généralement codominants et transposables entre croisements et espèces proches (Julier et Barre, 2005).

Les marqueurs moléculaires sont constitués de séquences d'ADN caractéristiques d'un individu ou groupe d'individus. Contrairement aux marqueurs traditionnels (morphologiques et bio-chimiques), ils ne sont pas influencés par l'environnement et sont observables à n'importe quel stade de développement de la plante et sur n'importe quel organe.

Les marqueurs moléculaires, directement issus du polymorphisme existant au niveau de l'ADN, sont désormais utilisés fréquemment pour l'analyse des ressources génétiques et dans les programmes d'amélioration des plantes.

En utilisant des techniques microsatellites basées à la fois sur l'hybridation et la PCR ont été développées et appliquées avec succès pour l'étude du polymorphisme de l'ADN.

Leur utilité a été démontrée pour la préparation de cartes moléculaires, le marquage génétique, la sélection assistée par marqueurs (MAS), le génotypage, l'identification variétale, la conservation du matériel génétique, chez *Lupinus luteus* (Parra Gonzalez et al. 2010) et chez *Triticum turgidum* L. (Chu et al. 2010) etc. (Gupta et Varshney, 2000; Khadari et al. 2007; Baraket et al. 2010). Chez les légumineuses, des marqueurs microsatellites ont été massivement mis au point chez *Medicago truncatula*, espèces modèles des légumineuses, en utilisant des données de séquences produites dans des programmes de séquençage d'EST (fragment de gènes exprimés) ou d'ADN génomique (Julier et al. 2003; Badri et al. 2007; Lazrek et al. 2009).

Chez *Medicago truncatula*, le nombre de marqueurs microsatellites disponibles dépasse le millier (Huguet, 2004). Leurs caractéristiques permettent de les séparer en deux familles. La première est constituée par les marqueurs codominants et révélés individuellement dont les plus courants sont les marqueurs RFLP et microsatellites. La seconde famille est constituée par les marqueurs dominants et révélés «en masse». Ils sont générés par des techniques de type RAPD ou AFLP qui permettent de réaliser facilement des empreintes génétiques. En fonction de leurs caractéristiques propres, génétiques et techniques, les domaines d'application les plus pertinents de chacun (analyse de phylogénie, de structuration de la diversité génétique ou établissement de cartes génétiques) sont proposés.

En biologie végétale, le terme marqueur s'applique à plusieurs concepts, parfois très différents. Il est, par exemple, possible de définir des marqueurs physiologiques et des marqueurs génétiques. Les premiers correspondent à tout type de molécules, facilement repérables, dont la présence renseigne sur un stade de développement ou un état physiologique, situations complexes faisant intervenir de nombreux paramètres en interaction. Les marqueurs génétiques sont, quant à eux, toujours synonymes de locus marqueurs. Un locus marqueur est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte et/ou sur les génotypes des locus voisins. Les marqueurs génétiques sont par définition des caractères héréditaires (Santoni et al. 2000).

III.2. Marqueurs codominants révélés individuellement : Marqueurs microsatellites

Les séquences microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeats) sont constituées de répétitions en tandem de motifs mono, di, tri ou tétra nucléotidiques. Les plus courantes sont (A)_n, (AT)_n, (GA)_n, (GT)_n, (TAT)_n, (GATA)_n, (etc.), la valeur de n pouvant aller de quelques unités à plusieurs dizaines. De tels motifs sont très abondants dans le génome des organismes eucaryotes. Chez les végétaux supérieurs, les premières estimations indiquent qu'il y aurait en moyenne un microsatellite di nucléotidique tous les 30 à 100 kb (Santoni et al. 2000).

III.3. Les microsatellites comme marqueurs de sélection

Beaucoup de travaux ont fait l'objet d'études sur les microsatellites et leurs associations avec des marqueurs morphologiques en relation avec la tolérance et l'adaptation à divers stress biotiques (Buhariwalla et al. 2005; Badri et al. 2007; Lazrek et al. 2009; Avia et al. 2013).

Dans les milieux naturels, la distribution spatiale des individus au sein des populations dépend souvent des facteurs environnementaux qui affectent l'établissement des jeunes plantes, telles que la température, la pluviométrie, la longueur croissante des saisons et des changements dans la durée des journées en fonction des latitudes (Prosperi et al. 2006). Pendant longtemps, les caractères morphologiques et biochimiques ont été les seuls outils disponibles pour caractériser des populations pour leur adaptation locale. Cependant, ces derniers sont souvent influencés par l'environnement.

Les marqueurs microsatellites, s'affranchissant de cette contrainte, sont souvent utilisés en association avec les caractères phénologiques pour caractériser les populations et leur adaptation aux milieux. Des études suggèrent des corrélations entre les locus marqueurs (de types SSR) et les facteurs éco-géographiques (Badri et al. 2007; Dias et al. 2008; Zeng et al. 2009; Sharma et al. 2010; Bagavathianan et al. 2010; Zaccardelli et al. 2012; Cui et al. 2013 ; Avia et al. 2013).

Avia et al. (2013) montrent, chez des lignées recombinantes de *M. truncatula*, dérivées de croisements entre deux accessions acclimatées à basse température et évaluées pour leur tolérance au froid par des caractères morphologiques, que les QTL pour la tolérance au froid à effet additif sont associés avec ces marqueurs (Mtic-131, Mtic-432, Mtic-079) situés au niveau des groupes de liaison LG1, LG4 et LG6. Ces allèles favorables pour ces

effets additifs de tolérance au froid, sont portés par les deux parents, suggérant que ces écotypes ayant une bonne capacité d'acclimatation au froid, contribuent efficacement à une bonne tolérance au gel. Ces auteurs montrent qu'il existe une relation entre l'origine géographique des populations de *M. truncatula* et leur tolérance au froid. La majorité des populations originaires de haute altitude se sont révélées plus tolérantes au froid que celles originaires de basse altitude.

Badri et al. (2007) montrent, dans une étude de diversité génétique, chez *Medicago ciliaris*, à l'aide de marqueurs morphologiques et locus marqueurs SSR, que la divergence des populations détectée est due à l'adaptation locale *via* les interactions génotypes/facteurs éco-géographiques (texture du sol, altitude et climat), et que les populations de cette espèce ont une grande plasticité d'adaptation à des environnements très variés.

Cui et al. (2013) trouvent qu'il existe une association positive entre des caractères morphologiques et les marqueurs SSR en relation avec l'origine des populations et leur tolérance au froid.

Lazerek et al. (2009) trouvent que, chez des populations annuelles de *M. truncatula*, sept microsatellites sur dix-huit utilisés avaient une corrélation avec l'altitude, la pluviométrie et la salinité de l'environnement d'origine de ces populations. Ces auteurs suggèrent aussi que ces locus marqueurs sont liés à des gènes impliqués dans l'adaptation à l'altitude.

Dias et al. (2008) ont souligné certaines concordances entre les caractères morphologiques et les marqueurs SSR, chez le trèfle rouge (*Trifolium pratense* L.).

Badri et al. (2008) étudiant la variabilité génétique chez des populations naturelles de *Medicago laciniata* Mill. (Fabaceae), trouvent que la diversité morphologique et la diversité moléculaire sont associées significativement avec les facteurs éco-géographiques.

Touil et al. (2008), en étudiant la diversité génétique, chez des populations cultivées de *Medicago sativa* L., montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre marqueurs SSR et l'origine géographique des populations. Cependant, ces auteurs mettent en avant que les marqueurs SSR sont très informatifs et appropriés dans les approches de caractérisation et de polymorphisme moléculaire chez les populations de *Medicago*.

Bagavathiannan et al. (2010) en investiguant la diversité génétique, de certaines populations de luzerne naturelles et cultivées, ne trouvent pas de corrélations entre les variables phénotypiques et les marqueurs SSR utilisés.

Bajaracharya et al. (2006) montrent qu'il n'y a pas d'association entre caractère morphologique et SSR analysés, chez des populations de riz au Népal se trouvant à haute altitude.

Chapitre IV- Matériel et Méthodes

IV.1. Matériel végétal

16 écotypes appartenant à quatre espèces annuelles de *Medicago* (*M. aculeata* Willd., *M. polymorpha* L., *M. truncatula* Gaertn. et *M. ciliaris* Krock.), fournis par la Station Expérimentale de l'ITGC-Khroub Constantine, ont fait l'objet de cette étude. L'espèce *M. aculeata* est représentée par quatre cultivars dont un cultivar syrien Acu 80 et trois cultivars australiens Acu 15 678, Acu 15679 et Acu 14821, mis en observations par l'ITGC dans le cadre des échanges de pépinières entre l'Algérie et l'Australie. Ces "cultivars" sont issus à l'origine de populations algériennes, typiques des zones d'altitudes (Tiaret et Médéa) et tolérants aux températures basses extrêmes (Zeghida, communication personnelle). Le cultivar syrien Acu 80 est souvent utilisé comme témoin pour sa bonne tolérance au froid. Les écotypes de *M. truncatula*, *M. ciliaris* et *M. polymorpha* proviennent de différentes régions d'Algérie de différentes altitudes (Tableau 1).

IV.2. Méthodes

Pour l'analyse biométrique, le phénotypage a été réalisé sur les 16 écotypes. Les mesures de la longueur des tiges et des racines, ainsi que de la longueur totale des jeunes plantes sous traitement et en absence de traitement ont été enregistrées afin d'évaluer la variabilité de la tolérance chez ces populations. 12 de ces populations ont fait l'objet d'une caractérisation génétique à l'aide de 14 microsatellites SSR. Mercedes, Gabes, Jemalong et Magali ont été utilisés comme témoins dans l'étude (Tableau 2). L'analyse biochimique par électrophorèse a été réalisée sur deux génotypes par espèce (Tableau 3). Le traitement par basse température est appliqué comme dans le cas de l'étude biométrique. Les prélèvements sont effectués à la fin de chaque traitement sur les lots témoins et les lots traités correspondants, c'est-à-dire 5, 8 ou bien 11 jours après le début du traitement par le froid.

IV.3. Mise en culture et dispositif expérimental

L'ensemble de l'essai a porté sur un total de 4800 individus. Pour chaque génotype, par répétition et pour chaque traitement, 10 graines sont mises à germer en boîtes de Petri remplies de terreau après une désinfection à éthanol (70°) suivie de rinçage à l'eau distillée. Après germination, les lots traités subissent l'un des trois traitements (T1, T2, T3) correspondant à 5, 8 et 11 jours de traitement par basse température (4°C) (photopériode 16 h, intensité lumineuse 6700 lux), alors que les témoins de référence (T01, T02, T03) sont

incubés à 23 °C (photopériode 16 h, intensité lumineuse 6700 lux). Les observations sont effectuées le 8^{ème}, le 11^{ème} et le 14^{ème} jour, soit à la fin de la culture respectivement pour les traitements T01 et T1, T02 et T2, T03 et T3. Cinq répétitions ont été réalisées.

IV.3.1. Mesures

La longueur totale des jeunes plantes (LP), de la tige (LT) et de la racine (LR) ont été mesurées à la fin de chaque traitement sur les lots témoins et traités au moyen d'une règle graduée.

IV.3.2. Traitement statistique des données.

Les valeurs moyennes, et les écarts-types par traitement et par génotype ont été calculés sur l'ensemble de l'essai et ont servi aux estimations des différents indices de tolérance. Une ANOVA est effectuée avec Statistica (ver. 6.1 Stat Soft, Inc. France), sur les 3 variables, longueur totale de la plante (LTTL), la longueur de la tige (LTGE), et la longueur de la racine (LRCNE) au moyen du test Fisher-Snedecor au seuil $\alpha = 5\%$.

IV.4. Extraction de l'ADN

L'ADN total de douze populations est extrait à partir de 200 mg de matière fraîche d'échantillons de jeunes feuilles, en présence de l'azote liquide et 3 ml de tampon CTAB (Doyle and Doyle, 1990). L'ADN extrait fait l'objet d'une amplification par PCR à l'aide de quatorze paires d'amorces microsatellites. Les ADN des cultivars témoins Magali, Mercedes, Jemalong et Gabès a été extrait selon la méthode décrite par Cheung et al. (1993) à l'INRA, Lusignan France. Les produits de PCR ont été séparés en utilisant un gel de polyacrylamide à 6,5% dans un séquenceur d'ADN automatisé le LI-COR IR² (LI-COR Inc.) et les images de gels ont été analysées à l'aide du logiciel GENEPROFILER software (Scanalytics, Inc.) à l'INRA, Lusignan France. Pour chaque locus et pour les douze populations ayant fait l'objet de la caractérisation, différents paramètres ont été calculés, à l'aide du logiciel Genetix (Version 5.0.4): $H_{exp.}$ = H calculée avec biais pour chaque pop, $H_{nb.}$ = H calculée sans biais (Nei 1978). $H_{obs.}$ = H observée, ainsi que les fréquences alléliques et les taux d'homozygotie et d'hétérozygotie, pour chaque population au niveau de chaque locus marqueur. L'effectif total pour chaque population est de cinq individus.

Tableau 1. Populations analysées pour la tolérance au froid à l'aide de caractères morphologiques et la caractérisation par microsatellites. Les cultivars : Mercedes, Gabes, Jemalong et Magali utilisés comme témoins dans la caractérisation moléculaire.

Espèces	Populations	Origine	Latitude	Longitude	Altitude (m)
<i>M. aculeata</i> Willd.	cv. Ac 15678	Australie	-	-	-
	cv. Ac 15679	Australie	-	-	-
	cv. Ac 14821	Australie	-	-	-
	cv. Ac 80	Syria	-	-	-
<i>M. ciliaris</i> Krocker.	Cil 123	Algérie	36°46'02''N	8° 18' 9.57'' E	16
	Cil 124	Algérie	36°17'15'' N	7° 57' 14.77'' E	565
	Cil 125	Algérie	36°17'15''N	7° 57' 14.77'' E	565
	Cil 126	Algérie	36° 28' 0'' N	7° 26' 0'' E	290
<i>M. polymorpha</i> L.	Poly 57*	Algérie	36°17'15''N	7° 57' 14.77'' E	565
	Poly 54	Algérie	36°17'15''N	7° 57' 14.77'' E	565
	Poly 136	Algérie	36°49'0'' N	5° 46' 0'' E	10
	Poly 213*	Algérie	35°23'17''N	1° 19' 22'' E	1170
	Poly 42	Algérie	36°54'15''N	7°45'07''E	200
<i>M. truncatula</i> Gaertn.	Tru 210	Algérie	34°6' 50'' N	2° 5' 50.14'' E	1150
	Tru 216	Algérie	34° 6' 50'' N	2° 5' 50.14'' E	1150
	Tru 62	Algérie	36° 28' 0'' N	7° 26' 0'' E	290
	Tru 26	Algérie	35° 23' 17'' N	1° 19' 22.16'' E	1170
<i>M. sativa</i>	cv. Magali	France	-	-	-
	cv. Mercedes	France	-	-	-
	cv. Gabes	France	-	-	-
	cv. Jemalong	France	-	-	-

* : Populations retenues pour l'analyse de l'activité des estérases au sein de l'espèce *M. polymorpha*.

Tableau 2. Caractéristiques des SSR utilisés (INRA-Lusignan France).
 LG : groupe de liaison. *T_m* : température d'hybridation.

<i>Amorces</i>	<i>LG</i>	<i>Motifs</i>	<i>Primers</i>	<i>T_m °C</i>	<i>Taille attendu (pb)</i>
ATP 456	3	[TTC] ₈	L-GGGTTTTTGATCCAGATCTT R-AAGGTGGTCATACGAGCTCC	55	125
FMT-13	1	[GA] ₂	L-GATGAGAAAATGAAAAGAAC R-CAAAAACACTACTCTAACACAC	50	132
MTIC-79	5	[TC] ₁₀	L-AAAATCCAAAGCCCTATCACA R-AGCGTGAGATTTTTCCATCG	55	117
MTIC- 332	4	[CTT] ₈	L-CCCTGGGTTTTTGATCCAG R-GGTCATACGAGCTCCTCCAT	55	124
MTIC- 338	3	[CTT] ₅	L-TCCCCCTTAAGCTTCACTCTTTTC R-CATTGGTGGACGAGGTCTCT	55	146
MTIC- 134	6	[AG] ₉	L-GCAGTTCGCTGAGGACTTG R-CAATTAGAGTCTACAGCAGCCAAAAACT	60	176
MTIC- 365	2	[AG] ₆	L-ATCGGCGTCTCAGATTGATT R-CGCCATATCCAAATCCAAAT	55	123
MTIC- 082	7	[TC] ₁₁	L-CACTTCCACACTCAAACCA R-GAGAGGATTTCCGGTGATGT	55	132
MTIC- 451	2	[TC] ₁₁	L-GGACAAAATTGGAAGAAAAA R-AATTACGTTTGTGGATGC	55	129
MTIC- 135	8	[AG] ₁₀	L-GCTGACTGGACGGATCTGAG R-CCAAAGCATAAGCATTCA	55	123
MTIC- 343	6	[GAA] ₈	L-TCCGATCTTGCGTCCTAACT R-CCATTGCGGTGGCTACTCT	55	134
MTIC- 131	3	[AG] ₇	L-AAGCTGTATTCTGATAACC R-CGGGTATTCTCTTCTCCTCCA	55	163
MTIC- 432	7	[AG] ₅	L-TGGAATTTGGGATATAGGAA R-GGCCATAAGAACTTCCACTT	55	163
B14B03	5	[CA] ₉	L-GCTTGTCTTCTTCAAGCTC R-ACCTGACTTGTGTTTTATGC	55	151

IV.5. Electrophorèse des peroxydases (EC 1.11.1.7) (POD)

IV.5.1. Extraction des peroxydases

Les plantes entières sont broyées dans de l'azote liquide puis homogénéisées dans du tampon 10 mM Tris-KCl (pH 6.8) et 1 mM PMSF (Syros et al. 2004) modifié. Le broyat est centrifugé deux fois à 14 000tr/ mn pendant 20 mn à 4 °C, les surnageants récoltés sont placés immédiatement dans un cryo-conservateur à -196°C jusqu'à utilisation. Un volume 30 µl d'extrait enzymatique par génotype et par traitement sert de dépôt.

L'expression des izoenzymes peroxydasique est déterminée par électrophorèse sur gel gradient (4-10%) de polyacrylamide, dans une cuve verticale (Hoeffer). Le tampon du gel correspond à un tampon 0,89 M Tris-borate et 0,025 M EDTA (pH 8.3). Un tampon 25 M Tris-Glycine (pH 8.6) dilué 10 fois est utilisé pour la migration (Fyad-Lameche 1999). La migration a lieu à 4 °C sous une tension de 150 V et une intensité de 30 mA pendant 24 h.

La révélation des peroxydases s'effectue dans du tampon 0.2 M acétate de Na (pH 4.6) avec de l'O-dianizidine, dissous dans l'alcool, comme substrat. Le mélange est ensuite additionné de 2 ml d'H₂O₂ (Vallejos 1983). Chaque expérience est répétée trois fois.

L'extraction des témoins est effectuée à partir de jeunes plantules issues de germination âgées de 2, 4, 6, 8, 10, 11, 12 et 14 jours pour les lots (témoins) et le 8^e, le 11^e et le 14^e jour pour les lots traités.

IV.5.2. Dosage des peroxydases

En ce qui concerne cette partie, l'activité des peroxydases a été réalisée chez des populations extrêmes (Tolérantes ou sensibles) appartenant aux différentes espèces étudiées. Au totale 8 populations ont été étudiées (Tableau 3). L'activité des peroxydases est suivie tous les deux jours chez les témoins et chez les plantes traitées sous un régime de basse température au niveau des plantes traitée pendant 5, 8, et 11 jours de traitement au froid (4 °C). L'activité des POD (EC.1.11.1.7) est déterminée selon le protocole décrit par Macadam et al. (1992) modifié par le suivie du changement de l'absorbance à 460 nm à l'oxydation de l'o-dianizidine en présence de H₂O₂ et d'extrait enzymatique. A 10 µl d'extrait enzymatique est ajoutée le mélange réactionnel constitué de l'o-dianizidine à 5% et d'acétate de sodium pH 4.6. La réaction débute dès l'addition de 100 µl H₂O₂ à 30% au mélange réactionnel pour un volume final de 3 ml. L'activité enzymatique est suivie en fonction du temps, pendant toutes les 15 secondes, pendant 3 minutes pour les lots traités et les lots témoins, à l'aide d'un spectrophotomètre (UK- JENWAY 7305) par mesure de l'absorbance à 460 nm. L'activité enzymatique est exprimée en µmol d'o-dianizidine oxydé min⁻¹.g⁻¹MF., en utilisant la valeur

de coefficient d'extinction de l'o-dianizidine. Chaque expérience (quantitative et qualitative) est répétée 3 fois.

Table 3. Populations analysées pour l'activité peroxydasique et l'expression izoenzymatique des peroxydases et des estérases sous un régime de basse température.

<i>Espèces</i>	<i>accessions</i>	<i>Origine</i>	<i>Latitude</i>	<i>Longitude</i>
<i>M. aculeata</i> Willd.	cv. Ac 15679	Australia (S)*	unknown	unknown
	cv. Ac 80	Syria (T)	unknown	unknown
<i>M. ciliaris</i> Krocke.	Cil 123	Algeria (S)	36°46'02''N	8° 18' 9.57'' E
	Cil 124	Algeria (T)	36°17'15'' N	7° 57' 14.77'' E
<i>M. polymorpha</i> L.	Poly 57	Algeria (S)	36°17'15''N	7° 57' 14.77'' E
	Poly 136	Algeria (T)	36°49'0'' N	5° 46' 0'' E
<i>M. truncatula</i> Gaertn.	Tru 26	Algeria (S)	35° 23' 17'' N	1° 19' 22.16'' E
	Tru 210	Algeria (T)	34°6' 50'' N	2° 5' 50.14'' E

*: (S): Sensible, (T): Tolerant

IV.6. Electrophorèse des estérases (EC 3.1.1.1) (EST)

IV.6.1. Extraction des estérases

Pour l'extraction des estérases des lots témoins et des lots traités, les plantules sont broyées dans un mortier en présence d'azote liquide et homogénéisées dans du tampon 10 mM Tris-KCl (pH 6.8) et 1 mM PMSF (Syros et al. 2004) modifié. Le broyat est centrifugé à 14 000 trs/ mn pendant 20 mn à 4 °C, deux fois. Les surnageants récoltés sont placés dans un cryo-conservateur à -196°C jusqu'à utilisation. Un volume de 30 µl d'extrait enzymatique par génotype et par traitement est utilisé pour chaque dépôt.

IV.6.2. Séparation des estérases

Dans cette partie, les mêmes extrêmes ont l'objet d'une étude sur le système estérase mais seulement une analyse sur l'expression izoenzymatique pour ce système enzymatique des jeunes plantules traitées au froid en comparaison avec leurs témoins respectifs. La séparation des estérases est réalisée par électrophorèse sur gel discontinu de polyacrylamide dans une cuve verticale (Hoeffer). Le gel de concentration est à 4% et le gel de séparation est à 8% d'acrylamide, dans un tampon 0,89 M Tris-borate, 0,025 M EDTA (pH 8.3). Un tampon 25 M Tris-Glycine (pH 8.6) dilué 10 fois est utilisé pour la migration (Fyad-Lamèche, 1999). La

migration a lieu à 4 °C sous une tension de 150 V et une intensité de 30 mA, elle est arrêtée quand le bleu de bromophénol marquant le front de migration atteint le bord de la plaque. Après migration les estérases sont mises en évidence par une coloration au Fast-Blue RR- Salt. L'α-naphtyle acétate (1%) dilué dans de l'acétone sert de substrat dans un tampon 0.1M Na₂HPO₄ (pH 6.2) (Vallejos, 1983).

La lecture des gels des peroxydases et des estérases a été effectuée à l'aide de Gel Analyzer Software, Copyright 2010 (Istvan Lazar and Dr. Istvan Lazar).

Chapitre V- Résultats et Interprétations

V.1. Variabilité de tolérance au froid des jeunes plantes sous un régime de basse température

L'analyse de la variance a révélé des différences hautement significative ($p \leq 0.001$) parmi les populations étudiées pour les différents caractères mesurés (Longueur totale du jeune plant, longueur de la tige et longueur de la racine) et pour les différentes variables calculées, écotypes, traitement et leur interaction (Tableau 4. a, b, et c).

Tableau 4. Analyse de variance des différents paramètres morphologiques étudiés

(a) Longueur totale

Source de variation	ddl	CM	F
Ecotypes	15	731.95	12.95***
Traitements	5	3965.74	70.14***
Ecotype*traitement	75	113.05	1.99***
Erreur	4705	56.54	

(b) Longueur tige

Source de variation	ddl	CM	F
Ecotypes	15	134.04	8.15***
Traitements	5	1214.55	73.83***
Ecotype*traitement	75	30.57	1.86***
Erreur	4705	16.45	

(c) Longueur racine

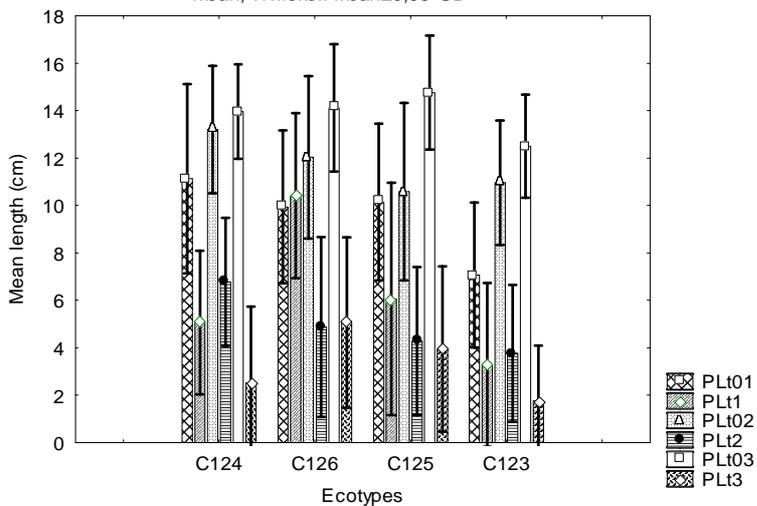
Source de variation	ddl	CM	F
Ecotype	15	267.61	18.96***
Traitements	5	798.75	56.62***
Ecotype*traitement	75	33.59	2.38***
Erreur	4705	14.11	

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$; F: test fisher-senedecor; CM: carrés moyens

L'exposition à un régime de basse température à différentes durées, montre une différentielle de réponse pour les quatre espèces étudiées (tableau 4). Chez ces espèces, la réponse diffère d'un organe à un autre, la réduction de la longueur de la plante, de la tige et de la racine est observée, cette réduction est plus importante après une durée de traitement de 11 jours. Au niveau de chaque espèce, les résultats révèlent une grande variabilité pour la croissance sous régime de basse température (Figures 7, 8, 9 et 10).

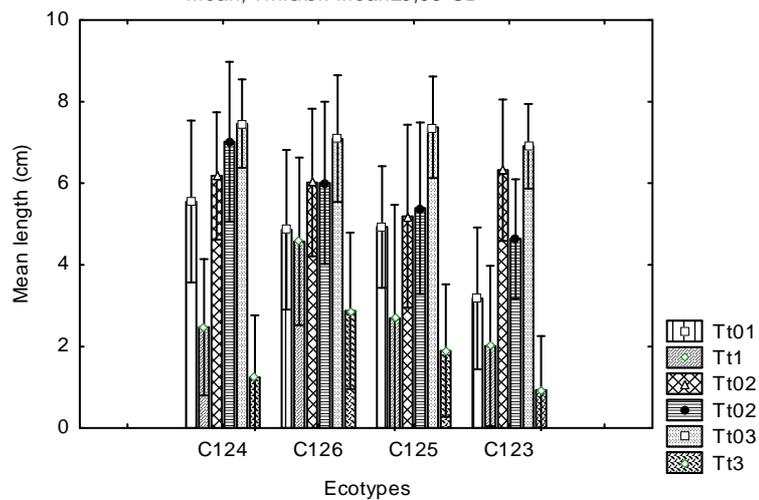
a. Average lengths of seedling of treated and control

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD



b. Average length of stems treated and control

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD



c. Average length of roots treated and control

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD

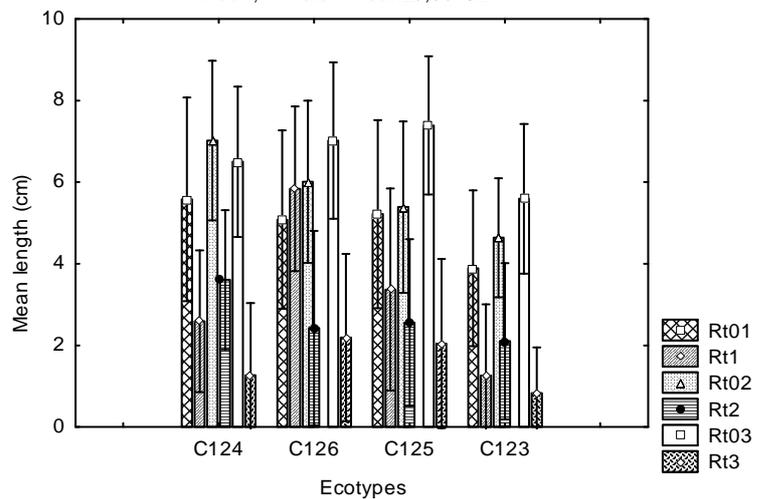
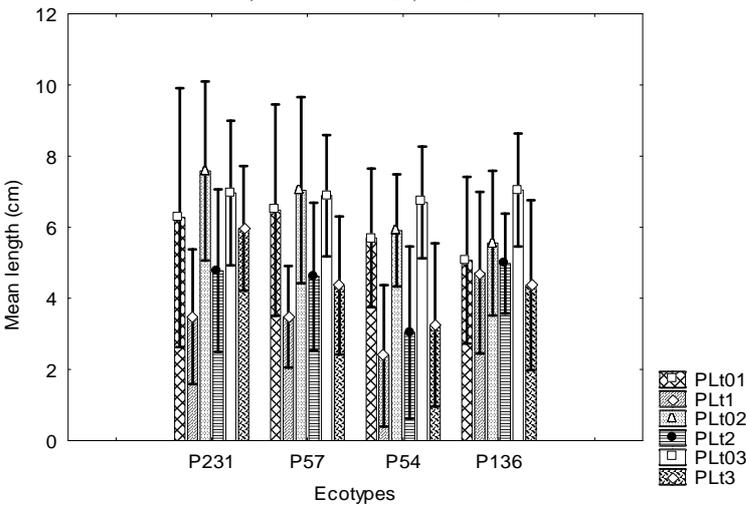


Figure 7. Effet d'un stress par basse température en fonction des différents traitements, chez les différentes populations de *M. ciliaris*, et le contrôle, a: plantule, b: tige, et c: racines.

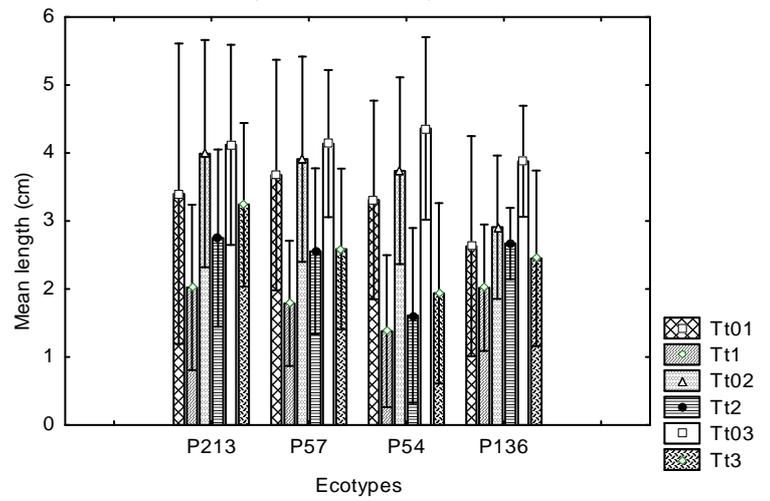
a. Average lengths of seedling treated and control.

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD



b. Average length of stems treated and control

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD



c. Average length of roots treated and control.

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD

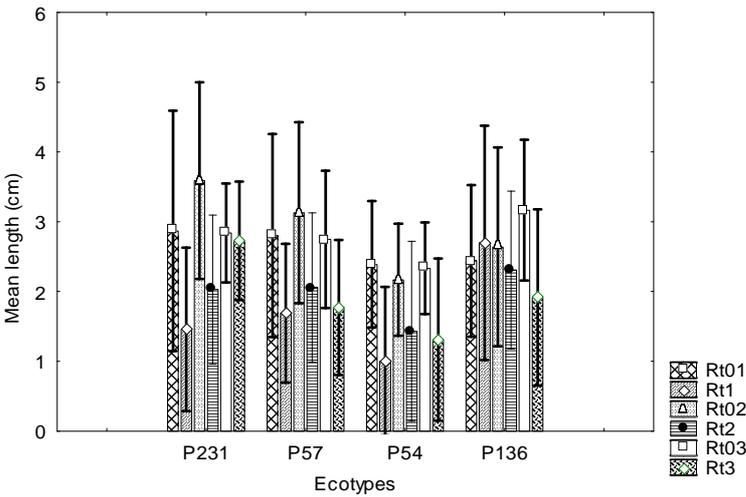
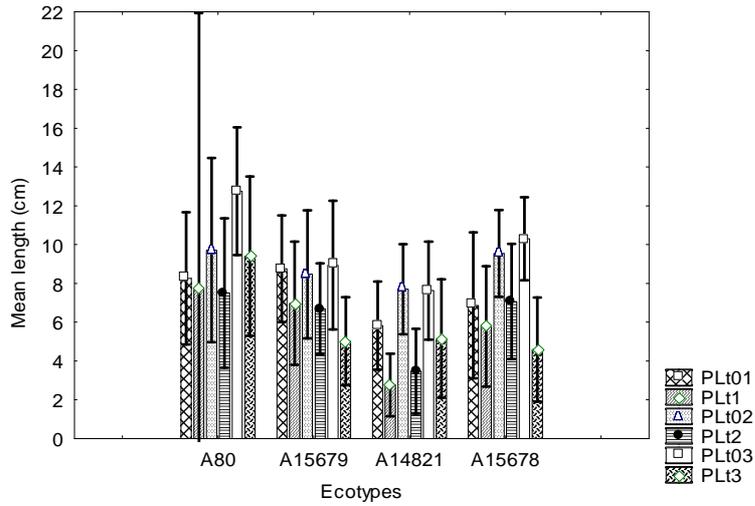


Figure 8. Effet d'un stress par basse température en fonction des différents traitements, chez les différentes populations de *M. polymorpha*, et le contrôle, a: plantule, b: tige, et c: racines.

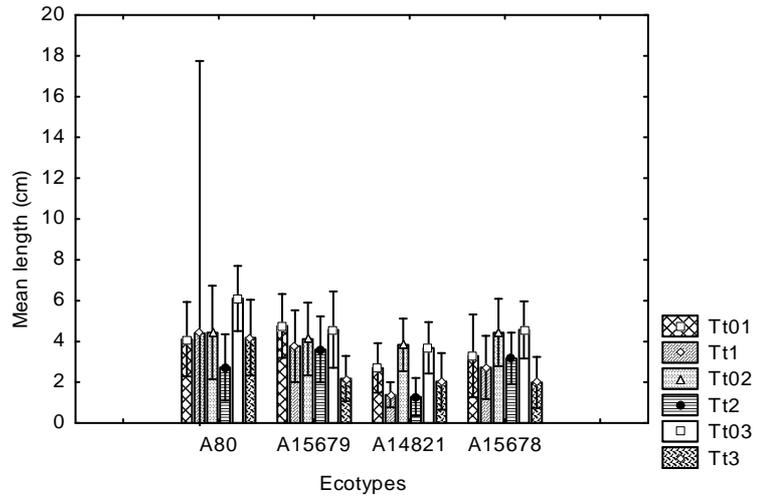
a. Average lengths of seedling of treated and control

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD



b. Average length of stems treated and control

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD



c. Average length of roots treated and control

Mean; Whisker: Mean \pm 0,95*SD

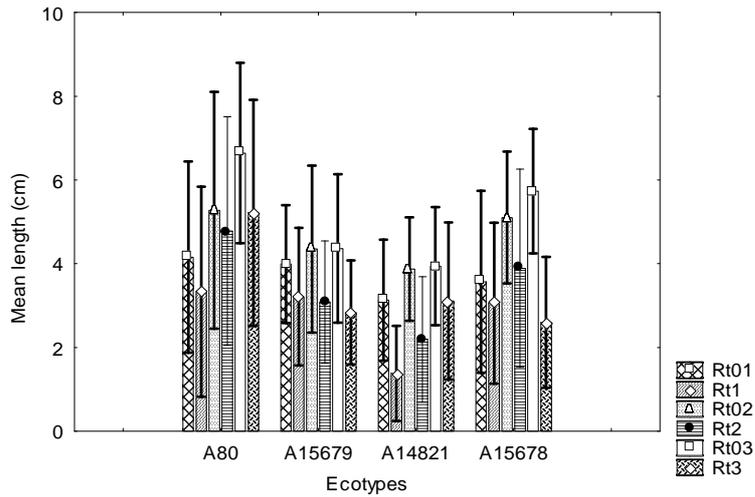
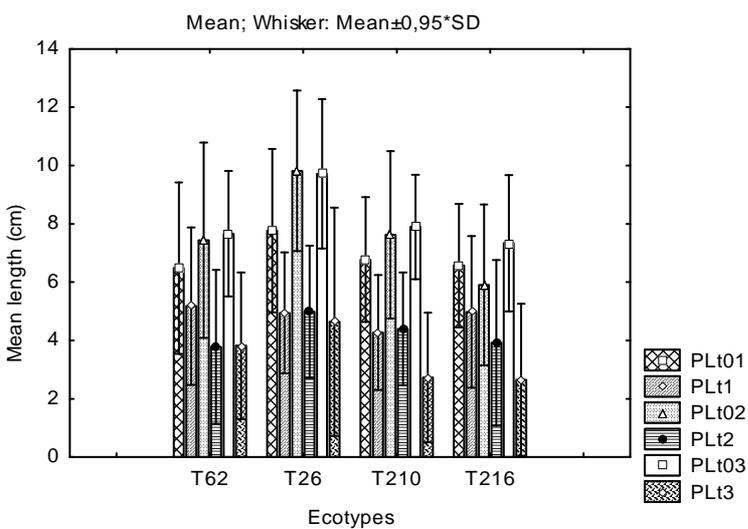
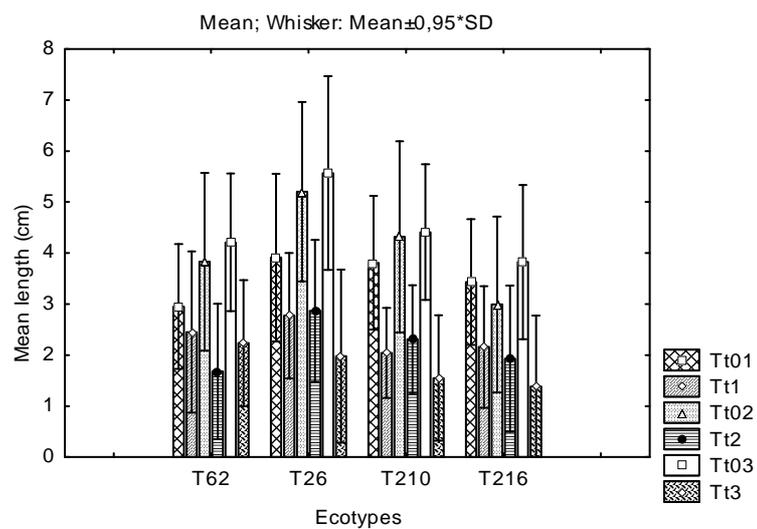


Figure 9. Effet d'un stress par basse température en fonction des différents traitements, chez les différentes populations de *M. aculeata*, et le contrôle, a: plantule, b: tige, et c: racines.

a. Average lengths of seedling of treated and control.



b. Average length of stems treated and control



c. Average length of roots treated and control

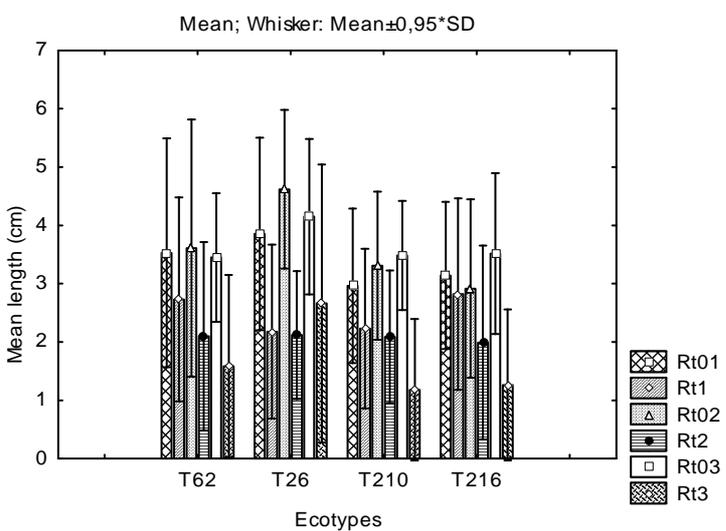


Figure 10. Effet d'un stress par basse température en fonction des différents traitements, chez les différentes populations de *M. truncatula*, et le contrôle, a: plantule, b: tige, et c: racines.

Tableau 5. Moyenne des différents caractères mesurés sous les différents traitements pour les quatre espèces de *Medicago* étudiées.

<i>Espèces</i>	<i>Traitements</i>	<i>LTTL</i>	<i>LT GE</i>	<i>LRCNE</i>
		<i>Moyenne ± Std. Dev</i>	<i>Moyenne ± Std. Dev</i>	<i>Moyenne ± Std. Dev</i>
<i>M. truncatula</i>	T01	6,89 ± 2.69	3.52 ± 1.47	3.37 ± 1.68
	T1	4,84 ± 2.49	2.35 ± 1.33	2.48 ± 1.67
	T02	7,70 ± 7.70	4.08 ± 2.02	3.61 ± 1.82
	T2	4,32 ± 2.58	2.19 ± 1.44	2.07 ± 1.47
	T03	8,15 ± 2.51	4.50 ± 1.73	3.64 ± 1.28
	T3	3,46 ± 3.13	1.79 ± 1.50	1.67 ± 1.85
<i>M. ciliaris</i>	T01	9.57 ± 3.87	4.62 ± 2.08	4.94 ± 2.41
	T1	6.20 ± 4.74	2.93 ± 2.45	3.26 ± 2.68
	T02	11.69 ± 3.45	5.92 ± 1.98	5.76 ± 2.15
	T2	4.92 ± 3.49	2.25 ± 1.54	2.67 ± 2.19
	T03	13.83 ± 2.57	7.20 ± 1.32	6.62 ± 2.02
	T3	3.32 ± 3.57	1.73 ± 1.83	1.58 ± 1.95
<i>M. polymorpha</i>	T01	5.88 ± 2.97	3.25 ± 1.88	2.62 ± 1.40
	T1	3.51 ± 2.16	1.80 ± 1.13	1.71 ± 1.45
	T02	6.52 ± 2.46	3.63 ± 1.54	2.88 ± 1.41
	T2	4.35 ± 2.30	2.30 ± 2.39	1.95 ± 1.23
	T03	6.89 ± 1.81	4.12 ± 1.26	4.12 ± 1.26
	T3	4.48 ± 2.40	2.55 ± 1.38	2.55 ± 1.38
<i>M. aculeata</i>	T01	7.42 ± 3.43	3.71 ± 1.92	3.71 ± 1.99
	T1	5.81 ± 8.04	2.58 ± 1.72	2.74 ± 2.10
	T02	8.85 ± 3.55	4.20 ± 1.88	4.64 ± 2.16
	T2	6.18 ± 3.43	2.69 ± 1.69	3.48 ± 2.38
	T03	9.90 ± 3.54	4.73 ± 1.83	5.16 ± 2.10
	T3	6.04 ± 3.78	2.60 ± 1.75	3.43 ± 2.26

La tolérance au froid a été évaluée chez les 16 écotypes à la suite d'un stress par une basse température de 4°C, appliqué pendant 5, 8 et 11 jours. Le degré de tolérance est déterminé par écotype sous chaque traitement au moyen des Ratios : racine : tige RT1/TT1, RT2/TT2, et RT3/TT3 (Tableaux 27, 28, et 29(voir annexe)). Dans la littérature, il est souvent rapporté qu'il existe une étroite relation entre la tolérance au froid et au gel, et la capacité de s'acclimater aux basses températures non gélives. Le degré d'acclimatation est souvent estimé par le ratio racine/tige des plantes traitées au froid en comparaison avec les plantes non traitées (témoins). Les plantes affichant les meilleurs ratios sont dites tolérantes au froid(i.e. elles ont une capacité supérieure d'acclimatation), alors que les plantes dont les ratios sont faibles, elles sont considérées sensibles au froid (donc un pouvoir d'acclimatation plus faible)(Hekneby et al. 2001; Thapa et al. 2008; Hund et al. 2008; Janska et al. 2010).

Les résultats montrent que les populations originaires de site de haute altitude montrent des ratios plus importants en comparaison avec ceux originaire de site de basse altitude. D'autre part le régime de basse température T3 est plus efficace pour mettre en évidence le degré d'acclimatation des différentes populations étudiées, en particulier chez *M. truncatula* et *M. polymorpha* accessions.

Chez *M. truncatula*, Tru 216, originaire d'une altitude de 1150 m (Table 1), montre de meilleurs ratios (1.20) en comparaison avec Tru 62 (0.69).

La même tendance est observée au niveau de l'espèce *M. polymorpha*, la population Poly213, originaire d'une altitude de 1170 m, montre un ratio de 0.93 alors que la population Poly 57 originaire d'une altitude de 565 m exhibe un faible ratio (0.27).

Chez l'espèce *Medicago aculeata*, il est à rappeler qu'en ce qui concerne les origines exactes des populations de cette espèce ne sont pas connues. L'écotype Ac 80 affiche des ratios plus importants lors des différentes durées d'acclimations avec des valeurs de 1.63, 2.31, et 1.40 en comparaison avec ceux de l'écotype Ac 15679, 0.82, 1.10, et 1.30 pour T1, T2, et T3 respectivement (figures 11, 12, et 13).

Il apparaît clairement que les populations originaires de haute altitude présentent de meilleurs ratios et ont une capacité d'acclimatation supérieure.

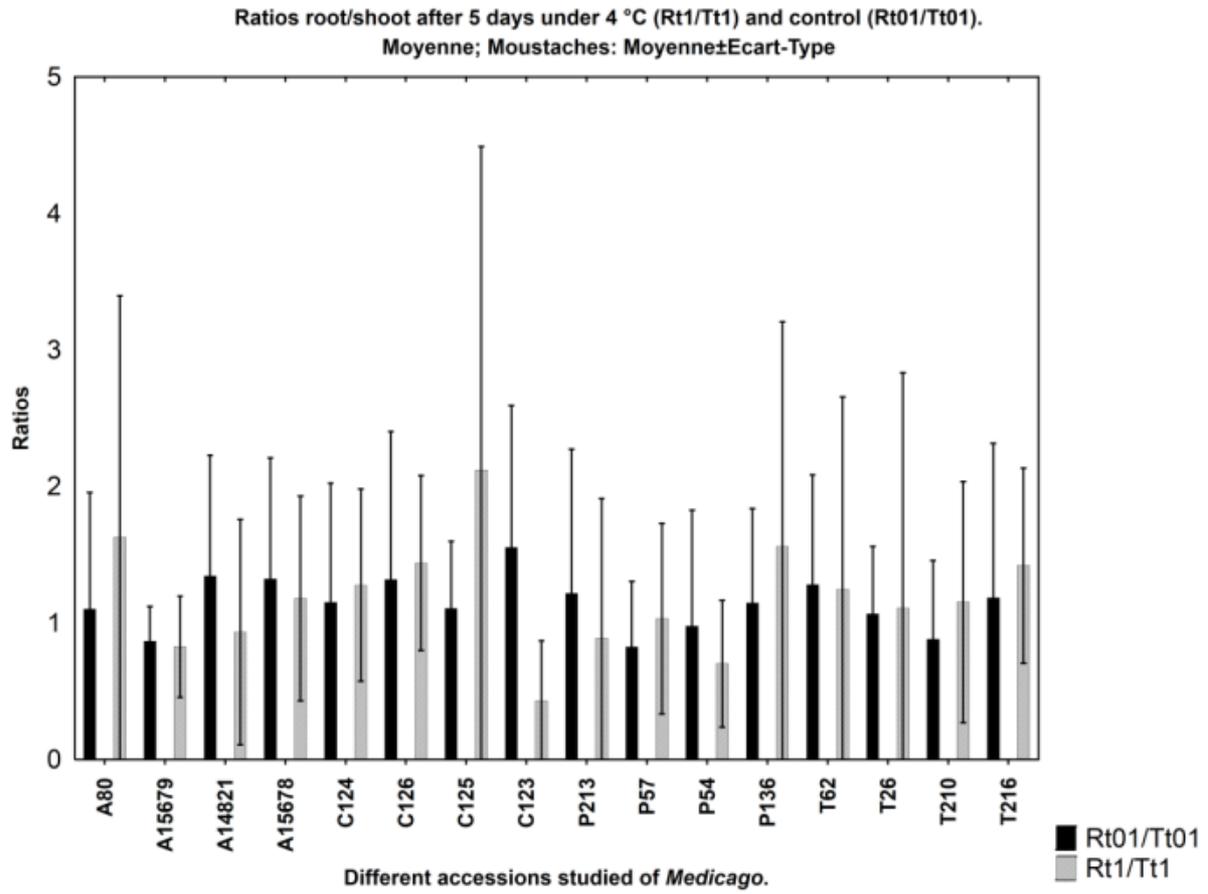


Figure 11. Ratios racine/tige après 5 jours d’acclimation à 4 °C (Rt1/Tt1) et le control (Rt01/Tt01), pour les différents écotypes étudiés de *Medicago*.

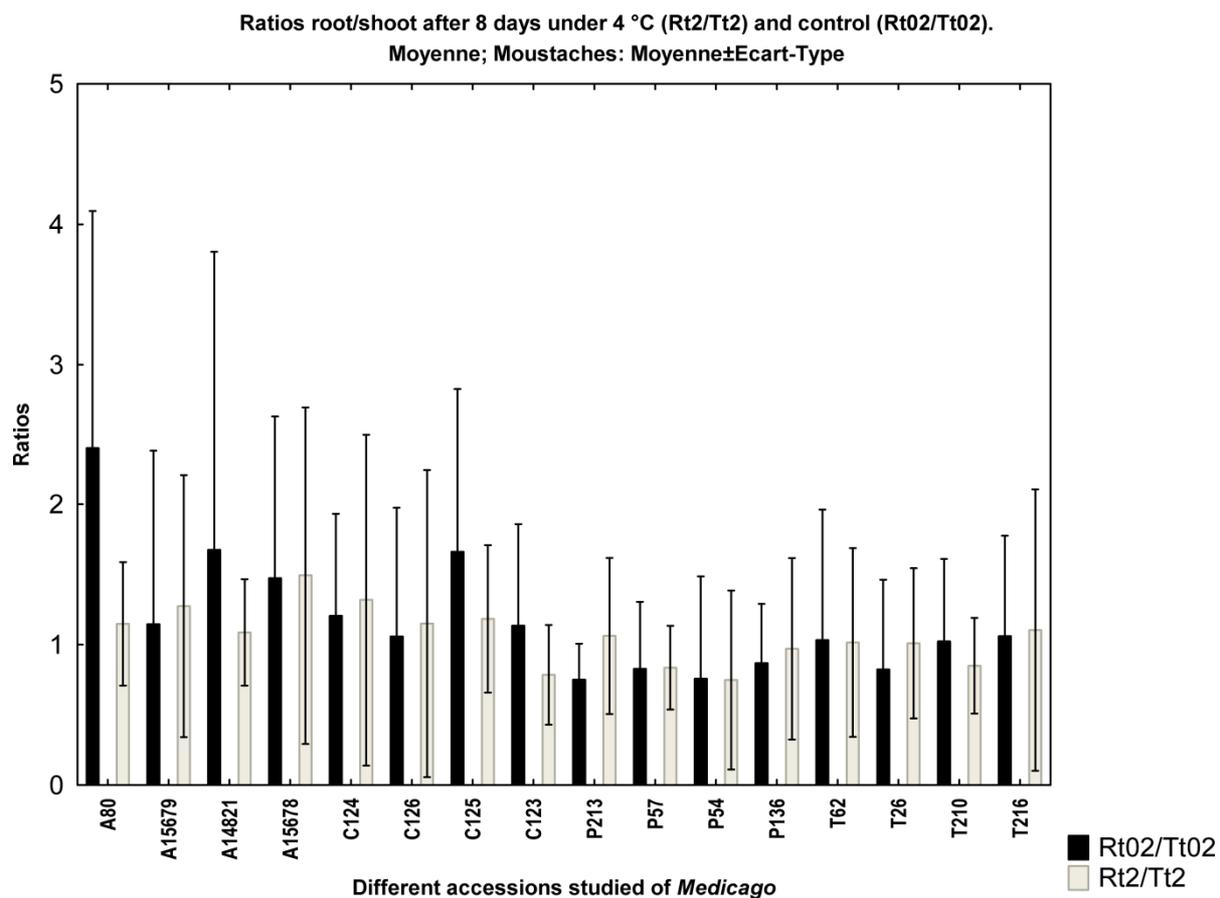


Figure 12. Ratios racine/tige après 8 jours d'acclimation à 4 °C (Rt2/Tt2) et le control (Rt02/Tt02), pour les différents écotypes étudiés de *Medicago*.

Ratio root/shoot after 11 days under 4 °C (Rt3/Tt3) and control (Rt03/Tt03).

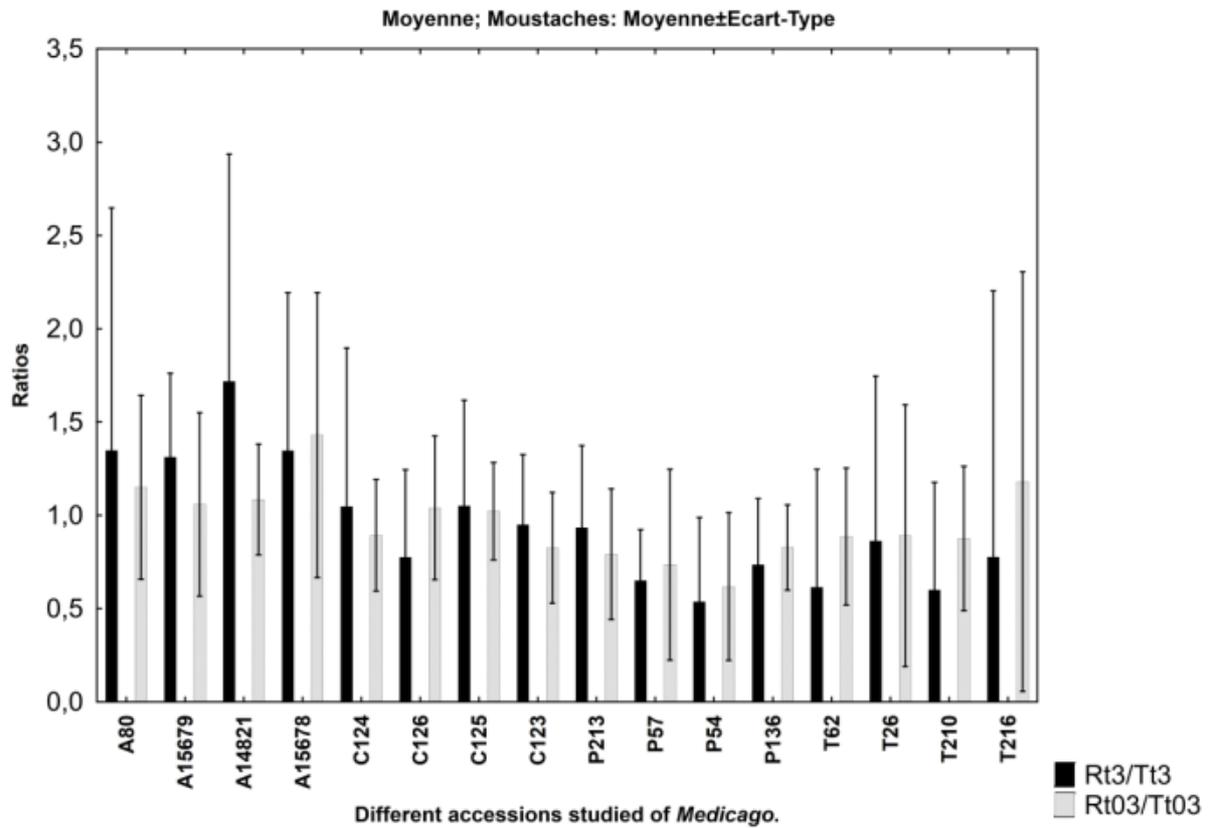


Figure 13. Ratios racine/tige après 11 jours d'acclimatation à 4 °C (Rt3/Tt3) et le control (Rt03/Tt03), pour les différents écotypes étudiés de *Medicago*.

Afin de classer les écotypes par rapport au traitement par le froid, une analyse de variance est effectuée en ne tenant compte que du traitement sous un régime de basse température, pour déterminer les groupes homogènes à l'aide du test de Newman-Keuls au seuil de 5%. Les résultats, pour les différents paramètres étudiés, sont reportés dans le tableau 6 a, b, et c.

Tableau 6. Analyse de variance factorielle pour les paramètres morphologiques sous un régime de basse température

(a) Longueur totale

Source de variation	ddl	CM	F
Ecotypes	15	292,9324	22,52 ***
Traitements	2	132,5458	10,19 ***
Ecotype*traitement	30	82,0981	6,31 ***
Erreur	2352	13,0070	

(b) Longueur tige

Source de variation	ddl	CM	F
Ecotypes	15	47,05887	20,98 ***
Traitements	2	14,55720	6,488 **
Ecotype*traitement	30	20,44054	9,11 ***
Erreur	2352	2,24350	

(c) Longueur racine

Source de variation	ddl	CM	F
Ecotype	15	97,60794	30,88 ***
Traitements	2	41,19091	13,03 ***
Ecotype*traitement	30	32,56181	10,30 ***
Erreur	2352	3,16113	

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.0001$

Selon le test de Newman-Keuls au seuil de 5%, les groupes homogènes des paramètres étudiés (Tableaux 7, 8, et 9).

En ce qui concerne la longueur totale de la plante, on distingue 5 groupes homogènes (a, b, c, d, et e) (Tableau 7). On peut distinguer trois groupes qui ressortent de ces groupes homogènes, un groupe sensible, un groupe moyennement tolérant, et un groupe tolérant.

Tableau 7. Groupes homogènes (test Newman-Keuls) pour le paramètre longueur totale (LTTL) de la plantule sous un régime de basse température

Ecotypes	Moyennes(cm)	a	b	c	d	e
Poly 54	2,891333	a				
Cil 123	2,933333	a				
Ac 14821	3,797333	a	ab			
Tru 216	3,850667	a	ab			
Tru 210	3,858000	a	ab			
Poly 57	4,152333		b			
Tru 62	4,276667		b			
Poly 136	4,690000		b			
Poly 213	4,744667		b			
Cil 125	4,762000		b			
Cil 124	4,786000		b			
Tru 26	4,858667		b			
Ac15678	5,809333			c	cd	
Ac15679	6,230667				d	
Cil 126	6,784667				d	
Ac80	8,214000					e

On constate que le froid affecte à la fois la croissance des tiges et des racines et son effet est nettement marqué quand la durée du traitement est de 11 jours (Tableaux 8 et 9). Le groupe a représente les populations sensibles, le groupe b et c les groupes moyennement tolérant et les groupes E et F le groupe des populations tolérantes. D'ailleurs ce classement est relativement en conformité avec les origines des différentes populations étudiées. Des auteurs montrent que la croissance est d'autant plus réduite que la durée du traitement est d'autant plus longue (Thapa et al. 2008; Kurt, 2010; Baruah et al. 2011).

Tableau 8. Groupes homogènes (test Newman-Keuls) pour le paramètre longueur de la tige (LTGE) sous un régime de basse température

Ecotypes	Moyenne (cm)	a	b	c	d	e	f
Cil 123	1,534000	a					
Ac 14821	1,571333	a					
Poly 54	1,642667	a					
Tru 216	1,826000	a	ab				
Tru 210	1,968000	a	ab	bc			
Cil 125	2,103333		ab	bc	cd		
Tru 62	2,121333		ab	bc	cd		
Cil 124	2,296000		ab	bc	cd	de	
Poly 57	2,311667		ab	bc	cd	de	
Poly 136	2,380667			c	cd	de	
Tru 26	2,540000				d	de	
Ac 15678	2,629333					e	
Poly 213	2,672000					e	
Ac 80	3,116000						f
Ac15679	3,186667						f
Cil126	3,298667						f

En ce qui concerne le caractère longueur de la racine, le froid agit différemment sur ce caractère d'une population à une autre, et on distingue, selon les groupes homogènes, que les populations sont groupées selon 7 groupes homogènes. Le groupe a, où on constate que le stress froid agit considérablement sur le système racinaire, représenté par une seule population (Cil 123), les groupes b,c, et d qu'on peut considérer comme sensible à moyennement tolérant et le dernier groupe (e et f) come très tolérant (Tableau 9).

Thapa et al. (2008) montrent que des plants *Medicago truncatula* acclimatés au froid réduisent considérablement la longueur de leurs tiges, le nombre de feuilles, ainsi que leurs racines par rapport aux témoins. Hekneby et al. (2001) montrent aussi que le taux de réduction des tiges est plus important que celui des racines. Toujours d'après ces auteurs les plantes tolérantes au froid ont un ratio racine/tige plus important que les plantes sensibles. Ils stipulent que, chez *M. truncatula*, le pouvoir d'acclimation aux basses températures augmente considérablement le pouvoir de la tolérance au gel. D'autre part, la durée d'acclimation joue un rôle important, plus la durée est longue et plus le degré de la tolérance au gel est meilleur.

Les résultats obtenus montrent que la réduction de croissance, évaluée par la longueur totale, la longueur de la tige et la longueur de la racine de la plante diffère d'une population à une autre et d'un organe à un autre. Le système racinaire reste moins affecté que la partie aérienne de la plante. Les écotypes de *M. aculeata* (Ac 80, Ac 14826, et Ac 15679) sont considérés tolérants et dont les parents dont ils sont issus sont originaires de sites à haute altitude. Chez *M. ciliaris*, c'est l'écotype Cil 126 qui présente un système racinaire le moins affecté par basse température.

Tableau 9. Groupes homogènes (test Newman-Keuls) pour le paramètre longueur de la racine (LRCNE) sous un régime de basse température

<u>Ecotypes</u>	<u>Moyennes (cm)</u>	<u>a</u>	<u>b</u>	<u>c</u>	<u>d</u>	<u>e</u>	<u>f</u>	<u>g</u>
Poly 54	1,248667	a						
Cil 123	1,399333	a						
Tru 210	1,833333		b					
Poly 57	1,840667		b					
Tru 216	2,024667		b	bc				
Poly 213	2,072667		b	bc	cd			
Tru 62	2,138667		b	bc	cd			
Ac 14821	2,226000		b	bc	cd			
Poly 136	2,309333		b	bc	cd			
Tru 26	2,318667			c	cd			
Cil 124	2,490000			c	cd			
Cil125	2,658667				d	de		
Ac 15679	3,044000					e	ef	
Ac15678	3,180000						f	
Cil 126	3,486000						f	
Ac 80	4,441333							g

Sous un traitement de 11 jours, les génotypes de *M. polymorpha*, Poly 213 et Poly 57 présentent des moyennes intermédiaires. Parmi les génotypes intermédiaires, figurent aussi le cultivar Acu 15678, un seul écotype de *M. ciliaris* (Cil 126) et deux de *M. polymorpha* (Poly 54 et Poly 136). Trois écotypes de *M. truncatula*, (Tru 62, Tru 216 et Tru 26) sont intermédiaires. Le lien entre la tolérance au froid et l'origine géographique est souvent mis en avant (Bounejmata et al. 1994; Avia et al. 2013, Cui et al. 2013). Les résultats montrent que le froid agit différemment d'une population à une autre. Chez certaines populations originaires de haute altitude la croissance est moins affectée par le froid que celles originaire de basse

altitude. Cependant, certaines populations originaires de haute altitude font exception et se comportent comme des populations soit intermédiaires soit sensibles, exemple Tru 216 et Tru 210. Avia et al. (2013) font la même constatation et stipulent que cette relation reste non claire. D'autre part, Avia et al. (2013) montrent que les lignées recombinantes de *Medicago* tolérantes au gel, issues de parents originaires de haute altitude, ont un pouvoir de maintenir une bonne croissance à de basses températures, alors que la majorité des populations originaires de basses altitudes se sont révélées sensibles au froid. Ce pouvoir est dû en fait à des allèles à effets additifs hérités des deux parents tolérants. Bounejmate et al. (1994) mettent en évidence une relation directe entre la tolérance au gel et la température de l'hiver sur le site de collecte pour *M. aculeata*. Les génotypes les plus tolérants au gel provenant de hautes altitudes. Tous les génotypes de *M. truncatula* ont montré un faible taux de survie après le gel. Les génotypes de haute altitude constituent une source prometteuse pour la sélection de génotypes tolérants, avec une plus grande variation de *M. aculeata* que *M. truncatula*.

V.2. Activité anti-oxydante des peroxydases sous un stress de basse température

V.2.1. Changement dans l'activité globale

L'activité des peroxydases a été réalisée chez des populations extrêmes (Tolérantes ou sensibles) appartenant aux différentes espèces étudiées. La tendance générale concernant l'activité peroxydasique sous un stress de basse température en comparaison avec le témoin (figures 14, 15, 16, 17) (Tableaux 31 et 32 (voir annexe), et ceci pour les quatre espèces étudiées, est plus importante au début du stress chez les deux types de plantes tolérante et sensible à la fois, mais ces augmentations diminuent avec la durée du stress. Cette diminution est plus affichée chez les populations sensibles que chez les populations tolérantes. Cet aspect a été souligné, en ce qui concerne le stress par des basses températures non-gélives, par plusieurs auteurs et chez différentes espèces étudiées.

Les résultats montrent que sous un régime de basse température, l'activité des peroxydases augmente et ces augmentations en activité diffèrent d'une population à une autre et d'une espèce à une autre. Chez les témoins on constate que cette augmentation est différentielle et est fonction de trois stades : stade 1, 2^{ème} au 6^{ème} jour, stade 2, 8^{ème} au 11^{ème}, et enfin le stade 3, 12^{ème} au 14^{ème} jour. Lors du stress par basse température, pendant les premiers stades de développements, on constate que l'activité des peroxydases est plus importante par rapport au témoin, mais cette tendance n'est pas maintenue quand le stress se prolonge dans le temps. Dans la littérature, il est souvent rapporté que chez les plantes tolérantes et sensibles répondent aux stress froid par une forte activité enzymatique en comparaison avec les témoins, et pour

tous les types de stress d'ailleurs, mais une fois que le stress se prolonge dans le temps les sensibles n'arrivent pas à maintenir à un niveau satisfaisant d'activité, pour piéger les ROS et rétablir l'équilibre, leur activité enzymatique. Les résultats de l'étude montrent en effet que les accessions sensibles ne parviennent pas à maintenir l'activité peroxydasique comme les tolérants et donc n'arrive pas, si le stress se prolonge, à rétablir un équilibre homéostatique ionique. Des résultats en accord avec les travaux de Kang et Saltveit (2001) relatent que deux heures seulement après un stress par basse température de jeunes plants complets de concombre, l'activité de plusieurs enzymes antioxydant examinées (SOD), (CAT), et (POD) est réduite par rapport au témoin. Liu et al. (2013) stipulent aussi que le froid a plus d'effet sur l'augmentation de l'activité des POD par rapport au témoin et que lorsque le stress froid se prolonge dans le temps, ceci affecte la transcription et la translation des ARN réduisant ainsi la synthèse des POD.

Chez *M. polymorpha*, l'activité des peroxydases au bout de 5 jours de traitement est de 0.018 μ mole (voir Tableau 31 annexe) chez Poly 136 (tolérant) contre une valeur de 0.012 μ mole chez Poly 57 (sensible). En comparaison avec le témoin l'activité peroxydasique est maintenue chez le tolérant plus que chez le sensible après des traitements de 8 et 11 jours sous un régime de basse température. L'activité chute considérablement chez la population sensible (Poly 57) de 0.015 μ mole à 0.008 μ mole, en passant de T2 à T3, alors que ne diminue que faiblement chez la population tolérante (Poly 136) avec des valeurs qui passent de 0.013 à 0.011 μ mole de en passant de T2 à T3.

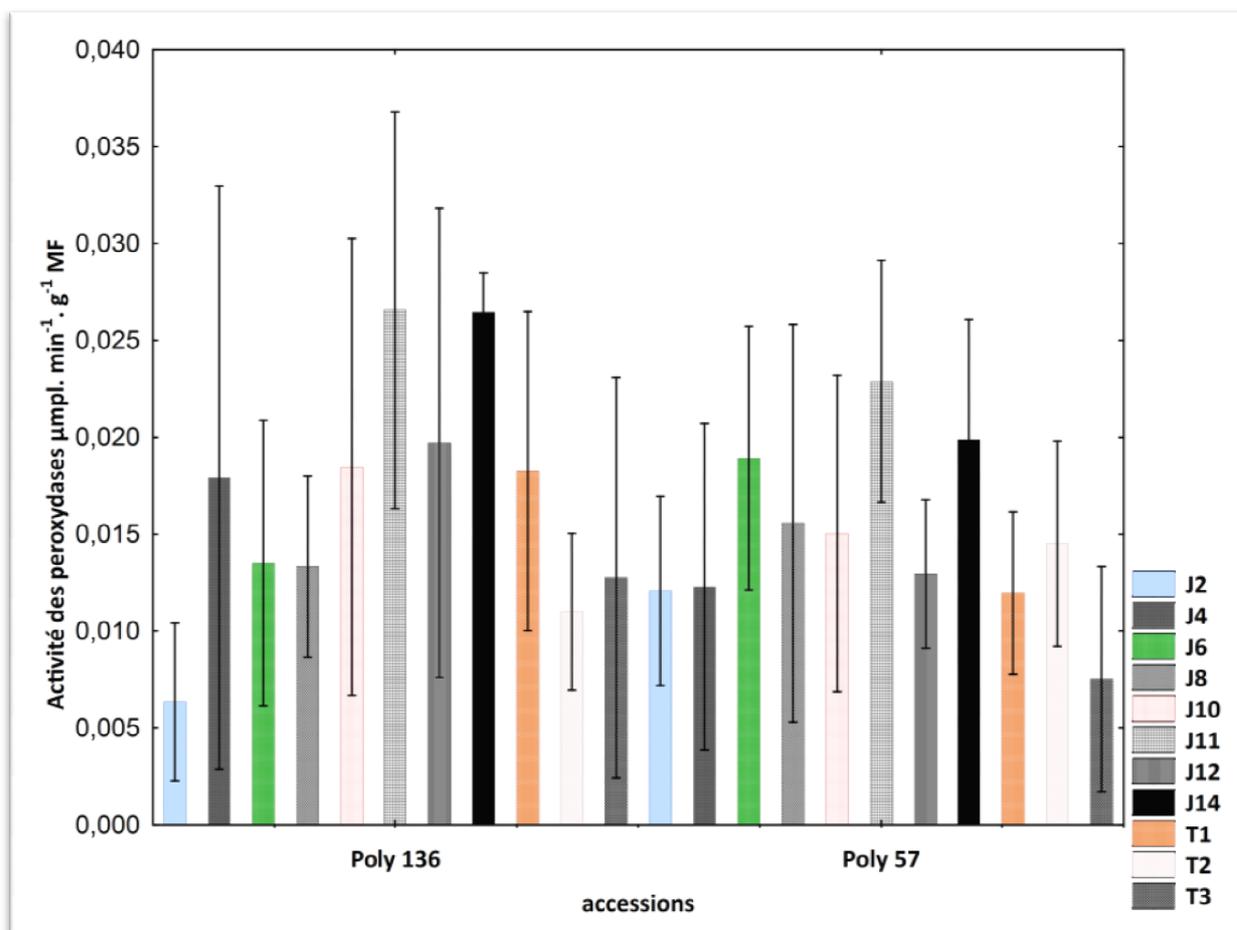


Figure 14. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez *M. polymorpha*.

Lorsqu'on compare l'activité peroxydasique sous un régime de basse température avec les témoins chez les deux populations de *M. aculeata* (Figure 15), l'activité des peroxydases chez la population sensible (Ac 15679) décroît drastiquement, par exemple cette activité décroît de 75% en comparaison avec le témoin après 11 jours de traitement sous un régime de basse température. Au contraire, chez le tolérant (Ac 80) l'activité des peroxydases augmente sous stress froid en comparaison avec le témoin durant les deux périodes de traitement (T1 et T2) et ne diminue que de 50% en activité après 11 jours de traitement (T3).

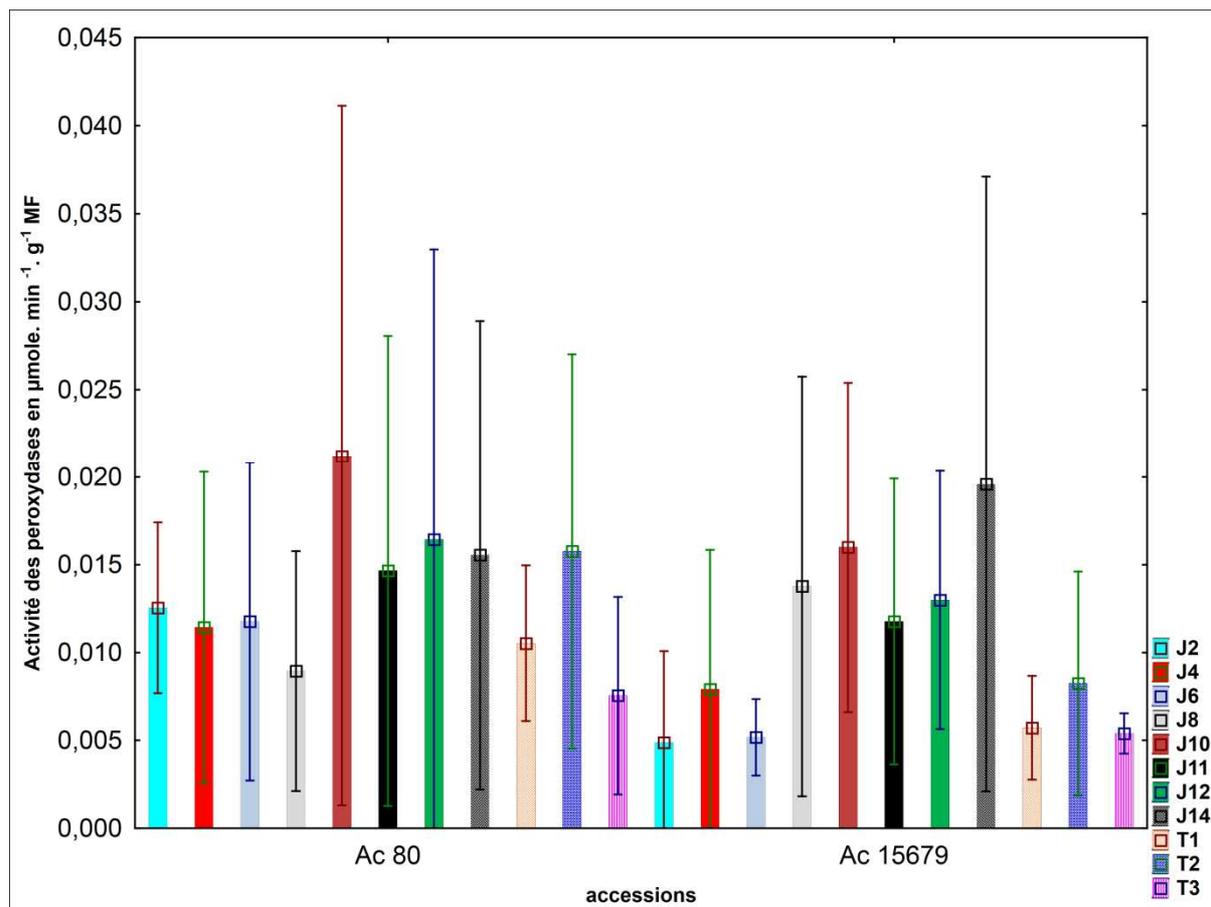


Figure 15. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole. min}^{-1}.\text{g}^{-1}\text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez *M. aculeata*.

Chez *M. truncatula*, l'activité globale des peroxydases des plantes des deux populations traitées sous stress froid semble différente par rapport à ceux de *M. polymorpha*, *M. aculeata*, et *M. ciliaris*. En effet, l'activité sous stress n'est pas plus importante que chez le témoin lorsque le stress s'installe, l'activité après 5 jours de traitement au froid est de 0.010 et 0.008 μmole respectivement au niveau de Tru 210 et Tru 26 contre 0.013 et 0.009 μmole des témoins respectifs respectivement chez le tolérant et le sensible. Mais cette activité reste toujours plus importante chez l'écotype tolérant que chez le sensible (Tableau 32 (annexe)).

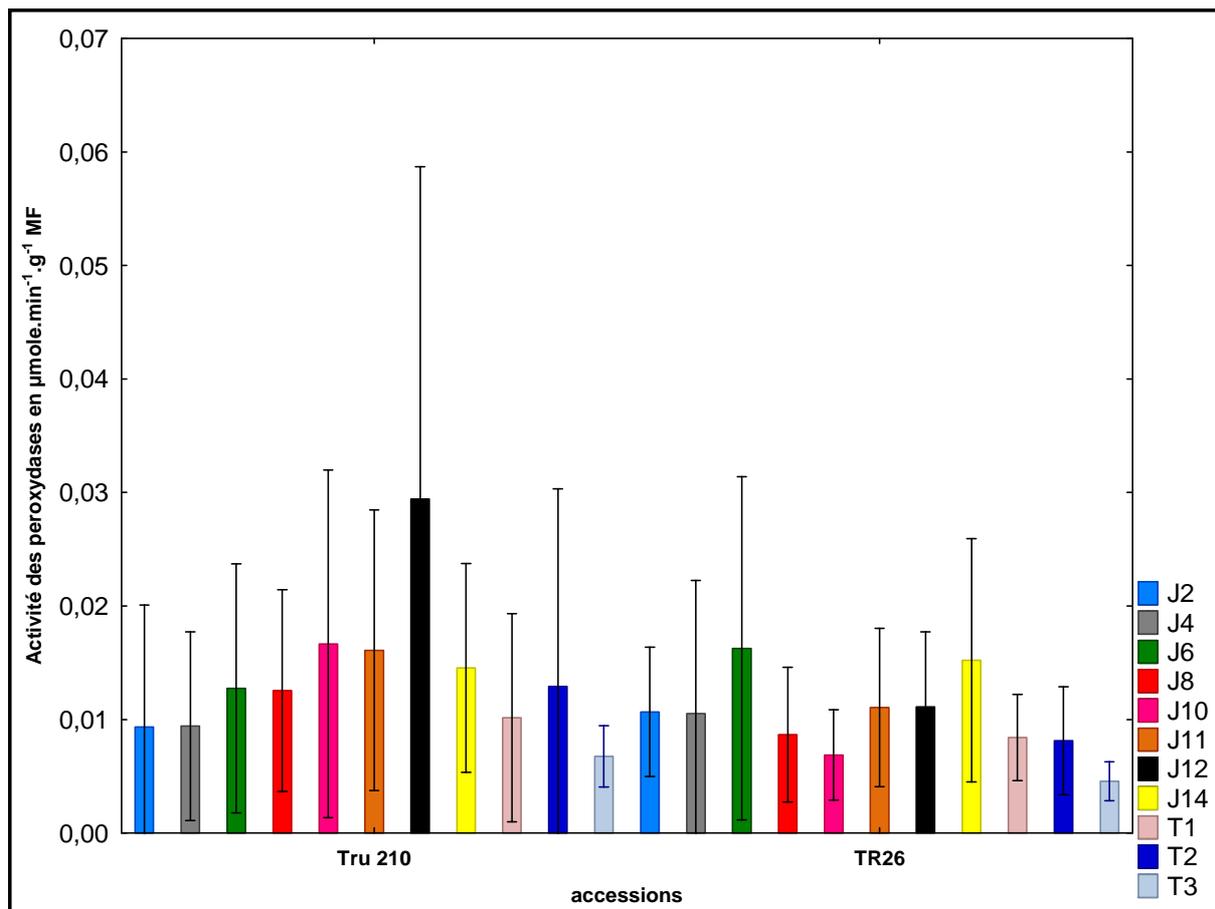


Figure 16. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez *M. truncatula*.

L'activité globale des peroxydases au niveau de l'espèce *M. ciliaris* (Figure 17), le stress par le froid engendre une augmentation de cette activité en comparaison avec leurs témoins respectifs, chez les deux type de populations tolérante (Cil 124) et sensible (Cil 12) après cinq jours de traitement avec des taux de 0.018 μmole et 0.015 μmole respectivement (voir tableau 32 en annexe). Cette activité chute de 50 % chez Cil 123 après 8 et 11 jours de traitement au froid, mais elle est maintenue à des niveaux supérieurs chez Cil 124 pour les mêmes durées de traitement.

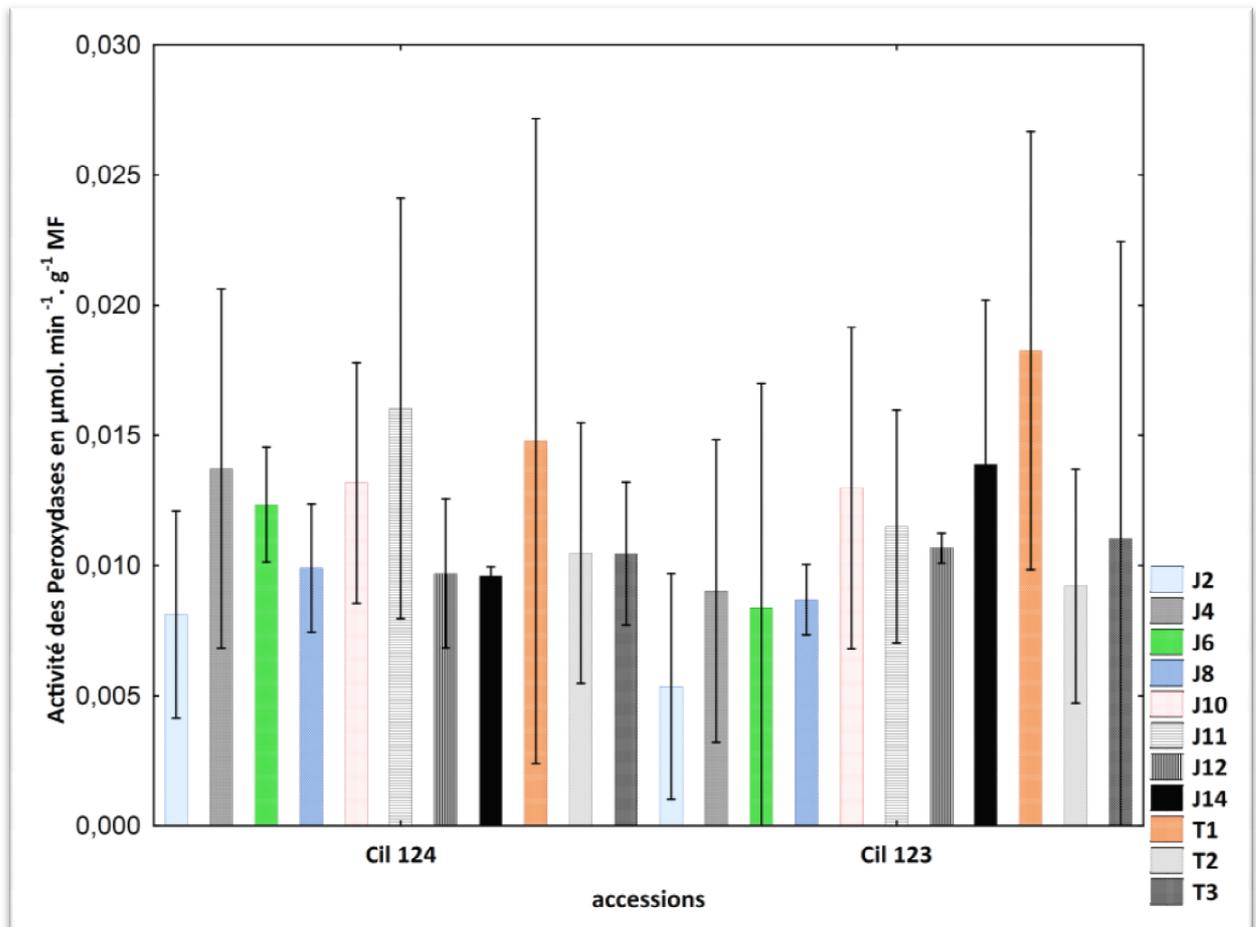
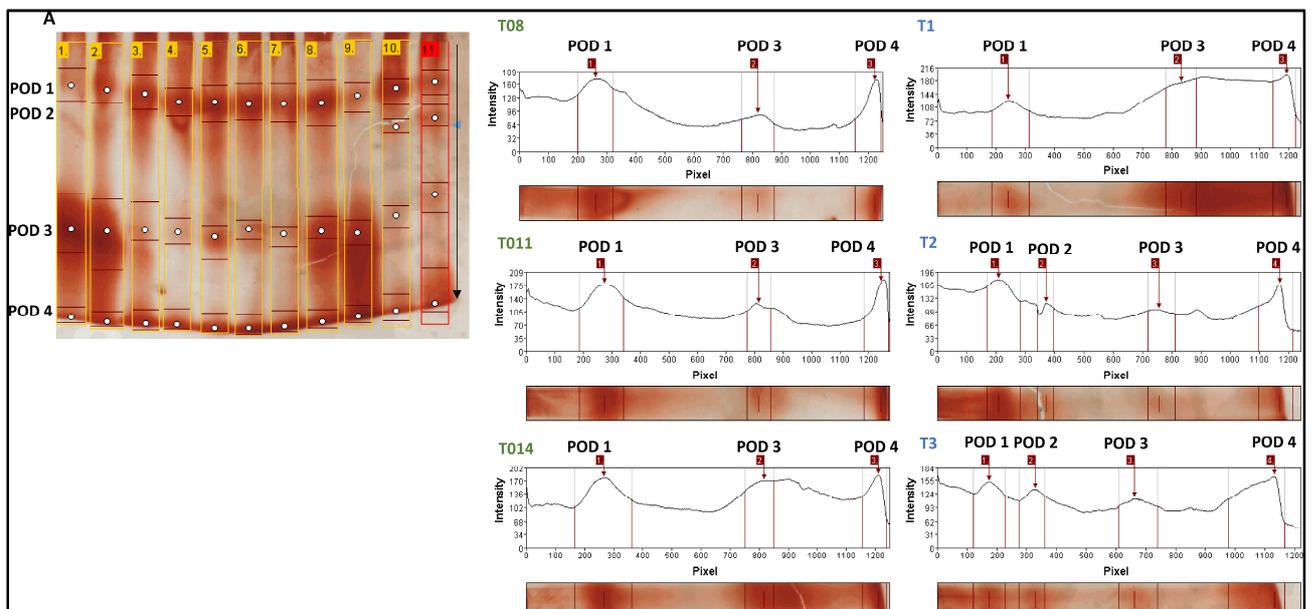


Figure 17. Activité des peroxydases en $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$ au niveau des plantes témoins et les plantes traitées sous un régime de basse température, chez *M. ciliaris*.

V.2.2.Expression isoenzymatique par électrophorèse sous un stress de basse

Les résultats montrent (Figures. 18, 19, 20, et 21) que le nombre de loci exprimés varie, selon la nature des populations, tolérante ou sensible, et en fonction de la durée du traitement sous un stress froid. Certains loci sont mis à contribution dès les premiers stades de développement de la plante, alors que d'autres, ne le sont que dans des stades plus avancés du développement et de l'intensité du stress. Les quatre espèces affichent trois zones de bandes avec une position des bandes spécifiques de chaque espèce. L'analyse de profil électrophorétique montre aussi que chaque stade présente une expression de loci différents. L'expression des différentes peroxydases nommées par POD1, POD 2, POD 3, POD 4, et POD 5, révélées en conditions témoins et sous traitement de stress, est différente en nombre et en intensité, et est différente d'une espèce à une autre.

Chez *M. ciliaris* (Figure 18 A et B), après cinq jours de traitement les plantes expriment 4 isoenzymes (POD 1-POD4) au niveau à la fois chez le contrôle et les traités sous stress. Particulièrement chez l'écotype tolérant Cil 124 (Figure 18A) l'isoenzyme POD 2 est maintenue pendant le traitement sous basse température au niveau de T2 et T3, alors qu'elle est réprimée chez l'écotype sensible Cil 123 quand le traitement se prolonge à 11 jours (T3) (Figure 18 B). Il semblerait que seulement l'écotype tolérant a la capacité d'activer POD 2 quand le stress est maintenu dans le temps.



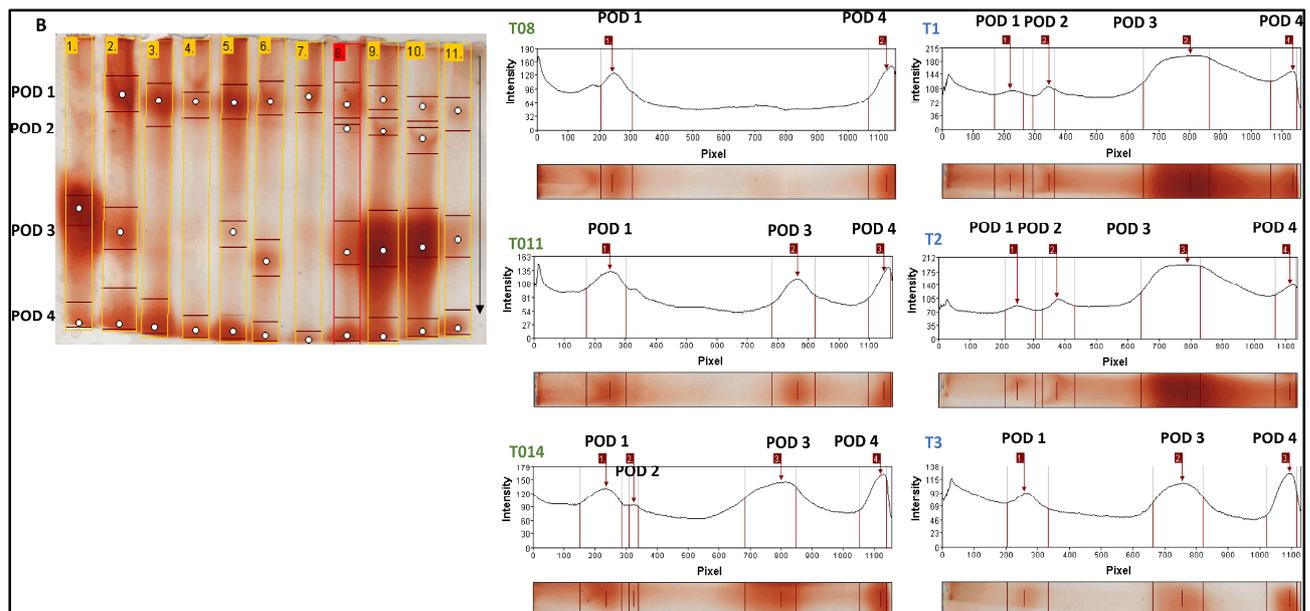


Figure 18. Profil izoenzymatique des peroxydases chez *M. ciliaris* (A: Cil 124 et B: Cil 123). Lignes de 1 à 8 (T₀₂, T₀₄, T₀₆, T₀₈, T₁₀, T₁₁, T₁₂, et T₁₄) et les lignes de 9 à 11 les plantules traitées sous stress froid (T1, T2, et T3).

Chez *M. polymorpha*, le profil électrophorétique des peroxydases (Figure 19 A : Poly 136 et B : Poly 57), 3 à 4 isoenzymes sont exprimées au niveau des deux écotypes Poly 136 (Tolérant) et Poly 57 (Sensible). L'écotype tolérant met à contribution plus d'isozymes (4 isozymes) que le sensible (3 isozymes) sous un régime de basse température, et les intensités des isoenzymes sont plus importante chez le premier que chez le second. Si on compare deux à deux les traités et leurs témoins respectifs, on remarque que l'expression des isoenzymes chez les traités est plus importante que chez les témoins, avec une forte intensité pour les isozymes POD 3 et POD 4 chez Poly 136, et POD 2 et POD 3 chez Poly 57. Cependant, au niveau du traitement T3 l'isozyme POD 1 chez l'écotype sensible Poly 57 a fortement baissée en intensité en comparaison avec le traitement T1 et T2. L'isozyme POD 2 (Rf 0.29) n'apparait pas chez l'écotype sensible (Figure 19 B).

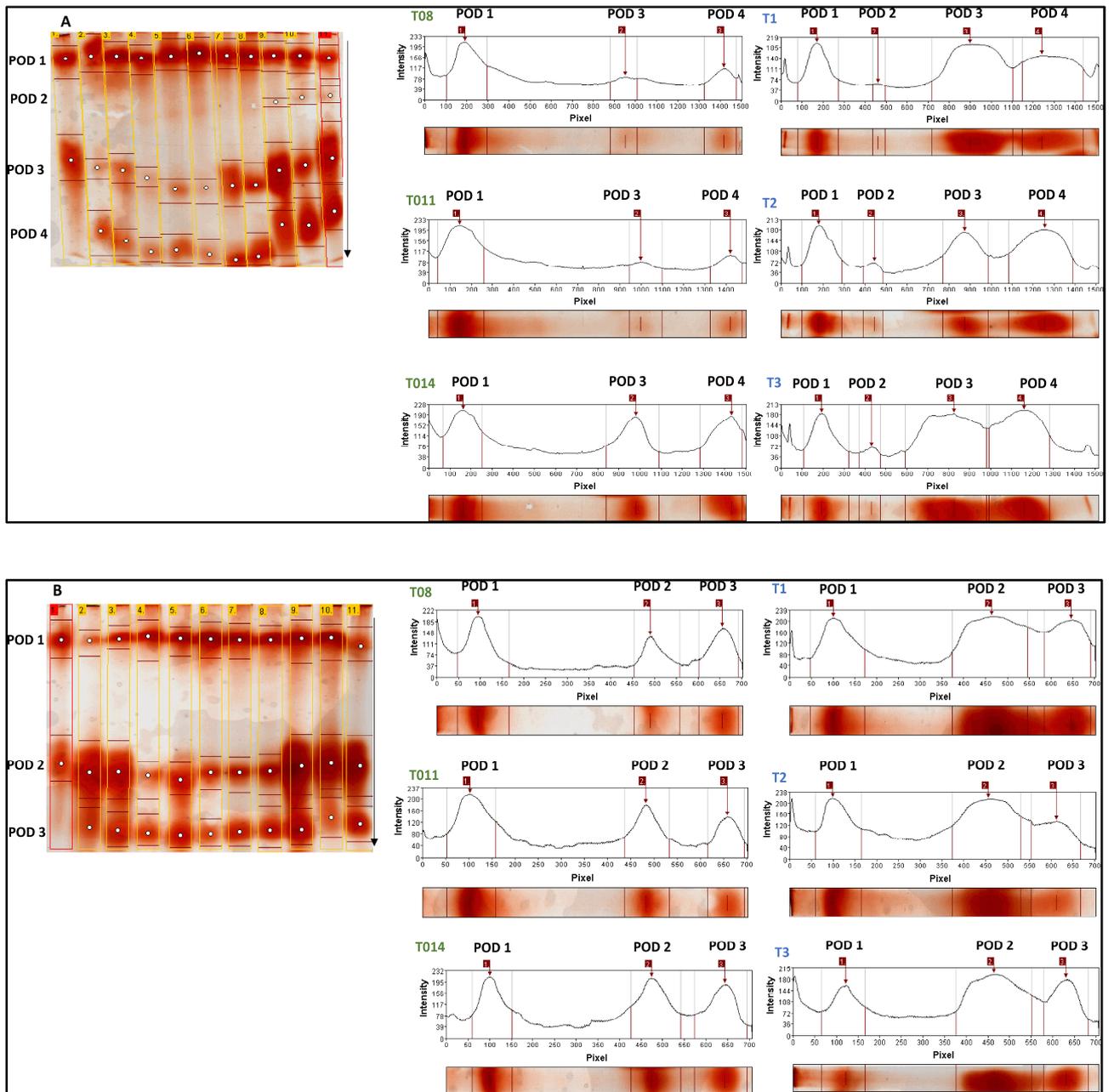
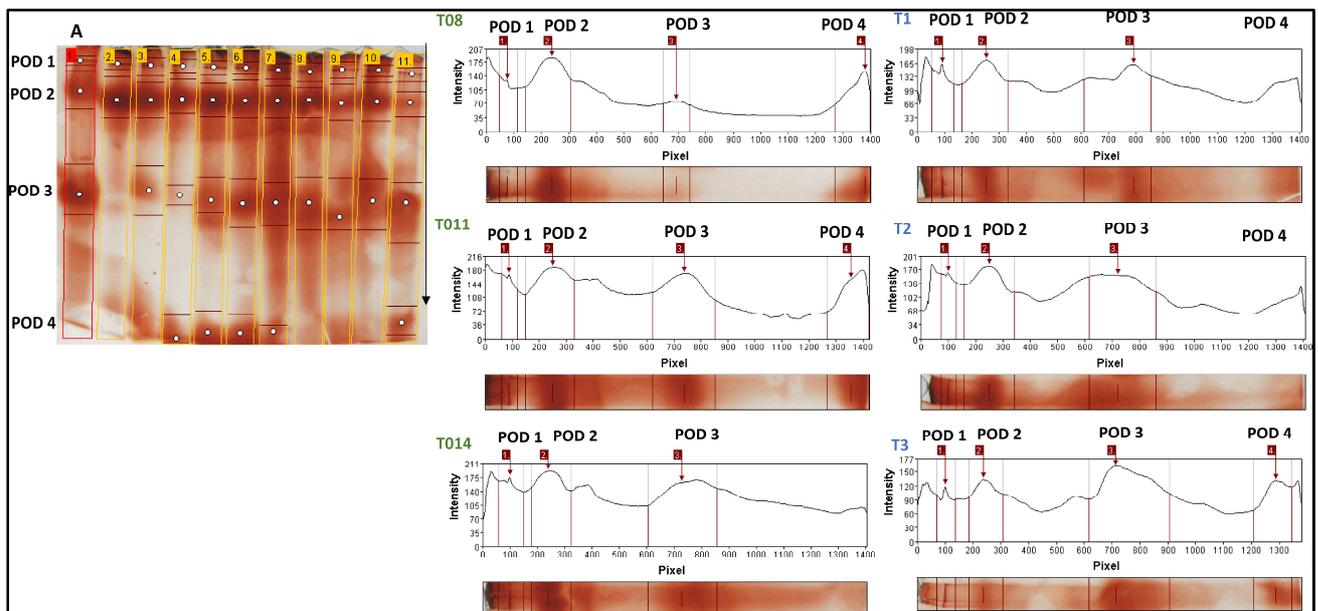


Figure 19. Profil isoenzymatique des peroxydases chez *M. polymorpha* (A: Poly 136, et B: Poly 57). Lignes de 1 à 8 (T₀₂, T₀₄, T₀₆, T₀₈, T₀₁₀, T₀₁₁, T₀₁₂, et T₀₁₄) et les lignes de 9 à 11 les plantules traitées sous stress froid (T₁, T₂, et T₃).

Chez *M. truncatula*, les profils isoenzymatiques des écotypes Tru 210 et Tru 26 (Figure 20 A: Tru 210 et B : Tru 26) révèlent, en conditions normales et sous un régime de basse température, de 1 à 5 isoenzymes (POD 1 à POD 5). Au niveau de Tru 210 présente quatre bandes majeurs POD 1 à POD 4 lorsque les plantes sont soumises à un stress de 5 et 8 jours, avec une forte intensité pour l'isozyme POD 3 et une intensité moindre pour l'isozyme POD 4. Quand les plantes sont soumises à un stress de 11 jours, l'isozyme POD 4 est fortement exprimée en comparaison avec le témoin. Chez l'écotype sensible Tru 26, cinq isozymes sont exprimées chez le témoin. Après un traitement sous stress de 5 et 8 jours POD 3 et POD 4 sont fortement exprimées en comparaison avec leurs témoins respectifs, mais une fois le stress s'étale dans le temps (T3) POD 4 est faiblement exprimée alors que POD 5 est totalement réprimée par le froid.



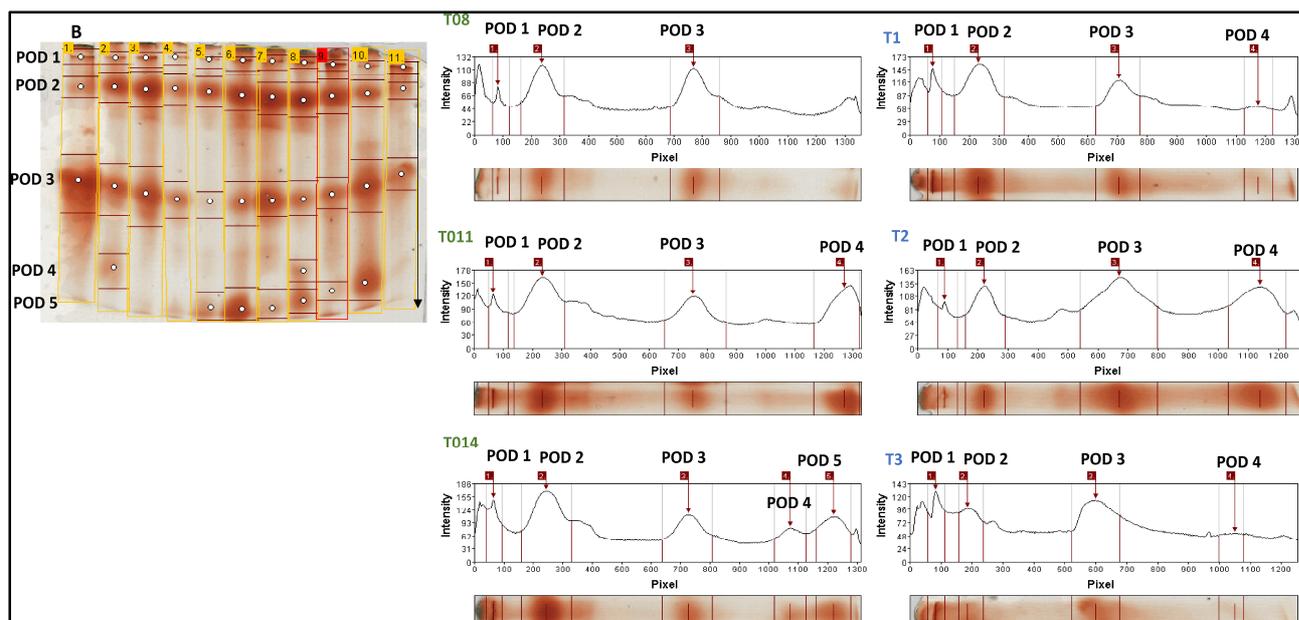


Figure 20. Profil isoenzymatique des peroxydases chez *M. truncatula* (A: Tru 210, et B: Tru 26). Lignes de 1 à 8 (T₀₂, T₀₄, T₀₆, T₀₈, T₁₀, T₁₁, T₁₂, et T₁₄) et les lignes de 9 à 11 les plantules traitées sous stress froid (T1, T2, et T3).

Au sein de l'espèce *M. aculeata* (Figure 21 A : Ac 80, et B : Ac 15679), cinq isozymes (POD 1 à POD 5) sont exprimées à la fois chez l'écotype tolérant (Figure 21 A) et l'écotype sensible (Figure 21 B). Certains isozymes s'expriment durant les premiers stades de croissance et disparaissent lors des stades plus avancés. L'expression des isozymes peroxydasique est plus importante chez l'écotype tolérant que chez l'écotype sensible. Chez l'écotype tolérant Ac 80 l'intensité d'expression isoenzymatique est plus importante au niveau des plantes traitées que chez le contrôle, mais cette intensité diminue avec la durée du traitement. En effet en T3 (Figure 21 A) POD 3, POD 4, et POD 5 leur intensité à diminuée. Chez l'écotypesensible Ac 15679, le traitement par le froid perturbe fortement l'expression isoenzymatique voire même l'inhiber comme le montre la figure 21 B où POD 3 ne s'exprime pas après 11 jours de traitement par le froid en comparaison avec le témoin.

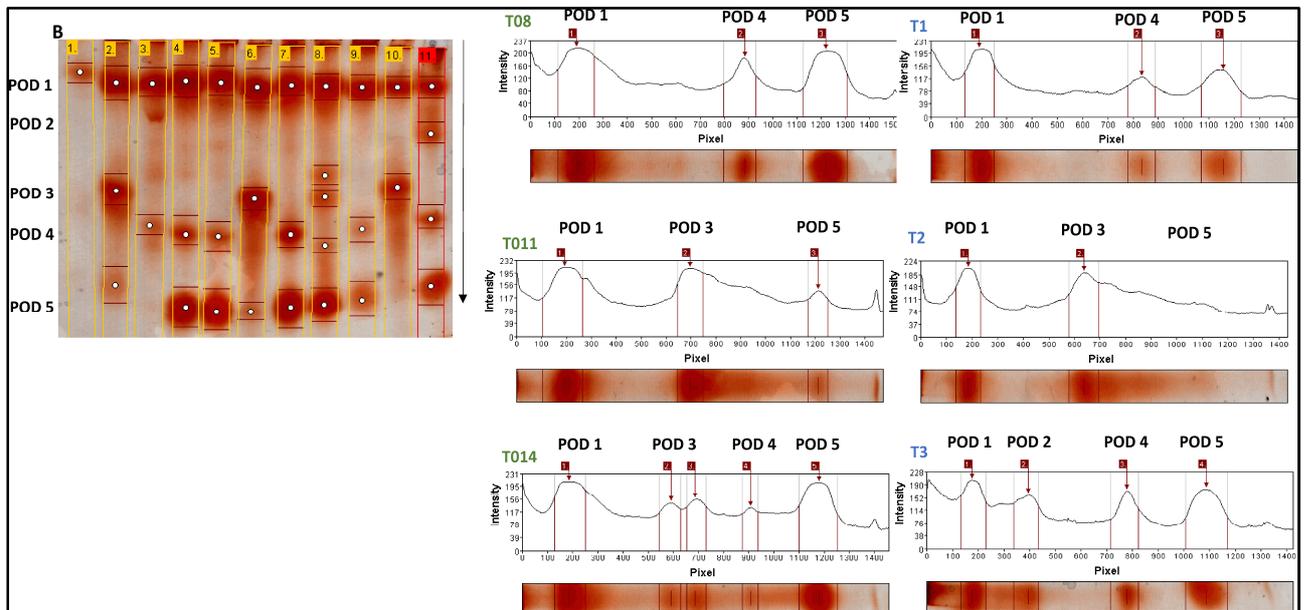
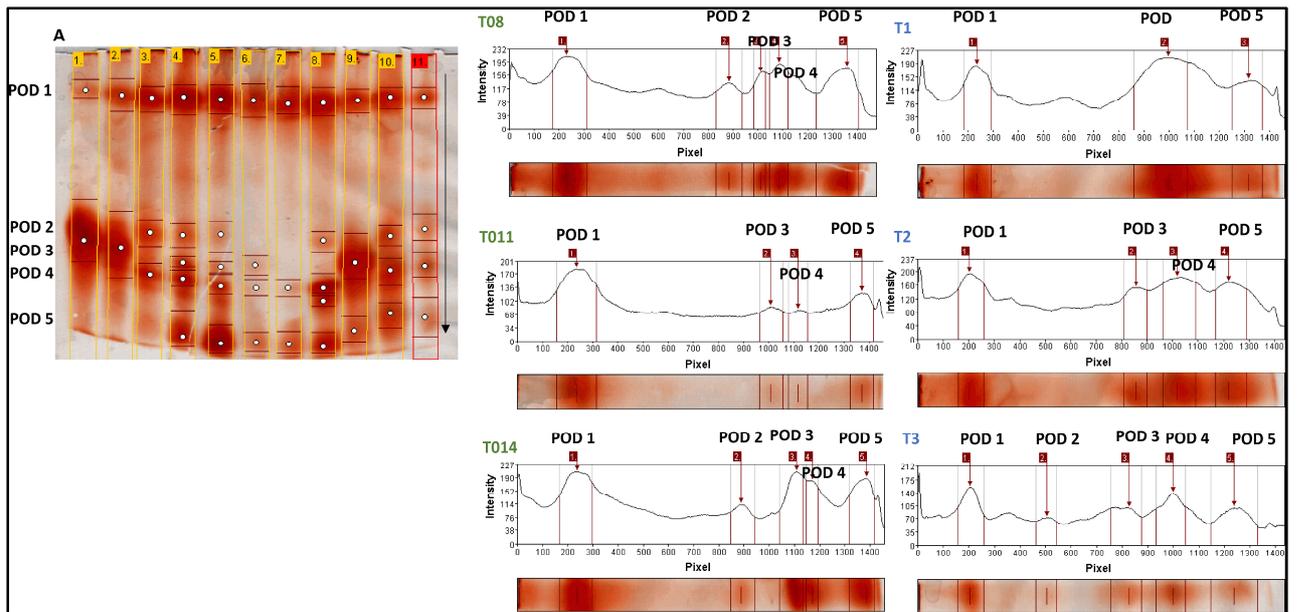


Figure 21. Profil isoenzymatique des peroxydases chez *M. aculeata* (A: Ac 80, et B: Ac 15679). Lignes de 1 à 8 (T_02 , T_04 , T_06 , T_08 , T_{010} , T_{011} , T_{012} , et T_{014}) et les lignes de 9 à 11 les plantules traitées sous stress froid (T_1 , T_2 , et T_3).

V.3. Activité anti-oxydante des estérases EST (EC 3.1.1.1) sous un stress par basse température

L'analyse du système izoenzymatique des estérases a été aussi réalisée sur des populations contrastées vis-à-vis de leur tolérance ou leur sensibilité à un stress froid. Les profils izoenzymatique des estérases présente une expression différente d'une espèce à une autre et d'une population à une autre (Figures 22 A et B, 23 A et B, 24 A et B, et 25 A et B). Les estérases exprimées sont nommées EST et varie selon l'espèce et la population de EST 1 à EST 7. L'expression et l'intensité des bandes du profil des lots témoins est très inférieure à celle des lots traités sous stress froid, et est plus prononcée chez les populations tolérante que chez les sensibles. Les résultats montrent aussi que cette expression est en fonction de la durée du traitement.

Chez *M. aculeata*, les résultats des profils de l'activité estérasiques est plus important chez l'écotype tolérant Ac 80 que chez l'écotype sensible Ac 15679 sous un régime de basse température. En comparaison avec les lots témoins cette activité est plus importante chez les deux types d'écotypes. Le nombre d'isoenzymes exprimé sous un régime de basse température chez l'écotype tolérant Ac 80 et l'écotype 15679 varie de 1 à 5 (EST 1-EST 5) (Figure 22 A et B). Cette activité (forte intensité) est maintenue, et avec des activités plus importante, lorsque le stress est plus important en sévérité (T2 et T3), particulièrement pour EST 3 et EST 5 (Figure 22 B) en comparaison avec le traitement de 5 jours. Cette tendance est inversée chez l'écotype sensible où cette activité baisse (faible intensité) drastiquement avec le temps du traitement au niveau des isozymes EST 4 et EST 5 au niveau du T3 (Figure 22 A).

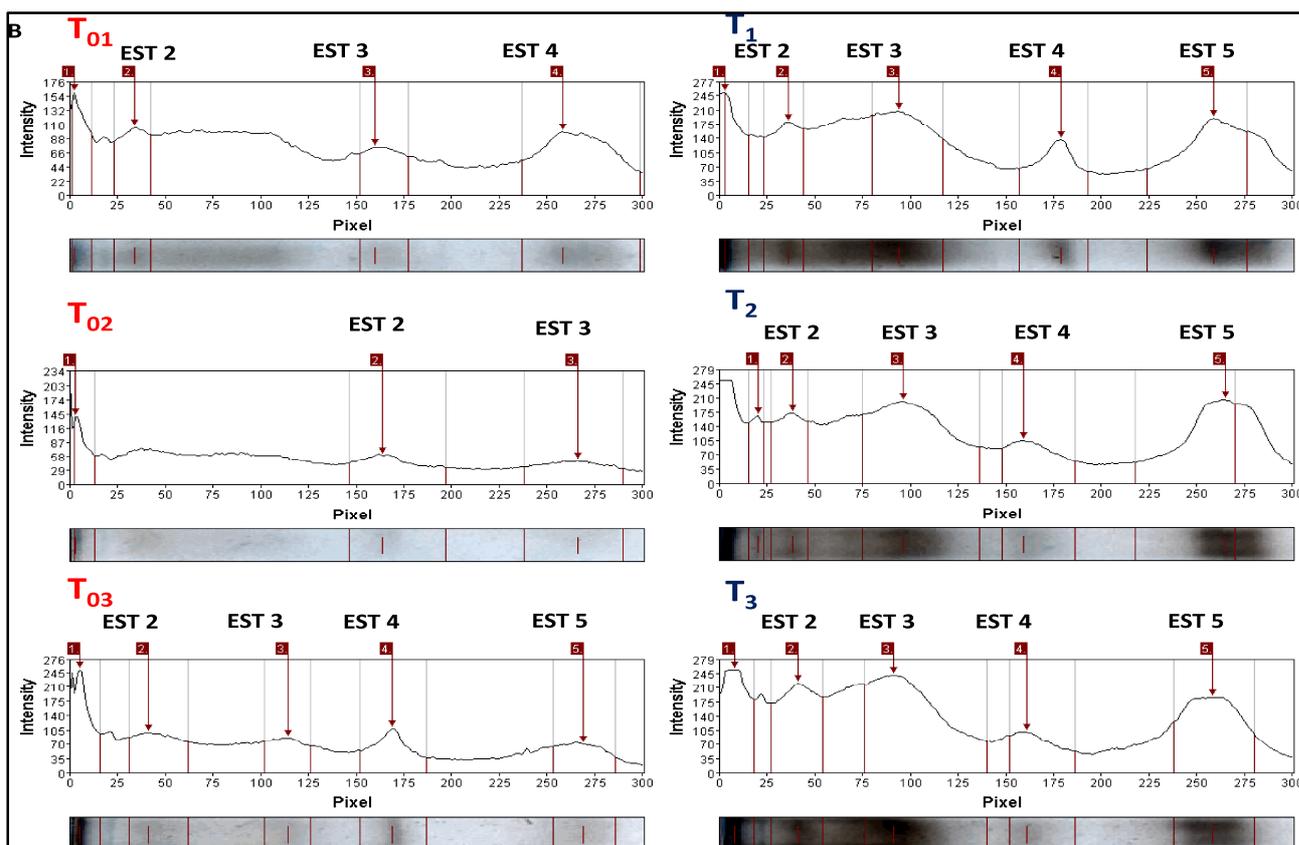
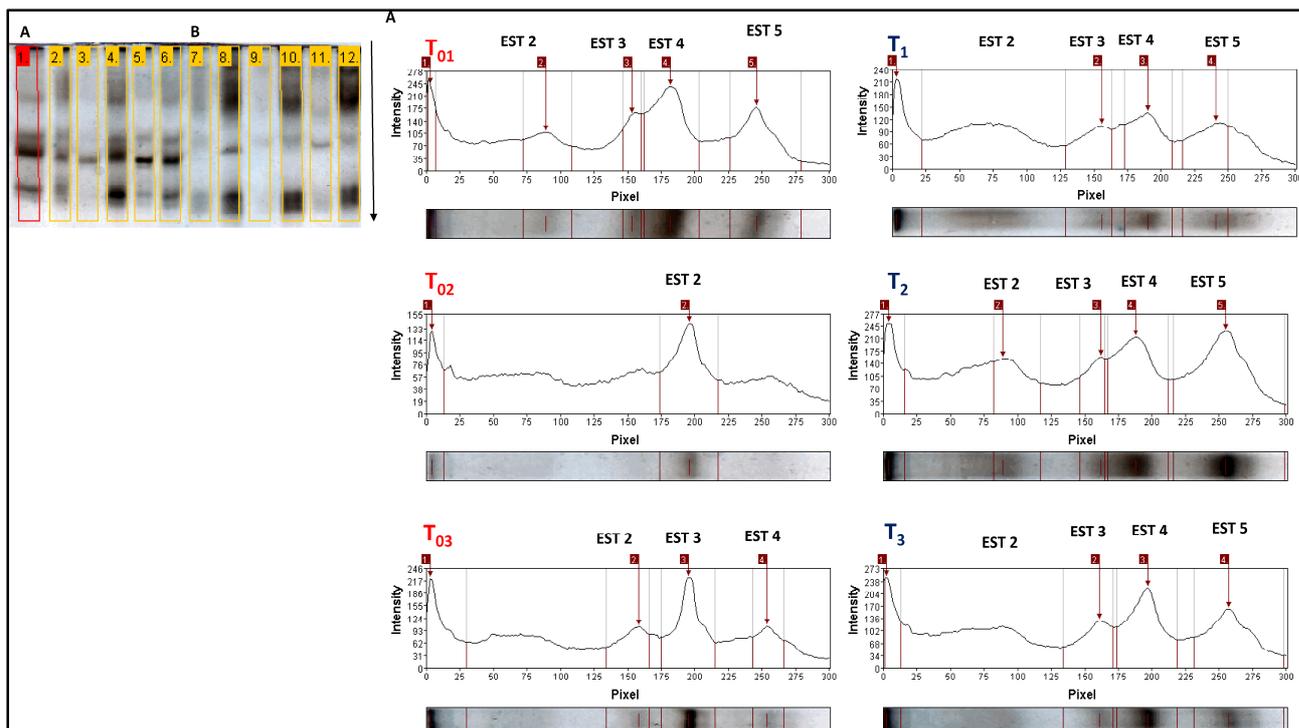
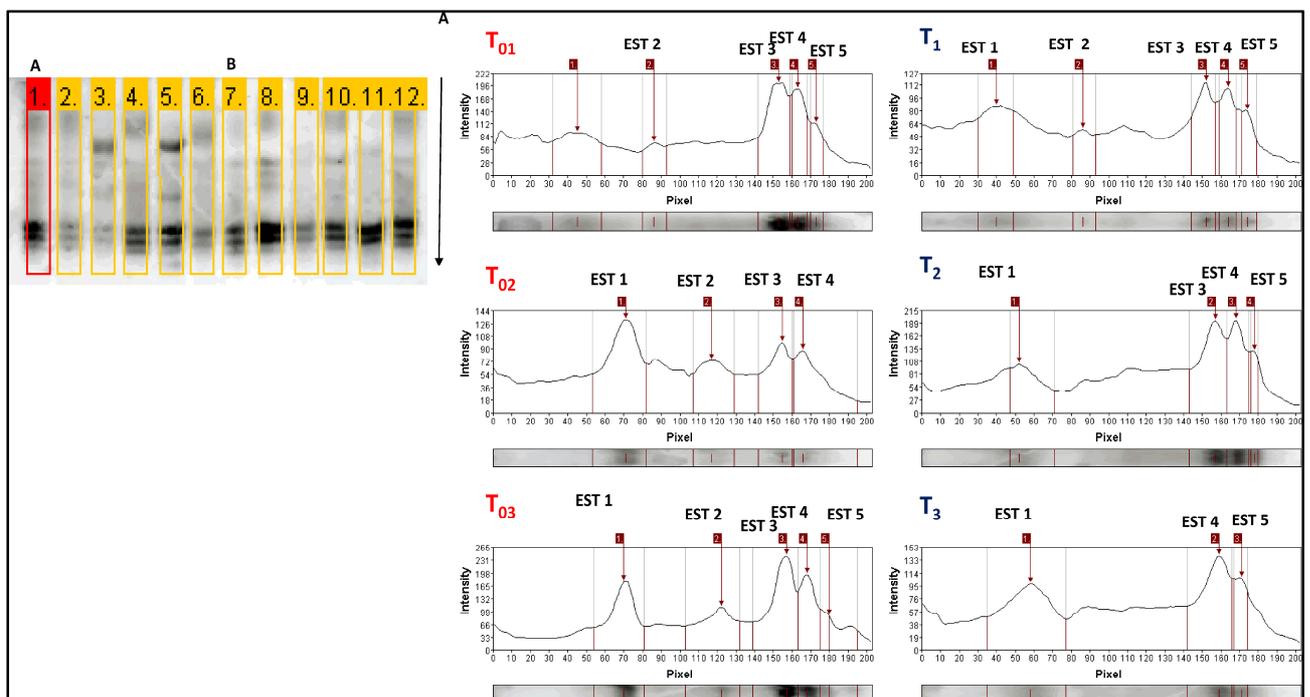


Figure 22. Profils des estérases chez *M. aculeata*, les lignes au niveau du gel analysé par GELANALYSER respectivement de droite à gauche, de 1 à 6: T01-T1, T02-T2, et T03-T3 pour Ac 15679 (A) et les lignes de 7 à 12 : T01-T1, T02-T2, et T03-T3 pour Ac 80 (B).

Les résultats de la figure 23 montrent que lorsque les plantes sont soumises à un stress de basse température, chez l'espèce *M. truncatula*, l'activité des estérases est plus intense en comparaison avec les lots témoins. L'écotype tolérant Tru 210 (Figure 23 B) présente une plus grande activité des estérases avec un nombre plus élevé (EST 1 à EST 7) d'isozymes révélée en comparaison avec l'écotype sensible Tru 26 de 1 à 5 (EST 1 à EST 5) (Figure 23 A). L'écotype sensible Tru 26 n'arrive pas à maintenir son activité des estérases au-delà de 8 jours de traitement par le froid, les isozymes EST 3, EST 4, et EST 5 dont leur activité étaient plus importante en T2 qu'en T1 s'est vue fortement régressée avec même une inhibition de EST 3 sous un stress de 11 jours à 4°C (Figure 23 A). Contrairement chez l'écotype tolérant Tru 210, l'activité des estérases est beaucoup plus maintenue et avec des expressions importante d'isoenzymes en nombre et en intensité et cette activité est maintenue lorsque le stress est plus important, particulièrement au niveau des estérases EST5 et EST 6 (Figure 23 B).



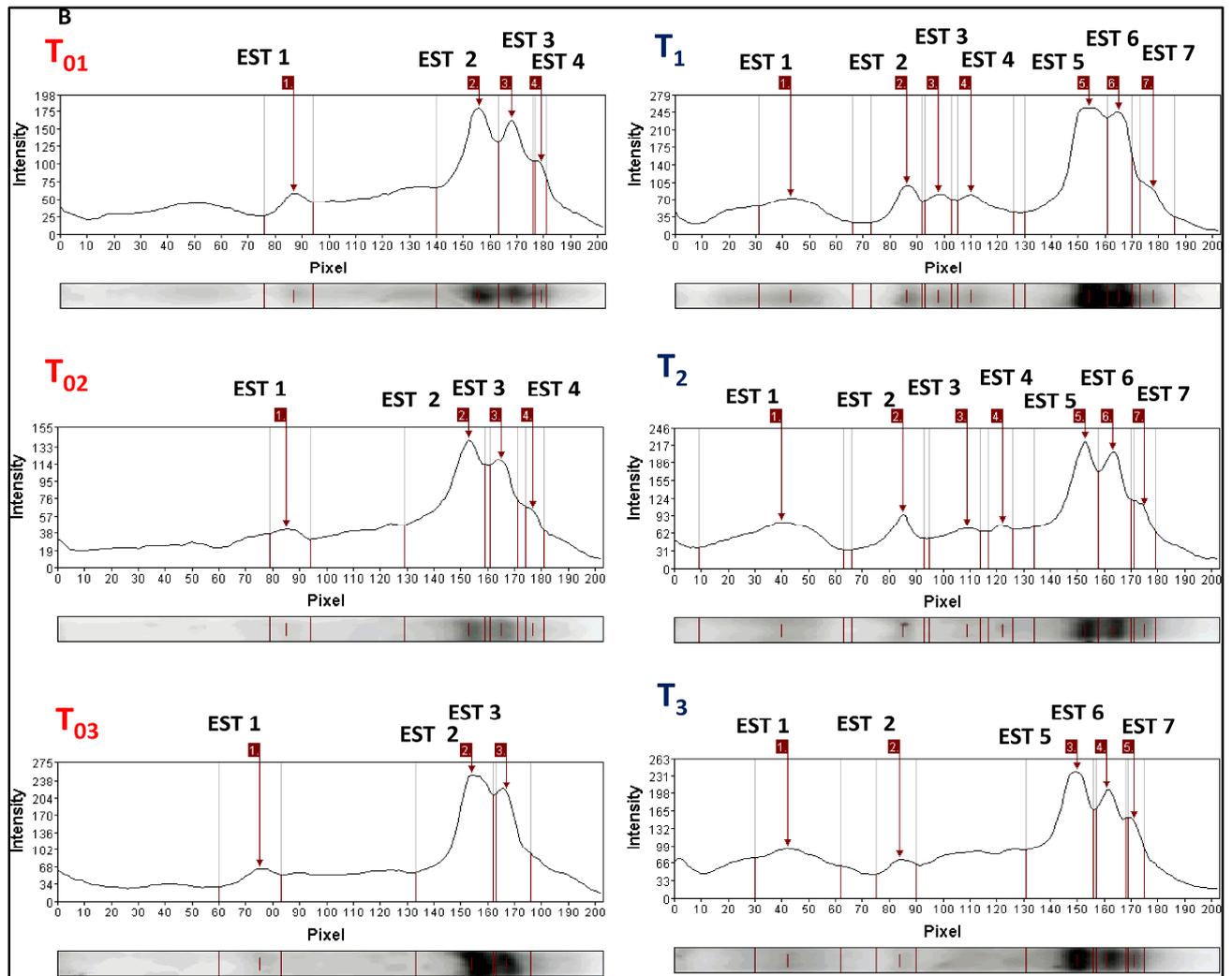
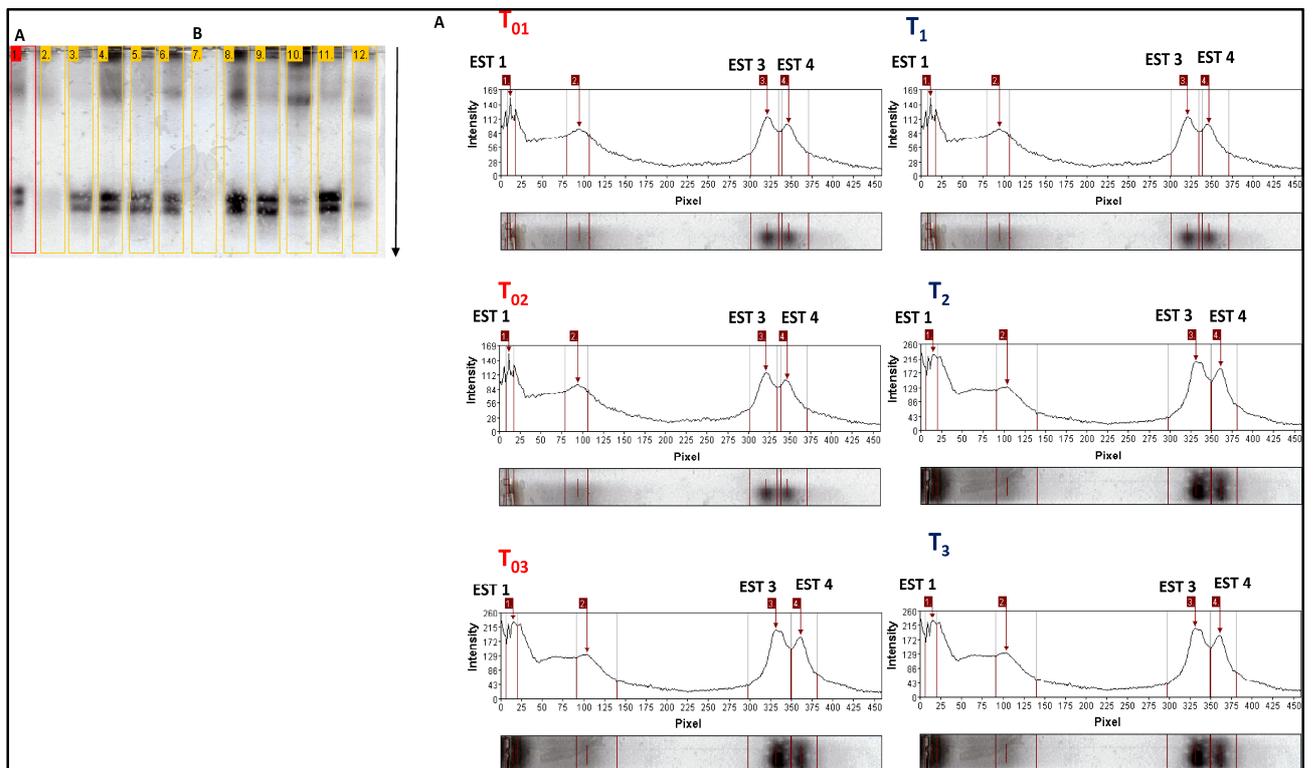


Figure 23. Profils des estérases chez *M. truncatula*, les lignes au niveau du gel analysé par GELANALYSER respectivement de droite à gauche, de 1 à 6: T01-T1, T02-T2, et T03-T3 pour Tru 26 (A) et les lignes de 7 à 12 : T01-T1, T02-T2, et T03-T3 pour Tru 210 (B).

Au niveau de l'espèce *M. polymorpha* (Figure 24 A et B), les profils montrent une variation dans l'expression des estérases avec un nombre de 1 à 4 isozymes (EST 1 à EST 4) chez le tolérant (Poly 213) (Figure 24 A) et chez le sensible (Pol 54) (Figure 24 B). Les plantes soumises à un stress de froid présentent des activités plus importantes en comparaison avec le témoin chez l'écotype tolérant Poly 213, et cette activité est plus grande et est maintenue dans le temps en T2 et T3 pour les isoenzymes EST 3 et EST 4 contrairement à l'écotype sensible Poly 54.

En ce qui concerne l'écotype sensible Poly 54, l'activité est d'une forte intensité en comparaison avec le témoin (EST 3 et EST 4) (Figure 24 B) lorsque le stress est d'une durée de 5 jours seulement, mais cette tendance est fortement inversée. En effet, l'activité diminue considérablement, avec des intensités plus faibles, lorsque le stress dure dans le temps (T2 et T3), avec une très faible activité de EST 3 et l'inhibition de l'expression de l'isoenzymes EST 4 en T3 (Figure 24 B). Il est clair donc, que l'écotype sensible n'arrive pas à maintenir une activité suffisante lorsque le stress est plus important.



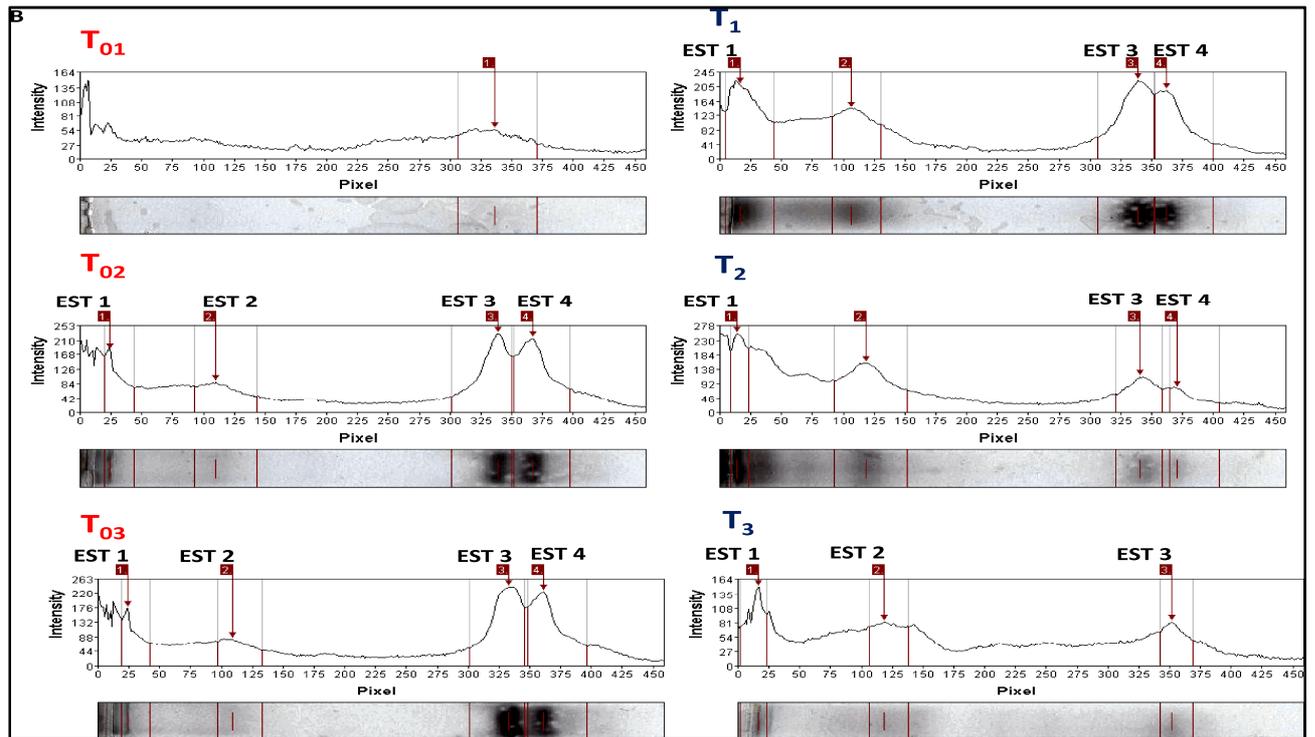


Figure 24. Profils des estérases chez *M. polymorpha*, les lignes au niveau du gel analysé par GELANALYSER respectivement de droite à gauche, de 1 à 6: T01-T1, T02-T2, et T03-T3 pour Poly 213 (A) et les lignes de 7 à 12: T01-T1, T02-T2, et T03-T3 pour Poly 54 (B).

Chez l'espèce *M. ciliaris* (Figure 25 A et B), le nombre des isoenzymes varie (EST 1-EST 5) en fonction de l'écotype tolérant ou sensible et de la durée du traitement sous stress. Les profils montrent aussi que l'activité est plus importante chez l'écotype tolérant Cil 124 avec une augmentation avec la durée du traitement particulièrement pour les isoenzymes EST 2, EST 3, et EST 4 (Figure 25 B). Contrairement chez l'écotype sensible Cil 123 l'activité est moins importante par rapport au tolérant, en comparaison avec les lots non traité l'activité est plus intense après 8 jours de traitement (T2) (EST 2, EST 3, et EST 4), mais cette intensité décroît en T3.

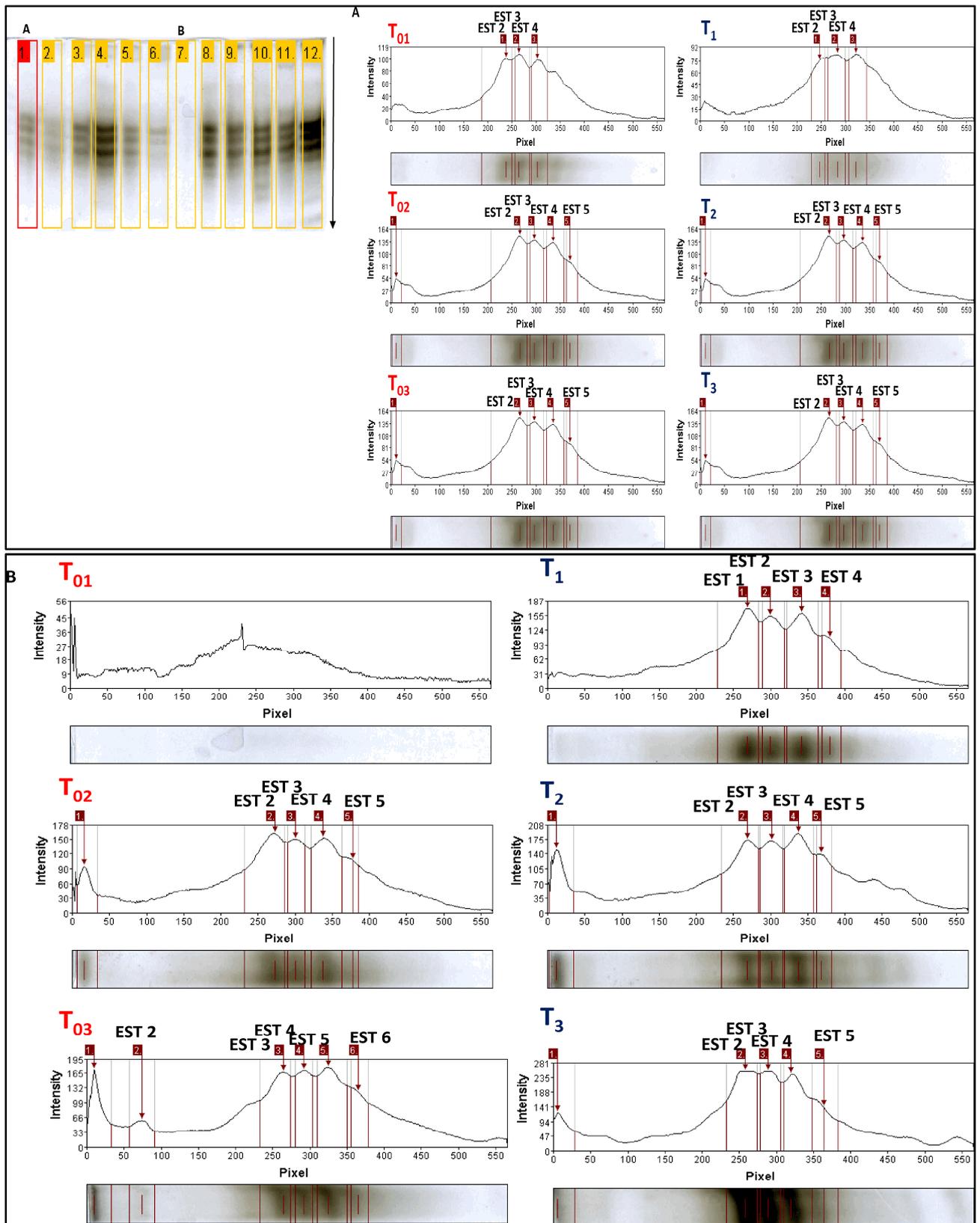


Figure 25. Profils des estérases chez *M. ciliaris*, les lignes au niveau du gel analysé par GELANALYSER respectivement de droite à gauche, de 1 à 6: T₀₁-T₁, T₀₂-T₂, et T₀₃-T₃ pour Cil 123 (A) et les lignes de 7 à 12 : T₀₁-T₁, T₀₂-T₂, et T₀₃-T₃ pour Cil 124 (B).

En conclusion, l'activité anti-oxydante des estérases est plus importante lorsque les plantes sont soumises à un stress de froid en comparaison avec les lots témoin. L'intensité des isoenzymes exprimées est plus grande au niveau des populations tolérantes que chez les populations sensibles. L'activité est beaucoup plus maintenue lorsque le stress est plus intense chez les tolérants que chez les sensibles.

V.4. Polymorphisme moléculaire et relation avec le stress froid

V.4.1. Nombre moyen d'allèles et hétérozygotie moyenne sur les différents loci marqueurs utilisés

On définit le taux moyen d'hétérozygotie d'une population comme la moyenne des taux d'hétérozygotie pour un grand nombre de gènes étudiés. Il constitue une mesure de la diversité génétique globale plus précise que le degré de polymorphisme. Mais celui-ci est également utile comme indicateur simple et direct du pourcentage de gènes polymorphes dans la population ou l'espèce. Le nombre moyen d'allèles détectés par locus quant à lui exprime la richesse allélique détectée par les locus marqueurs. Les paires d'amorces utilisées dans l'étude sont polymorphes (Tableaux 11-24). Un exemple de variation détectée par les SSR au niveau des populations étudiées est donné au niveau de la figure 26.

Le nombre d'individus traités dans l'étude moléculaire SSR est assez restreint, pour des raisons de faisabilité, certaines études de caractérisation de populations naturelles utilisent un nombre assez faible (Garcia-Fernandez et al. 2012). Un total de 113 allèles a été détecté au niveau des quatorze locus SSR. Le nombre d'allèles détectés par locus varie entre 4 (pour MTIC-079) à 13 (pour MTIC-432) (Tableau 10a) avec une moyenne de 8.07 allèles par locus. La richesse allélique moyenne est comprise entre 1.07 (Cil.126) et 2.50 (Poly. 54)(Tableau 10b). Les populations Poly 42 et Poly 54 présentent une hétérozygotie observée de 1.67 % et 3.33 % respectivement. Pour le reste des populations, les taux d'hétérozygotie sont nuls. Les taux de polymorphisme varient de 7.69 % (Cil 126) à 84.62 % (Poly 136). Les populations Ac. 15678, Poly 42, Poly 136 et Poly 54 ont des taux de polymorphisme qui dépassent les 50%, les autres populations ont des taux de polymorphisme inférieur à 50 % (Poly 213, Poly 42, et Poly 54) (Tableau 10 a et b). Les valeurs moyennes de $H_{n,b}$ détectées pour chaque population à travers les 14 locus SSR se rangent entre 0.10 et 0.52 respectivement, montrant ainsi une variabilité génétique moyenne intra-populations. Le pourcentage de polymorphisme au seuil 99% varie de 7% à 84.62 % respectivement, dénotant d'un grand polymorphisme chez ces populations à travers les locus marqueurs utilisés (Tableau 10 b). Les fréquences alléliques par population et par locus marqueur sont consignées dans les tableaux (34-47) (voir annexe).

Tableau 10a. Nombre d'allèles détectés par locus pour les différents microsatellites utilisés

Types D'amorce	Atp 456	FMT-13	MTIC-079	MTIC- 332	MTIC- 338	MTIC- 134	MTIC- 365
Nombre d'allèles exprimé	6	8	4	5	7	7	8
Types D'amorce	MTIC- 082	MTIC- 451	MTIC- 135	MTIC- 343	MTIC- 131	MTIC- 432	B14B03
Nombre d'allèles exprimé	7	12	8	12	6	13	10

Tableau 10b. Nombre moyen d'allèles détectés par locus pour les différentes populations étudiées

Populations	H _{n.b.} (Ecart-types)	H _{obs.} (Ecart-types)	99%	A
Cil. 126	0,0274 (0,0986)	0,0000 (0,0000)	0,0769	1,0769
Cil. 124	0,1231 (0,2422)	0,0000 (0,0000)	0,2308	1,3846
Cil. 123	0,1320 (0,2424)	0,0000 (0,0000)	0,2500	1,3333
Tru. 26	0,1026 (0,2048)	0,0000 (0,0000)	0,2308	1,3077
Ac. 15679	0,2000 (0,2804)	0,0000 (0,0000)	0,3571	1,3571
Ac. 80	0,2624 (0,2943)	0,0000 (0,0000)	0,5000	1,6429
Ac. 15678	0,4000 (0,3034)	0,0000 (0,0000)	0,7143	2,1429
Poly 57	0,2908 (0,3293)	0,0000 (0,0000)	0,4615	1,7692
Poly 213	0,2042 (0,2951)	0,0000 (0,0000)	0,3846	1,5385
Poly 42	0,3040 (0,2791)	0,0167(0,0582)	0,6667	1,8333
Poly 136	0,5260 (0,2632)	0,0000 (0,0000)	0,8462	2,3077
Poly 54	0,5140 (0,2862)	0,0333 (0,1163)	0,8333	2,5000

A : Nombre moyen d'allèles par locus. H_{n.b.} = H_{exp} corrigée pour le biais d'échantillonnage; H_{obs} = hétérozygotie observée. Polymorphisme au seuil (99%).

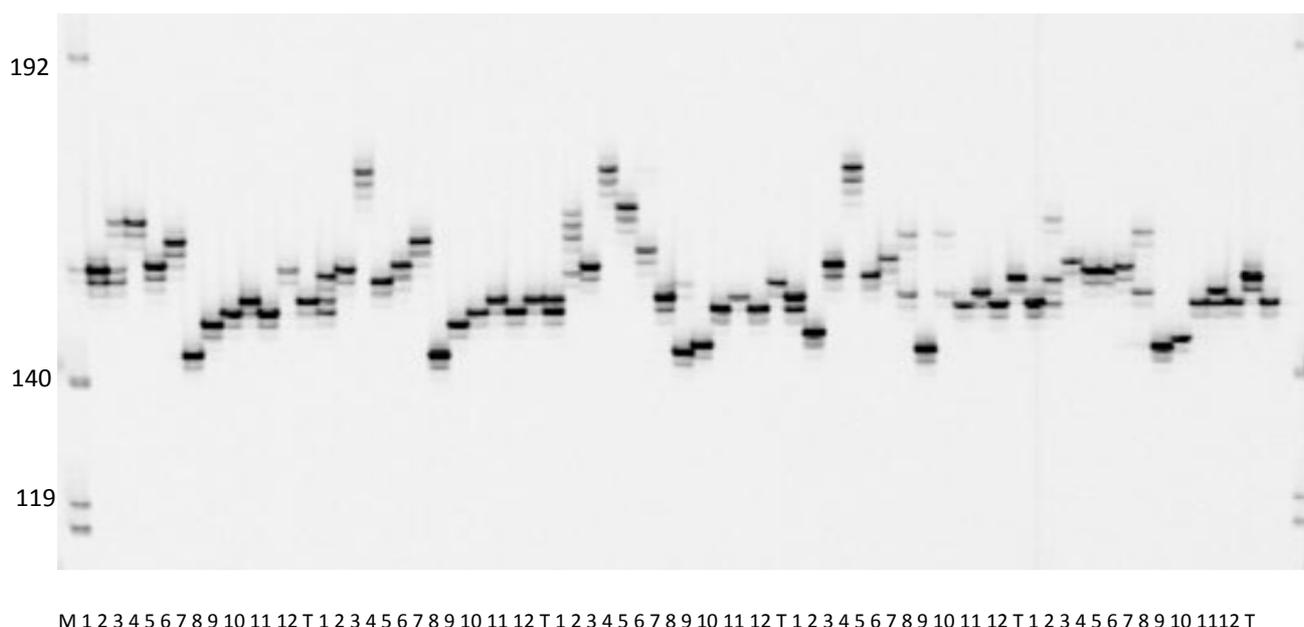


Figure 26. Variation au niveau du locus marqueur MTIC-451 sur douze populations de différentes espèces de *Medicago*. M. marqueurs de taille ; 1-12. Les populations respectivement pour les individus 1-5. T. les différents témoins respectivement Mercedes, Gabes, Jemalong et Magali.

La présence (+) ou absence (-) des allèles détectés chez les populations tolérantes et sensibles est consignée au niveau des différents tableaux (Tableau 11 à Tableau 25).

Au niveau du locus marqueur Mtic-432 (Tableau 12), l'allèle 181 n'est détecté que chez les populations sensibles (environnement de basse altitude), alors que les allèles 187 et 190 sont détectés au niveau des populations tolérantes et chez Tru26 qui est classé comme intermédiaire pour sa tolérance au froid mais originaire d'une haute altitude (1170 m).

Pour le locus Mtic-79 (Tableau 14), les allèles 133, 140 et 154 sont très intéressants du fait qu'ils sont uniquement détectés chez des écotypes tolérants et chez des espèces différentes de *Medicago*. Avia et al. (2013) trouvent que ce locus marqueurs est lié à un QTL de tolérance au froid chez des lignées recombinantes de *M. truncatula* issues de parents portants des allèles favorables pour la tolérance au froid.

Tableau 11. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur ATP 456

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac 15679	Ac 80	Ac 15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m			I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m
53							+	+			+	
111					+					+		
117	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+
119				+		+						+
122						+						
128					+		+	+	+	+	+	

T : tolérant, I : intermédiaire, S : sensible et cv. S.A. : cultivars Australie du Sud.

Tableau 12. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-432

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m			I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m
181	+	+	+								+	
187					+	+						+
190				+		+						
191											+	
195								+				
197							+					
200										+		
202											+	
204											+	
205							+					
207							+		+			
216									+		+	
236												

Tableau 13. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Fm-13

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m	I Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m	I Tiaret 1170 m
122							+					
128												+
131			+				+					
134				+			+					
137								+	+	+	+	+
146					+							
150										+		
157										+		

Tableau 14. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-79

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac 15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m	I Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S. Ahras 565 m	I Tiaret 1170 m
133				+	+		+					
136	+											
140							+	+				
154				+	+							

Tableau 15. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-332

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac 15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m	I Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m	I Tiaret 1170 m
110					+			+		+		
116	+	+		+			+			+		+
119				+			+					+
122							+					
129					+							

Tableau 16. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-338

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m		Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m
163					+							
166				+			+					
174												
179	+	+	+								+	+
185												+
188								+	+	+		+
192								+				+

Pour ce locus, l'allèle 179 est détecté chez les intermédiaires. Alors que l'allèle 163 n'est détecté qu'au niveau d'Ac 80.

Tableau 17. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-134

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m		Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m
180									+			+
181							+	+		+		+
185	+	+	+									
189				+								
191					+							
192												+
195					+	+						

Tableau 18. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-365

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac 15679	Ac 80	Ac15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m	T Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m	I Tiaret 1170 m
130										+		
137					+					+	+	
147			+									
148	+		+			+	+	+	+	+	+	+
150		+		+		+	+	+	+			
152				+								
154		+	+									
155								+				

Pour ce locus marqueur, l'allèle 155 semble spécifique à la population Poly 231, tolérante et originaire de haute altitude. Alors que l'allèle 154 n'est détecté que pour deux populations sensibles (Cil 123 et Cil 124) et d'altitude de faible à moyenne.

Tableau 19. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-82

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m	T Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m	I Tiaret 1170 m
132												+
133								+				+
134							+		+			+
139	+	+	+					+	+	+	+	
142				+	+					+		
146												+
150							+					

Tableau 20. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-451

Allèles	Cil126 I Guelma 290 m	Cil123 S Taref 16 m	Cil124 S S.ahras 565 m	Ac15679 T cv. S.A. -	Ac80 T Syrie -	Ac15678 T cv. S.A. -	Poly57 T S.ahras 565 m	Poly 213 T Tiaret 1170 m	Poly 42 Annaba 200 m	Poly136 I Jijel 10 m	Poly54 I S.ahras 565 m	Tru 26 I Tiaret 1170 m
	144					+	+					
149						+						
151							+	+	+		+	
153				+		+		+		+	+	
156		+	+							+		
158												+
159	+	+								+		+
161												+
163				+								
166			+									
168												
174		+										

Au niveau de Mtic-343 (Tableau 21), qui lui aussi est lié à un QTL de froid dans l'étude de Aia et al. (2013), les allèles 154, 155 et 156 sont révélés uniquement chez des populations tolérantes.

Tableau 21. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-343

Allèles	Cil126 I Guelma 290 m	Cil123 S Taref 16 m	Cil124 S S.ahras 565 m	Ac15679 T cv. S.A. -	Ac80 T Syrie -	Ac15678 T cv. S.A. -	Poly57 T S.ahras 565 m	Poly 213 T Tiaret 1170 m	Poly 42 Annaba 200 m	Poly136 I Jijel 10 m	Poly54 I S.ahras 565 m	Tru 26 I Tiaret 1170 m
	129										+	
140								+				
141											+	
142							+					
143					+				+	+		
145		+	+				+			+		
148	+	+	+				+		+		+	
150							+				+	
151					+	+						+
154				+		+						
155					+							
156					+							

Tableau 22. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-135

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A.† -	T Syrie -	T cv. S.A.† -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m		Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m
176									+		+	
178							+	+	+	+	+	
183	+	+	+								+	
187				+		+						+
189					+							
192												+
194	+				+	+						
198										+		

Tableau 23. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur Mtic-131

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m	Annaba 200 m	I Jijel (10 m)	I S.ahras 565 m	I Tiaret 1170 m
132	+	+	+								+	
135				+		+	+	+	+	+		
137						+			+			+
140									+			
141					+							
144					+	+						

L'allèle 132 n'est détecté qu'au niveau des sensible et intermédiaire (altitude basse à moyenne). Alors que l'allèle 135 est spécifique à des écotypes tolérants au froid.

Tableau 24. Les différents allèles détectés au niveau du locus marqueur B14B03

Allèles	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
	I Guelma 290 m	S Taref 16 m	S S.ahras 565 m	T cv. S.A. -	T Syrie -	T cv. S.A. -	T S.ahras 565 m	T Tiaret 1170 m	I Annaba 200 m	I Jijel 10 m	I S.ahras 565 m	I Tiaret 1170 m
158										+		
161					+							
165								+	+			
167											+	
170	+	+					+			+		+
172				+			+					
179							+		+			
181							+					
183												
185												

V.4.2. Relation entre locus marqueurs et tolérance au froid

Si on considère uniquement que les locus ne présentant pas des données manquantes (Tableau 26). Le niveau d'homozygotie est élevé pour toutes les espèces étudiées. Le niveau global de polymorphisme de *M. ciliaris* est inférieur à celui de *M. polymorpha* et *M. aculeata*. Cependant la comparaison n'est pas évidente car le nombre de populations étudiées est différent selon l'espèce.

Tableau 25. Allèles détectés chez les écotypes tolérants au locus marqueurs Mtic432, Mtic-079 and Mtic-131. Entre parenthèse (taille en pb).

Accessions	Cil126	Cil123	Cil124	Ac15679	Ac80	Ac15678	Poly57	Poly 213	Poly 42	Poly136	Poly54	Tru 26
Markers (allèles)	(T) (T) (T) (T) (T) (T) (T) (T)											
Mtic432												
(187)					+	+						
(190)				+		+						
Mtic079												
(133)				+	+			+				
(140)						+	+					
(154)				+	+							
Mtic131												
(135)				+		+	+	+	+			

(T), tolérant ; + : allèles détectés uniquement chez les écotypes tolérants.

Tableau 26. Nombre d'allèles détectés parmi les 9 marqueurs sélectionnés (sans données manquantes) et le pourcentage d'homozygotie chez les différentes espèces étudiées

Loci	<i>M. ciliaris</i>	<i>M. truncatula</i>	<i>M. aculeata</i>	<i>M. polymorpha</i>	Espèces
ATPase456	1(100%)*	1(100%)	5 (77%)	3 (50%)	6 (79%)
Mtic338	3 (85%)	1 (100%)	4 (92%)	5 (100%)	7(93%)
Mtic082	1(100%)	1 (100%)	2 (100%)	4 (67%)	7 (91%)
mtic451	5 (100%)	3 (100%)	5 (85%)	2 (75%)	12 (88%)
B14B03	1 (100%)	1 (100 %)	3 (100%)	5 (92%)	10 (98%)
mtic135	3 (92%)	2 (100%)	3 (100%)	2 (100%)	8 (98%)
mtic343	2 (100%)	2 (100%)	6 (92%)	6 (83%)	12 (93%)
mtic131	2 (92%)	2 (100%)	4 (100%)	4 (83%)	06 (93%)
Mtic432	1 (100%)	2 (80%)	2 (100%)	6 (83%)	13 (93%)
Total	19 (97%)	15 (98%)	34 (94%)	37 (81%)	81 (92%)

* Pourcentage d'homozygotie est indiqué entre parenthèse.

Au niveau de la figure 27, la structure des populations permet de différencier les 4 espèces. Au niveau de *M. aculeata* il existe une différenciation entre les quatre populations étudiées. Cela pose des questions sur l'origine de ces populations (considérée au départ comme des cultivars) et leur appartenance à une seule espèce. Pour des études plus approfondies il faudrait augmenter le nombre d'individus étudiés par population et le nombre de marqueurs. L'individu 12_1 (Figure 27) est atypique, il se pourrait qu'il soit hybride interspécifique ou un individu d'une autre espèce ?

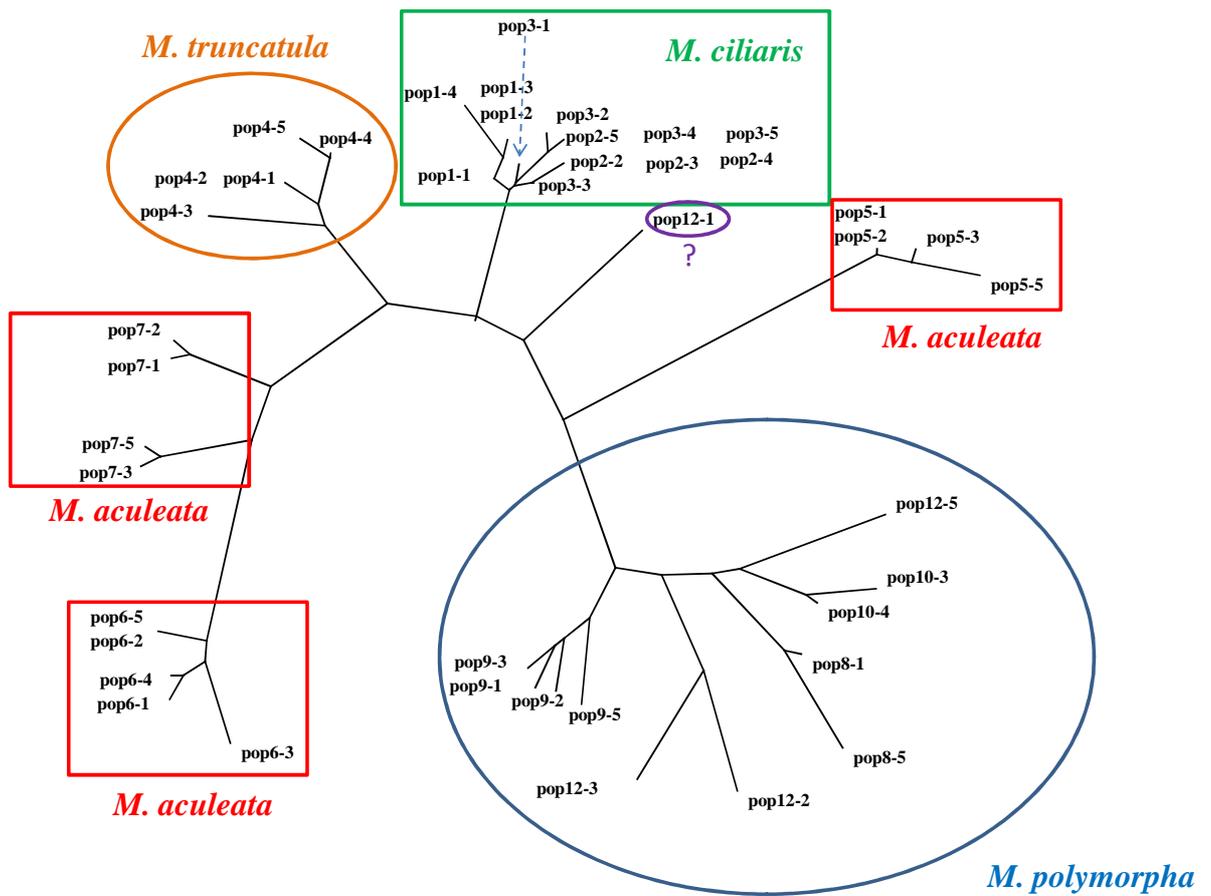


Figure 27. Arbre à partir des Distance de Nei standard (1972), sans données manquantes. Pop1, Cil126; Pop 2, Cil 123; Pop 3, Cil 124; Pop 4, Tru 26; Pop 5, Ac 15679; Pop 6, Ac 80; Pop 7, Ac 15678; Pop 8, Poly 57; Pop 9, Poly 213; Pop 10, Poly 42; Pop 11, Poly 136 and Pop 12, Poly 54.

VI. Discussion et Conclusion

VI.1. Analyse biométrique

L'effet du stress par de basses températures, chez les populations des différentes espèces de *Medicago*, engendre une forte variabilité de réponse pour la croissance post germinative des jeunes plantules, au niveau des différents caractères étudiés. Brunel et al. (2009) mettent, chez *Medicago truncatula*, en évidence une forte variabilité génétique pour la germination et la croissance post-germinative sous un stress de basse température. Le degré de tolérance, exprimé par le biais des différents ratios, est fonction de la nature de chaque population qu'elle soit tolérante ou sensible. Les ratios sont plus importants chez les populations tolérantes que chez les sensibles, et ce degré de tolérance est d'autant plus important quand la durée d'acclimatation est d'autant plus longue. Meyer et Badaruddin (2001) trouvent que les jeunes plantules de *Medicago sativa* acclimatés à 4°C pendant une semaine ont un degré de tolérance au gel plus important. D'après Bertin et al. (1996), les traitements de plus longue durée permettent d'identifier les génotypes les plus tolérants tandis que les traitements de durées plus courtes permettent de distinguer les génotypes les plus sensibles des intermédiaires, et le criblage précis d'un grand nombre de génotypes à ce stade requière l'utilisation de plusieurs durées de traitements par le stress.

D'autre part, il existe une relation entre ce degré de tolérance et l'origine géographique des populations étudiées. Les populations de haute altitude ont de meilleures capacités d'acclimatation au froid. Selon Baruah et al. (2009), le degré de tolérance est associé à la distribution géographique. Une explication possible de la non-concordance entre le degré de tolérance et l'altitude du site d'origine pour certains génotypes, serait une installation récente de la population sur le site de récolte.

VI.2. Analyse de l'activité isoenzymatique

A notre connaissance, il n'y a pas eu d'étude en ce qui concerne les activités antioxydantes des peroxydases et des estérases ainsi que leurs expressions sous un régime de basse température chez les populations naturelles du genre *Medicago*. Les résultats de cette étude ont pu montrer que le développement des peroxydases en conditions normales est important durant les premiers stades post-germinatifs. Les travaux de Bogdanovich et al. (2008) arguent pour cet aspect, et montrent que l'activité des peroxydases, chez *C. muralis*, est très importante lors des premiers stades de croissance de la jeune plante et qu'elle n'a aucune relation avec la germination des graines. Quant à Moncousin et Ducreux (1984) montrent, chez *Cynara*

scolymus L., que l'activité des peroxydases varie lors des phases d'induction et augmente considérablement lors de l'initiation racinaire pour se voir décroître avec l'âge de la plante. Lorsque les plantes sont soumises au stress par basse température, l'activité des peroxydases augmente considérablement au début du stress et décroît avec la durée du traitement. Cette diminution est plus marquée chez les populations sensibles que chez les populations tolérantes. Dai et al. (2009) stipulent que chez les cultivars sensibles et les cultivars tolérants d'orge que l'activité des peroxydases est plus importante au niveau des plantes acclimatées au froid que chez les plantes non-acclimatées. Cet aspect est noté par plusieurs auteurs, Nazari et al. (2012), chez le pois chiche (*Cicer orientum*), Javadian et al. (2010), chez le blé, Moieni-Korbekandi et al. (2013), chez des cultivars de colza de printemps (*Brassica napus* L.).

Concernant l'expression des isoenzymes peroxydasique et estérasiques, l'examen des profils obtenus montre que quelle que soit la durée du traitement, le génotype ou le système enzymatique, les profils témoins diffèrent, par l'intensité des bandes, des profils des lots traités. Les résultats montrent aussi que l'expression et le nombre d'isoenzymes des peroxydases mises à contribution dans la neutralisation des effets néfastes du stress est tributaire de la nature de l'écotype et de la sévérité du stress. L'expression est plus importante et maintenue dans le temps chez les tolérants au froid que chez les sensibles. A titre d'exemple chez *M polymorpha*, l'isoforme POD 2 n'est exprimée que chez l'écotype tolérant Poly 136 alors qu'elle est inhibée chez le sensible. Cet aspect est souligné aussi dans l'expression des estérases. Ce résultat est en accord avec celui de l'étude sur *Brassica napus* réalisée par Zou et al. (2007) qui rapportent une augmentation significative de l'activité des estérases et des peroxydases à la suite d'un traitement par 4 °C, et notent en même temps que l'activité des peroxydases fluctue chez le témoin sensible, en diminuant significativement et en augmentant faiblement, alors qu'elle est constamment maintenue à un niveau élevé chez le tolérant. D'après Tasgin et al. (2006), il est crucial que les plantes puissent maintenir les activités de ces enzymes pour s'accommoder de ces stress oxydatifs. De-Carvalho et al. (2003) signalent que des changements dans l'expression et l'activité des estérases sont observés sous stress abiotiques et Syros et al. (2005) trouvent de nouveaux isoformes d'estérases exprimés sous l'effet du froid chez le laurier rose (*Nerium oleander*). Dans une étude sur la tolérance à la salinité chez *Arachis hypogea* L., Hassanein (1999) trouve que sous l'effet du sel, le nombre et l'intensité des bandes augmentent sur les profils des estérases, et ces variations sont spécifiques des tissus. De même, Jang et al. (2004) ont montré que l'activité des peroxydases

dans les cellules végétales est souvent modulée par les stress environnementaux, à la fois biotiques et abiotiques.

Ceci s'explique par le fait que lors de la survenue d'un stress, il est connu que les concentrations des formes réactives de l'oxygène ainsi que des radicaux libres sont augmentées (Scebba et al. 1998). Baek et al. (2000) indiquent que l'activité des peroxydases augmente avec l'élévation de la production d' H_2O_2 chez les plantes transgéniques. Ces molécules sont impliquées non seulement dans le développement des symptômes, mais aussi dans la signalisation lors de la réponse des plantes aux stress (Parent et al. 2008). Aussi les plantes réagissent face au stress, qui occasionne la production de ces métabolites toxiques, par une augmentation des systèmes enzymatiques antioxydants. Certains auteurs signalent que sous les conditions de stress, il est vital pour toutes les espèces d'ajuster leurs systèmes antioxydants pour changer la concentration des formes réactives de l'oxygène (Janda et al. 2003; Ashraf et Harris, 2004; Roy et Mandal, 2005). D'ailleurs un équilibre entre la production de radicaux oxygénés et leur destruction est requis si la fonction et l'efficacité métabolique doivent être maintenues à la fois dans les conditions normales et de stress (Gulen et Eris, 2004). D'autant que les formes réactives de l'oxygène (ROS), sont particulièrement délétères vis-à-vis de tous les constituants cellulaires (ADN, protéines, lipides, etc.). Les ROS sont considérées comme des molécules phytotoxiques qui peuvent être impliqués dans les processus de vieillissement des plantes (Parent et al. 2008).

Ashraf et Harris (2004) et Xiong et Zhu (2002) ont trouvé également que plus l'activité des enzymes est augmentée et maintenue sous stress et plus le génotype peut être considéré comme tolérant.

De même Parvanova et al. (2004) considèrent que la tolérance au stress par le froid est corrélée avec une capacité accrue à éliminer et détoxiquer les formes réactives de l'oxygène. Koretsky (2001) trouve que *Fusariumoxysporum* induit chez le soja, particulièrement à basse température, l'expression des estérases chez les deux variétés (résistante et sensible) mais la réponse est plus forte et plus rapide chez la variété la plus résistante.

D'après Kathke et Bruelheide (2010) en principe la tolérance au froid repose sur trois composantes déterminantes ; une composante génétique qui détermine la limite absolue de la tolérance et qui est contrôlée par plusieurs gènes, une autre épigénétique et une dernière liée à l'adaptation physiologique des individus aux conditions environnementales.

Chez *Pinus sylvestris* L., Beck et al. (2007) ont trouvé une variabilité génétique considérable de la tolérance au froid et en même temps ils parviennent à la conclusion que la stratégie adoptée pour répondre au stress peut être considérée comme une caractéristique génotypique

ou même individuelle. Selon Kuk et al. (2003) le mode de protection contre le froid peut-être même spécifique du tissu ; certaines formes d'enzymes antioxydants protègent les feuilles alors que d'autres protègent les racines.

Jang et al. (2004) ont montré chez la patate douce (*Ipomoea batatas*), que certains gènes de peroxydases sont induits par le stress alors que d'autres ne le sont pas. Ils mettent en évidence l'implication majeure d'un seul gène (Swap4) dont l'expression est fortement induite sous stress parmi l'ensemble des gènes qui déterminent les peroxydases. Dans notre étude, sur les profils de peroxydases des lots traités, on peut noter également que certaines bandes présentent une intensité particulièrement augmentée par rapport aux autres bandes du même profil. Ce type de bandes a été repéré chez les cultivars tolérants. Ces isoenzymes peuvent être considérés comme des formes plus spécialement impliqués dans la réponse au stress par rapport aux autres. Chez l'arachide, Kumari et al. (2006) ont trouvé que l'exposition de jeunes plantes à l'acide jasmonique induit les enzymes antioxydants et plus spécifiquement deux isomorphes de peroxydase sur les quatre observés.

Sur les profils des estérases, on a observé une variation qualitative entre témoin et traité. Les témoins de 8 et 11 jours présentent un profil différent par rapport au témoin de 5 jours. Les nouvelles bandes observées pourraient correspondre à une forme enzymatique qui ne s'exprime qu'une dizaine de jours après la germination, sachant que les deux types de systèmes enzymatiques, les estérases et les peroxydases présentent une expression différentielle en fonction du stade de développement.

Chez *Chenopodium rubrum*, Ducic et al. (2003) notent que les peroxydases se développent graduellement et que l'augmentation de leur activité après la protusion de la radicule est corrélée à une production *de novo* d'isoenzymes. La variation observée peut correspondre à une expression différentielle empêchée par le stress chez le traité que l'on observe uniquement chez le témoin. Cela permet de supposer que les formes constitutives des peroxydases sont probablement plus engagées dans la réponse au stress que les formes non constitutives qui ne semblent pas indispensables durant le stress.

Cipollini (1997) dans une étude sur *Phaseolus vulgaris*, parvient à une déduction similaire, il pense que l'augmentation de l'activité totale des peroxydases est apparemment due soit à une augmentation de la synthèse d'isoenzymes présents constitutivement soit à leur surexpression par des processus tels que les altérations induites dans la solubilité des enzymes. De même Rahnama et Ebrahimzadeh (2005) parviennent à la conclusion suivante, la tolérance à la salinité chez la pomme de terre est conférée à la fois par l'apparition de nouveaux isoenzymes

de peroxydases mais également par l'augmentation de l'activité du pool d'enzymes constitutifs. Cependant comme le remarque Jang et al. (2004), la complexité des processus physiologiques dans lesquels les peroxydases sont impliquées rend difficile la compréhension de la fonction spécifique de chacune de ces enzymes.

Les travaux de Zou et al. (2007) ont montré que l'activité des peroxydases, s'accroît sous l'effet de stress froid chez les deux variétés étudiées. Mais cette augmentation est plus importante chez la variété tolérante que chez la variété sensible.

L'ensemble des variations observées à la fois dans l'intensité des bandes et dans l'expression différentielle induite par le stress peuvent être utilisées pour cribler les génotypes sensibles ou tolérants. Syros et al. (2005) rapportent qu'une expression différentielle des estérases peut être utilisée comme marqueur biochimique.

VI.3. L'analyse moléculaire

L'approche moléculaire, qui reste une première ébauche, consiste en une caractérisation de la variabilité génétique de populations annuelles de luzerne algériennes vis-à-vis de la tolérance au froid en fonction de certains locus marqueurs de type SSR.

Il ressort de cette approche que les locus marqueurs utilisés sont polymorphes. Certains allèles détectés au niveau des locus marqueurs Mtic-131, Mtic-432, Mtic-079 semblent avoir une relation avec la tolérance au froid et l'origine géographique des écotypes. Au niveau de ces marqueurs, certains allèles ne sont détectés que chez les écotypes classés comme tolérants. Ces résultats semblent concordés avec ceux d'Avia et al. (2013) qui montrent, chez des lignées recombinantes de *M. truncatula*, dérivées de croisements entre deux accessions acclimatées à basse température et évaluées pour leur tolérance au froid par des caractères morphologiques, que les QTL pour la tolérance au froid à effet additif sont associés avec ces marqueurs (Mtic-131, Mtic-432, Mtic-079) situés au niveau des groupes de liaison LG1, LG4 et LG6. Ces allèles favorables pour ces effets additifs de tolérance au froid, sont portés par les deux parents, suggérant que ces écotypes ayant une bonne capacité d'acclimatation au froid, contribuent efficacement à une bonne tolérance au gel. Ces auteurs montrent qu'il existe une relation entre l'origine géographique des populations de *M. truncatula* et leur tolérance au froid. La majorité des populations originaires de haute altitude se sont révélées plus tolérantes au froid que celles originaires de basse altitude.

Badri et al. (2007) montrent, dans une étude de diversité génétique, chez *Medicago ciliaris*, à l'aide de marqueurs morphologiques et locus marqueurs SSR, que la divergence des populations détectée est due à l'adaptation locale *via* les interactions génotypes/facteurs éco-géographiques (texture du sol, altitude et climat), et que les populations de cette espèce ont une grande plasticité d'adaptation à des environnements très variés.

Cui et al. (2013) trouvent qu'il existe une association positive entre des caractères morphologiques et les marqueurs SSR en relation avec l'origine des populations et leur tolérance au froid.

Lazerek et al. (2009) trouvent que, chez des populations annuelles de *M. truncatula*, sept microsatellites sur dix-huit utilisés avaient une corrélation avec l'altitude, la pluviométrie et la salinité de l'environnement d'origine de ces populations. Ces auteurs suggèrent aussi que ces locus marqueurs sont liés à des gènes impliqués dans l'adaptation à l'altitude.

Dias et al. (2008) ont souligné certaines concordances entre les caractères morphologiques et les marqueurs SSR, chez le trèfle rouge (*Trifolium pratense* L.). Badri et al. (2008) étudiant la variabilité génétique chez des populations naturelles de *Medicago laciniata* Mill. (Fabaceae), trouvent que la diversité morphologique et la diversité moléculaire sont associées significativement avec les facteurs éco-géographiques.

Touil et al. (2008), en étudiant la diversité génétique, chez des populations cultivées de *Medicago sativa* L., montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre marqueurs SSR et l'origine géographique des populations.

Par contre Bagavathiannan et al. (2010) en investiguant la diversité génétique, de certaines populations de luzerne naturelles et cultivées, ne trouvent pas de corrélations entre les variables phénotypiques et les marqueurs SSR utilisés. Bajaracharya et al. (2006) montrent qu'il n'y a pas d'association entre caractère morphologique et SSR analysés, chez des populations de riz au Népal se trouvant à haute altitude.

VI.4. Conclusion

L'effet d'un traitement par le froid est investigué chez différentes populations annuelles de *Medicago*, l'étude a mis en évidence une très grande variabilité génétique pour la tolérance au froid. Les trois traitements sont nécessaires et permettent un bon criblage en conditions contrôlées puisque des génotypes tolérants et sensibles ont été détectés concordant avec leur site d'origine preuve que la méthode de criblage est efficace.

Les écotypes tolérants vis-à-vis d'un stress de basse température présente les meilleurs ratios racines tiges, dénotant ainsi d'une meilleure capacité d'acclimatations au froid, et par voie de conséquence de meilleures aptitudes à tolérer des températures encore plus basse voir gélive. A partir de caractères morphologiques simples, on peut aisément sous conditions contrôlées, mettre en évidence le degré d'acclimatation d'écotypes de *Medicago* vis-à-vis au froid et par voie de conséquence leur tolérance à des températures très basses.

Des variations d'ordre quantitatif et qualitatif observées sur les profils estérase et peroxydases attribuées à un effet du stress ont été mises en évidence. L'effet du stress engendre une activité isoenzymatique pour rétablir l'équilibre ionique. L'expression isoenzymatique est très importante et est maintenue pendant toute la durée du stress au niveau des génotypes tolérants, alors que l'activité ainsi que les intensités d'expression ne sont pas maintenues chez les génotypes sensibles. Les isoenzymes synthétisés constitutivement paraissent les plus impliqués dans la réponse au stress.

Aussi, dans les études futures sur la tolérance au stress par basse température, l'analyse spéciale des formes constitutives de ces formes enzymatiques avec une évaluation précise du niveau de leur activité pourrait constituer un moyen encore plus efficace pour cribler les génotypes tolérants et sensibles.

L'étude moléculaire est très prometteuse, pour détecter et sélectionner des écotypes tolérants au froid grâce à des locus marqueurs, particulièrement Mtic-131, Mtic-432, Mtic-079, pour être utilisés dans la création de lignées tolérantes au froid, mérite d'être plus poussé par l'analyse d'un nombre plus important d'individus, d'ailleurs des travaux sont actuellement en progression pour confirmer ces résultats. Le fait qu'il ne semble pas y avoir de structuration entre populations pour *M. polymorpha* et *M. ciliaris* (à confirmer avec plus d'individus et de marqueurs) alors qu'il existe des différences entre populations d'une même espèce d'acclimatation au froid est encourageant pour la réalisation d'une étude d'association entre l'acclimatation au froid et le polymorphisme moléculaire. En parallèle des études de

QTL sur des lignées recombinantes entre individus tolérants et non tolérants aux gelées d'origine géographique différente permettraient de mieux comprendre le déterminisme génétique de ce caractère. En effet, il serait très intéressant de voir si l'acclimatation au froid a des origines génétiques similaires ou non selon les populations au sein d'une espèce et entre espèces.

Références bibliographiques

- Abdelguerfi A., Bounejmate M., Gaddes N.E., Laouar M., Tazi M. 2000. Présent et futur des pâturages et des légumineuses fourragères en région méditerranéenne : cas du Nord de l'Afrique et de l'Ouest de l'Asie. In: Sulas L. (Ed.). *Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses*. Zaragoza: CIHEAM, 2000. p. 461-467. (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 45). 10. Meeting of the Mediterranean Sub-Network of the FAO-CIHEAM Inter-Regional Cooperative Research and Development Network on Pastures and Fodder Crops, 2000/04/04-09, Sassari (Italy).
- Abdelguerfi, A. 2002. Ressources génétiques d'intérêt pastoral et/ou fourrager : Distribution et variabilité chez les légumineuses spontanées (*Medicago*, *Trifolium*, *Scorpiurus*, *Heydysarum* et *Onobrychis*) en Algérie. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences agronomiques. INA. El Harrach. Alger 432 pp.
- Ahmad, P., M. Serwat and S. Sharma. 2008. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants, *J. Plant Physiol.* 51(3): 167-173.
- Akpinar, B.A., Avsar, B., Stuart, J. Lucas and H. Budak. 2012. Plant abiotic stress signaling. *Plant Signaling & Behavior* 7:11, 1–6.
- Alexieva, and D. Djilianov. 2004. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:57–63.
- Artus N N, Uemura M, Steponkus P L, Gilmour S J, Lin C T, Thomashow F. 1996. Constitutive expression of the cold regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 13404–13409.
- Ashraf, M. and P.J.C. Harris. 2004. Potential biochemical indicator of salinity tolerance in plants. *Plan Science* 166: 3-16.
- Avia K. and I. Lejeune-Hénaut. 2007. Response of *Medicago truncatula* to abiotic stress *Medicago truncatula*. *Medicago truncatula* handbook pp: 1-32.
- Avia, K., M.-L. Pilet-Nayel, N. Bahrman, A. Baranger, B. Delbreil, V. Fontaine, C. Hamon, E. Hanocq, M. Niarquin, H. Sellier, C. Vuylsteker, J.-M. Prospero and I. Lejeune-Hénaut. 2013. Genetic variability and QTL mapping of freezing tolerance and related traits in *Medicago truncatula*. *TheorAppl Genet.* DOI 10.1007/s00122-013-2140-7.

- Baaziz M., N. Qacif, K. Bendiab and A. Aouad. 2006. Les peroxydases des plantes. Aspect théorique et application pratique. *Département de Biologie Faculté des Sciences et Techniques de Ghéliz*. Maroc.
- Badri, M., A. Zitouni, H. Ilahi, T. Huguet and M. Aouani. 2008. Morphological and microsatellite diversity associated with ecological factors in natural populations of *Medicago laciniata* Mill. (Fabaceae). *Journal of genetics*. 87: 241-255.
- Badri, M., A. Zitouni, S. Soula, H. Ilahi, T. Huguet and M. E. Aouani. 2007. Low levels of quantitative and molecular genetic differentiation among natural populations of *Medicago ciliaris* Kroch. (Fabaceae) of different Tunisian eco-geographical origin. Doi: 10.1007/s10592-007-9483-z
- Baek, S.H., I.S. Kwon, T.I. Park, S.J. Yun, J.K. Kim, and K.G. Choi. 2000. Activities and isozyme Profiles of antioxidant enzymes in Intercellular Compartment of overwintering Barley leaves. *Journal of Biochemistry and molecular Biology* 33: 385-390.
- Bagavathiannan, M.V., B. Julier, P. Barre, R.H. Gulden and R.C. Van Acker. 2010. Genetic diversity of feral alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations occurring in Manitoba, Canada and comparaison with alfalfa cultivars: an analysis using SSR markers and phenotypic traits. *Euphytica*. 173: 419-432.
- Bajracharya, J., K.A. Steele, D.I. Jarvis, B.R. Sthapit and J.R. Witcombe. 2006. Rice landrace diversity in Nepal: Variability of agro-morphological traits and SSR markers in landraces from a high-altitude site. *Field Crops Research* 95: 327-335.
- Baraket, G., K. Chatti, O. Saddoud, A.B. Abdelkarim, M. Mars, M. Trifi and AS Hannachi. 2010. Comparative assessment of SSR and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of Fig, *Ficus carica* L., genetic resources in Tunisia. *Plant Mol Biol Rep*. doi:10.1007/s11105-010-0217-x
- Baruah, A. R., Ishigo-Oka, N., Adachi, M., Oguma, Y., Tokizono, Y., Onishi, K. and Sano, Y. 2009. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica*. 165: 459-470.
- Baruah, A. R., K. Onishi, Y. Oguma, N. Ishigo-Oka, N. Uwatoko and Y. Sano. 2011. Effects of acclimation on chilling tolerance in Asian cultivated and wild rice. *Euphytica* 181: 293-303.

- Baruah, A. R., N. Ishigo-Oka, M. Adachi, Y. Oguma, Y. Tokizono, K. Onishi, and Y. Sano. 2009. Cold tolerance at the early growth stage in wild and cultivated rice. *Euphytica* 165: 459-470.
- Beck, E.H., S. Fettig, C. Knake, K. Hartig, and T. Bhattarai. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *J. Biosci* 32: 501–510.
- Bernardi, R., C. Nali, P. Ginestri, C. Pugliesi, G. Lorenzini, and L. Durante. 2004. Antioxydant enzyme isoforms on gels in two poplar clones differing in sensitivity after exposure to ozone. *Biologia Plantarum* 48, no. 1: 41-48.
- Bertin, P., J.M. Kinet, and J. Bouharmont. 1996. Evaluation of chilling sensitivity in different rice varieties. Relationship between screening procedures applied during germination and vegetative growth. *Euphytica* 89: 201-210.
- Betty, M., W.E. Finch-Savage, G.J. King and J.R. Lynn, 2000. Quantitative genetic analysis of seed vigour and pre-emergence seedling growth traits in *Brassica oleracea*. *New Phytol.* 148: 277-286.
- Bílková J., J. Albrechtová and J. Opatrná 1999. Histochemical detection and image analysis of nonspecific esterase activity and the amount of polyphenols during annual bud development in Norway spruce. *Journal of Experimental Botany* 35: 1129–1138.
- Blondel, J. and J. Aronson. 1999. Biology and wildlife in the Mediterranean Region. Oxford University Press, Oxford.
- Bogdanovic, J., K. Kadotic, and A. Mitrovic. 2008. Changes in activities of antioxidant enzymes during *Chenopodium murale* seed germination. *Biologia Plantarum* 52, no. 2: 396-400.
- Boudet, A.M. 2000. Lignins and lignification: selected issues. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 81-96.
- Bounejmate, M., S.P. Loss and A.D. Robson. 1994. Effects of temperature and frost on genotypes of *Medicago truncatula* L. and *Medicago aculeata* L. from contrasting climatic origins. *Journal of Agronomy and Crop Science* 172 (4): 227-236.
- Bourion, V., I. Lejeune-Hénaut, N. Munier-Jolain and C. Salon. 2003. Cold acclimation of winter and spring peas: carbon partitioning as affected by light intensity. *Europ. J. Agronomy*.19: 535-548.
- Boyer, J.S. 1982. Plant productivity and environment. *Science*. 218: 443-448.

- Breton, G., J. Danyluk, F. Ouellet, and Sarhan F. 2000. Biotechnological applications of plant freezing associated proteins. *Biotechnology annual review*.6. Sucrose accumulation at low temperature. *Plant physiol.* 100: 502-508.
- Broderick G.A., 2001. Maximizing utilization of alfalfa protein: the example of the lactating dairy cow. *Options Méditerranéennes*, 45, 183-192.
- Brunel, S. 2008. Caractérisation écophysiological de différents génotypes de *Medicago truncatula* au cours des phases de germination et de croissance hétérotrophe. *Thèse de doctorat. Ecole Doctorale d'Angers. France.*
- Brunel, S., Teulat-Merah, B., Wagner, M-H., Huguet, T., Prosperi, J.M. and Durr, C. 2009. Using a model-based framework for analysing genetic diversity during germination and heterotrophic growth of *Medicago truncatula*. *Ann. Bot.* 103: 1103-1117.
- Buhariwalla, H.K., B. Jayashree, K. Eshwarand J.H. Crouch. 2005. Development of ESTs from chickpea roots and their use in diversity analysis of the *Cicer* genus. *BMC Plant Biol* 5:16.
- Burow, G., Burk, J.J., Xin, Z. and Franks, C.D. 2010. Genetic dissection of early-season cold tolerance in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Mol. Breeding*. *Published online: DOI 10.107/s 11032-10-9491-4.*
- Buschmann, H., M.X. Rodriguez, J. Tohme and J.R. Beeching. 2000. Accumulation of hydroxyl coumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of Cassava (*Manihotesculenta* Grantz). *Ann. Bot.* 86: 1153-1160.
- Castonguay, Y., J. Cloutier, A. Bertrand, R. Michaud, and S. Laberge. 2010. SRAP polymorphisms associated with superior freezing tolerance in Alfalfa (*Medicago sativa* spp. *sativa*). *Theor. Appl. Genet* 120: 1611-1619.
- Castonguay, Y., M.P. Dubé, J. Cloutier, A. Bertrand, R. Michaud et S. Laberge. 2013. Molecular physiology and breeding at the crossroads of cold hardiness improvement. *Physiologia Plantarum.* 147 (1): 64-74. doi : 10.1111/j.1399-3054.2012.01624.x.
- Castonguay, Y., Michaud, R., Nadeau, P., et A. Bertrand. 2009. An indoor screening method for improvement of freezing tolerance in alfalfa. *Crop Science* 49 (3): 809-818. Doi: 10.2135/cropsci2008.09.0539

- Cazaux, M. 2009. Etude de la résistance de la légumineuse modèle *Medicago truncatula* à *Colletotrichum trifolii*, agent de l'anthracnose. *Thèse doctorat*. Toulouse III.
- Chakrabarty, D., S.Y. Park, B.M. Ali, K.S. Shin and K.Y. Paek. 2005. Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiol.* 26: 377–388.
- Chakroun, A., A. Jemmali, K. Ben Ahmed, C. Abdelli and P. Druart. 2007. Effet du nitrate d'ammonium sur le développement et l'activité des enzymes anti-oxydants du Fraisier (*Fragaria xananassa* L.) micropropagé. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 11, no. 2: 89-95.
- Cheung, W., N. Hubert, and B. Landry. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal, and insect suitable for RADP and other PCR Methods Appl 3:69-70.
- Chinnusamy, V., K. Schumaker and J.K. Zhu. 2004. Molecular genetics perspectives on cross talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. *J. Exp. Bot.* 55(395):225–236.
- Chu, C.G., S. Chao, T.L. Friesen, J.D. Faris, S. Zhong and S.S. Xu. 2010. Identification of novel tan spot resistance QTLs using an SSR-based linkage map of tetraploid wheat. *Mol. Breeding.* 25:327-338.
- Cipollini Jr, D. F. 1997. Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. *Oecologia* 111: 84-90.
- Cipollini Jr, D.F. 1998. The induction of soluble peroxidase activity in bean leaves by wind-induced mechanical perturbation. *American Journal of Botany* 85: 1586-1591.
- Cui, D., C. Xu, C. Tang, C. Yang, T. Yu, X. A, G. Cao, F. Xu, C. Yang, J. Zang and L. Han. 2013. Genetic structure and association mapping of cold tolerance in improved japonica rice germplasm at the booting stage. *Euphytica.* 193: 369-382.
- Dai F., Huang Y., Zhou M., and G. Zhang. 2009. The influence of cold acclimation on antioxidative enzymes and antioxidants in sensitive and tolerant barley cultivars. *Biologia Plantarum* 53 (2): 257-262.
- De-Carvalho, V.M., R.M. Marques, A.S. Lapenta, and M.D.P.S. Machado. 2003. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidospermapolyneuron* M. Arg. (Apocynaceae). *Gen. Mol. Biol* 26: 195-198.

- Dehon, L., J.J. Macheix and M. Durand. 2002. Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *J. Exp. Bot.* 53: 303-311.
- Del Pozo, A. and J. Aronson 2000. Ecophysiology of annual legumes. In: Sula, L. L. (Ed.), *Legumes for Mediterranean Forage Crops, Pastures and Alternative Uses. Cahiers options Méditerranéennes*45: 223-230.
- Delannoy E., P. Marmey, C. Penel and M. Nicole.2004. Les peroxydases végétales de classe III. *Acta. Botanica. Gallica.* 151 n°4: 353-380.
- Desborough S. and J.S. Peloquin 1967. Potato variety identification by use of electrophoretic patterns of tuber proteins and enzymes. *Am. Potato J.* 45:220-229.
- Dias, B.M.P., B. Julier, J.P. Sampoux, P. Barre and M. Dall’Agnol. 2008. Genetic diversity in red clover (*Trifolium pratense* L.) revealed by morphological and microsatellite (SSR) markers. *Euphytica.* 160: 189-205.
- Dias, B.M.P., Brunel-Muguet, S., Dürr, C., Huget, T., Demilly, D., Wagner, M-H. and B. Teulat-Merah. 2010. QTL analysis of seed germination and pre-emergence growth at extreme temperatures in *Medicago truncatula*. *Theor. Appl. Genet.* Published online. doi 10.1007/s00122-010-1458-7.
- Dita, M.A., Rispaïl, N., Prats, E., Rubiales, D. and K.B. Singh. 2005. Biotechnology approaches to overcome biotic and abiotic stress constraints in legumes. *Euphytica.* 147: 1-24.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13–15.
- Ducic, T., I. Liric-Rajlic, A. Mitrovic, and K. Radotic. 2003. Activities of antioxidant systems during germination of *Chenopodium rubrum* seeds. *Biologia Plantarum* 47, no. 4: 527-533.
- Dumont, E. 2008. Tolérance au gel après acclimatation au froid chez le pois : Identification de protéines et cartographie de PQL et QTL. Thèse. Université des Sciences et Technologies de Lille 228 pp.
- El Mansouri, I., J.A. Mercado, N. Santiago-Domenech, F. Pliego-Aifaro, V. Valpuesta and M.A. Quesada. 1999. Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiol. Plant.* 106: 355-362.

- Elfstrand M., F. Sitbon, C. Lapierre, A. Bollin and S. von Arnold. 2002. Altered lignin structure and resistance to pathogens in spi2-expressing tobacco plants. *Planta*. 214: 708-716.
- Erturk U., N. Sivritepe, C. Yerlikaya, M. Bor, F. Ozdemir and I. Turkan. 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity *in vitro*. *Biol. Plant*. 51(3): 597-600.
- Fan J., Ren J., Zhu W., Amombo E., Fu J., and L. Chen. 2014. Antioxidant responses and gene expression in Bermudagrass under cold stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 139 (6): 699-705.
- Fournand, D., B. Cathala and Lapierre C. 2003. Initial steps of the peroxidase-catalyzed polymerization of coniferyl alcohol and/or sinapyl aldehyde: capillary zone electrophoresis study of pH effect. *Phytochemistry*. 62: 139-146.
- Fowler, S. and M.F. Thomashow. 2002. *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell*.14: 1675–1690.
- Funatsuki, H., H. Kurosaki, T. Murakami, S. Matsuba, K. Kawaguchi, S. Yumoto and Y. Sato. 2003. Deficiency of a cytosolic ascorbate peroxidase associated with chilling tolerance in soybean. *Theor. Appl. Genet* 106: 494-502.
- Fyad-Lameche, F.Z. 1998. Variabilité des protéines de réserve des graines de populations d'espèces annuelles de *Medicago*. *Acta Bot. Gallica*, (3) 145: 199-217.
- Fyad-Lamèche, F.Z. 1999. Polymorphisme enzymatique et protéique en relation avec le système de reproduction chez des espèces annuelles de *Medicago*. Thèse de doctorat d'Etat. Université d'Oran Es-Sénia.
- Fyad-Lameche, F.Z., Yahia, N., Lacheheb, F. et L. Abderrezak. 2007. Tolérance au froid chez la tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Etude comparée du développement du gamétophyte mâle et du sporophyte. *Acta Bot. Gallica*, (2) 154: 251-263.
- Galiba, G., A. Vagujfalvi, C. Li, A. Soltesz and J. Dubcovsky. 2009. Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals. *Plant Science* 176: 12–19.
- Garcia-Fernandez, A., A. Lazaro-Nogal, A. Traveset and F. Valladeres. 2012. Isolation and characterization of 10 microsatellite loci in *Cenorumtricoccon* (Cneoraceae), a Mediterranean relict plant. *American Journal of Botany*: e307-e309.

- Gerhardt, R. and H.W. Heldt. 1984. Measurement of subcellular metabolite levels by fractionation of freeze-stopped material in aqueous media. *Plant Physiol.*75: 542-547.
- Gill, S.S. and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- Gilmour, S.J., S.G. Fowler and M.F. Thomashow. 2004. Arabidopsis transcriptional activators CBF1, CBF2, and CBF3 have matching functional activities. *Plant Mol. Biol.* 54: 767–781.
- Goodman, M. M., and C. W. Stuber 1983. Maize. In Tanksley, S. D. and Orton, T. J. (Eds.). *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B*, Elsevier, Amsterdam, pp 1–33.
- Gulen, H. and A. Eris. 2004. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* 166: 739-744.
- Gulzar, S., Shabir, H., Wani, W.H. and N.B. Singh. 2011. Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. *Current Genomics*, 12, 30-43.
- Guo, H.M., Z.C. Li, H. Zhang, Y.Z. Xin, and H.M. Cheng. 2011. Cloning of Cotton CBF Gene for Cold Tolerance and Its Expression in Transgenic Tobacco. *ActaAgron Sin.* 37(2): 286–293.
- Gupta, K. J., Hinch, D. K. and Luis A. J. Mur. 2011. NO way to treat a cold. *New Phytologist* 189: 360–363.
- Gupta, P.K. et R.K. Varshney. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica* 113: 163–185.
- Guy, C. L., Niemi, K. J., and R. Bramble. 1985. Altered gene expression during cold acclimation of spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*82: 3673–3677.
- Guy, C.L. (1990). Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Mol. Biol.*, 41: 187-223.
- Guy, C.L. 1999. Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1 (12): 231-242.
- Guy, C.L., Huber, J.L.A. and S.C. Huber. 1992. Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiology.*100:502-508.

- Halliwell, B. 1978. Lignin synthesis: the generation of hydrogen peroxide and superoxide by horseradish peroxidase and its stimulation by manganese (II) and phenols. *Planta*. 140: 81-88.
- Hannah, M.A., Wiese, D., Freund, S., Fiehn, O., Heyer, A.G. and D.K. Hinch. 2006. Natural genetic variation of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 142: 98–112.
- Hassaneien, A.M. 1999. Alteration in proteins and esterase patterns of peanut in response to salinity stress. *Biologica Plantarum* 42, no. 2: 241-248.
- Heidarvand, L. and R.M. Amiri. 2010. What happens in plant molecular responses to cold stress? *Acta Physiol. Plant.* 32:419–431.
- Heino, P. and E.T. Palva. 2003. Signal transduction in plant cold acclimation. *In: Topics in Current Genetics Springer-Verlag, Berlin* 4: 151-186.
- Hekneby, M., Carmen Antolin, M. and M. Sanchez-Diaz. 2006. Frost resistance and biochemical changes during cold acclimation in different annual legumes. *Environmental and Experimental botany* 55: 305-314.
- Hekneby, M., M.C. Antolin and M. Sanchez-Diaz. 2001. Cold response of annual Mediterranean pasture legumes. In Delgado I. (Ed.). *Quality in Lucerne and medics for animal production*. Zaragoza: CIHAM. 2001. P. 157-161. (Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens ; n.45).
- Helenius, E. and Heino, P. 2002. Biological mechanisms of low temperature stress response: cold acclimation and development of freezing tolerance in plants. *JIRCAS Working Report*: 9-15.
- Hernandez, J.A., M.A. Ferrer, A. Jimenez, A.R. Barcelo, and F. Sevilla. 2001. Antioxidant Systems and O₂⁻ /H₂O₂ Production in the Apoplast of Pea Leaves. It's Relation with Salt-Induced Necrotic Lesions in Minor Veins. *Plant Physiology*, Vol. 127: 817–831.
- Huang, D., D. Ou, and D. Prior. 2005. The chemistry behind antioxidant assays. *J. Agric. Food Chem.* 53: 1841-1856.
- Hughes, M.A. and M.A. Dunn. 1996. The molecular biology of plant acclimation to low temperature. *J. Exp. Bot.* 47: 291-305.
- Huguet, T. 2004. Genetic map of the *Medicago truncatula* LR4 population. LIPM. Toulouse, France. http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/GeneticMAP/LR4_MAP.html

- Hund, A., Y. Fracheboud, A. Soldati and P. Stamp. 2008. Cold tolerance of maize seedlings as determined by root morphology and photosynthetic traits. *Europ. J. Agronomy*.28: 178-185.
- Hurry, V., Strand, A., Furbank, R. and M. Stitt. 2000. The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 24 (3): 383-396.
- Huyghe, C. 2003. Les fourrages et la production de protéines. *Fourrages*. No.174.
- Iraba, A. 2013. Caractérisation de populations de ray-grass anglais (*Lolium perenne* L.) à gazon sélectionnées pour une tolérance au gel supérieure. Maîtrise en biologie végétale. Université LAVAL, Québec, Canada. pp, 70.
- Inzé, D and Van Montagu M. 1995. Oxidative stress in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 153-158.
- Ishitani M, Xiong L, Stevenson B, Zhu J-K. 1997. Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell* 9: 1935–1949.
- Ito, Y., Katsura K., Maruyama K., Taji T., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K and Yamaguchi-hinozaki K. 2006. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice. *Plant Cell. Physiol*, 47: 141–153.
- Janda, T., G. Szalai, K. Rios-Gonzalez, O. Viesz, and E. Paldi. 2003. Comparative study of frost tolerance and antioxidant activity in cereals. *Plant Science* 164: 301-306.
- Janda, T., Szalai, G., Lesko, K., Yordanova, R., Apostol, S. and L. P. Popova. 2007. Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry*. 68: 1674-1682.
- Jang, I.-C., S.-Y. Park, K.-Y. Kim, S.-Y. Kwon, K. J.-G. Kim, and S.-S. Kwak. 2004. Differential expression of 10 sweet potato peroxidase genes in response to bacterial pathogen, *Pectobacterium chrysanthemi*. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 451-455.
- Janska, A., P. Marsik, S. Zelenkova and J. Ovesna. 2010. Cold stress and acclimation what is important for metabolic adjustment? *Plant Biology* 12: 395–405.

- Javadian N., Karimzadeh G., Mahfoozi S., and F. Ghanati. 2010. Cold-Induced changes of enzymes, proline, carbohydrates, and chlorophyll in wheat, *Russian Journal of Plant Physiology* 57 (4): 540-547.
- Jithesh, M.N., Prashanth, S.R., Sivaprakash, K.R. and A. Parida. 2006. Antioxidative response mechanisms in halophytes: their role in stress defence. *Journal of Genetics* 85 (3):237-254.
- Julier, B. et P. Barre. 2005. Les cartes génétiques chez les espèces fourragères pérennes des régions tempérées. *Fourrages*. 183: 389-403.
- Julier, B. S. Flajoulot, P. Barre, S. Santoni, T. Huguet and C. Huygue. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology*. Bio Med Central. 3:9.
- Kacperska, A. 1999. Plant response to low temperature: signaling pathways involved in plant acclimation. In: Margesin R., Schinner F. (Ed.), *Cold-adapted organisms – ecology, physiology, enzymology and molecular biology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany: pp. 79–103.
- Kang, H.M. and M.E. Saltveit. 2001. Activity of enzymatic antioxidant defense systems in chilled and heat shocked cucumber seedling radicles. *Physiologia Plantarum* 113: 548–556.
- Karuppanapandian T., J.H. Moon, C.Kim, K. Manoharan and W. Kim. 2011. Reactive oxygen species in plants: their generation signal transduction and scavenging mechanisms. *Australian J. Crop. Sci.* 5(6): 709-725.
- Kathke, S. and H. Bruelheide. 2010. Differences in frost hardiness of two Norway spruce morpho-types growing at Mt. Brocken. *Flora* 50437 No. of Pages 7.
- Kawaoka, A. and H. Ebinuma. 1998. Growth stimulation of hybrid aspen by introduction of peroxidase gene. *Chern. Regul. Plants*. 33: 125-127.
- Khadari, B., J. Charafi, A. Moukhli and M. Ater. 2007 Substantial genetic diversity in cultivated Moroccan olive despite a single major cultivar: a paradoxical situation evidenced by the use of SSR loci. *Tree Genet Genomes* DOI 10.1007/s11295-007-0102-4
- Khales, A., et M. Baaziz. 2006. Etude des peroxydases de génotypes d'*Opuntia ficus indica* L. en relation avec le développement dans les conditions de stress salin. *In*

Enzymologie et métabolisme. Congrès international de Biochimie (09-12 Mai). Agadir. Maroc.

- Kilian J., Whitehead, D., Horak, J., Wanke, D., Weinl, S., Batistic, O., D'Angelo, C., Bornberg-Bauer, E., Kudla, J., and Harter, K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50: 347–363.
- Kim, S.I. and T.H. Tai 2011. Evaluation of seedling cold tolerance in rice cultivars: a comparison of visual rating and quantitative indicators of physiological changes. *Euphytica*, 178: 437-447.
- Knight, H. and Knight M.R. (2001). Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science.* 6(6): 262-267.
- Koretsky, L.S. 2001. The influence of *fusariumoxysporum* infection and low temperatures on the activity of soybean esterase and PR proteins. *ICEL. AGR. SCI* 14: 67-73.
- Kuk, Y.I., J.S. Shin, N.R. Burgos, T.E. Hwang, O. Han, B.H. Cho, S. Jung, and J.O. Guh. 2003. Antioxydative enzymes offer protection from chilling damage in Rice plant. *Crop science* 43: 2109-2117.
- Kumari, G.J., A.M. Reddy, S.T. Naik, S.G. Kumar, J. Pransanthi, G. Sriranganayakulu, P.C. Reddy, and C. Sudhakar. 2006. Jasmonic acid induced changes in protein pattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isozymes in peanut seedlings. *Biologia Plantarum* 50, no. 2: 219-226.
- Kurt, O. 2010. Effect of chilling on germination in flax (*L. usitatissimum* L.). *Turkish Journal of Field Crops.* 15 (2): 159-163.
- Lazrek, F., V. Roussel, J. Ronfort, G. Cardinet, F. Chardon, M.E. Aouani and T. Huguet. 2009. The use of neutral and non-neutral SSRs to analysis the genetic structure of Tunisian collection of *Medicago truncatula* lines and to reveal associations with eco-environmental variables. *Genetica.* 135: 391-402.
- Le Gall, A., Corrot, G., Campagnaud, M. et Garrigue, G.1993. L'enrubannage : une technique pour optimiser la récolte de la luzerne. *Fourrages.* 134 : 234-250.
- Lee, B., Kin, Y. and Zhu, J.K. 2002. Molecular genetics of plant responses to low temperatures. In: *Plant Cold Hardiness, Gene Regulation and Genetic Engineering. Proceedings of the 6th International Plant Cold Hardiness Seminar. Helsinki, Finland.* pp. 294. *Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.*

- Leon J.C., I.S. Alpeeva, T.A. Chubar, I.Y. Galaev, E. Csoregi and Sakharov, I.Y. 2002. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers. *Plant Sci.* 163: 1011-1019.
- Lesins, K. A. et Lesins, I. 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenetic study. *Dr. W. Junk by Publishers, Hague. The Netherlands.* 228p.
- Lesins, K. A. et Lesins, I. 1979. Genus *Medicago* (Leguminosae). A taxogenetic study. *Dr. W. Junk by Publishers, Hague. The Netherlands.* 228p.
- Levit, J. (1980). Responses of plants to environmental stresses. *Academic press (2^{end} Ed.) New York.* 1: 166-222.
- Lewis, N.G., L.B. Davin and Sarkanen S. 1999. The nature and the function of lignins. *In: Comprehensive natural products chemistry.* D.H.R. Sir Dartonet al (Eds.), Pergamon Press. 617-745.
- Li, J.-T., Z.-B. Qiu, X.-W. Zhang and L.-S. Wang. 2010. Exogenous hydrogen peroxide can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Acta Physiol. Plant* doi: 10.1007/s11738-010-0608-5.
- Li, P., Y. Wang, X. Sun and J. Han. 2009. Using microsatellite (SSR) and morphological markers to assess the genetic diversity of 12 falcata (*Medicagosativa* ssp. Falcate) populations from Eurasia. *African Journal of Biotechnology* 8 (10): 2102-2108.
- Linossier G., 1898. Contribution à l'étude des ferments oxydants sur la peroxydase du pus. *C.R. Soc. Bio.,* 50 : 140-145.
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K and K. Shinozaki. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought and low temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 10: 1391–1406.
- Liu W., Yu K., He T., Li F., Zhang D., and Liu J. 2013. The Low Temperature Induced Physiological Responses of *Avena nuda* L., a Cold-Tolerant Plant Species, *The Scientific World Journal.* doi.org/10.1155/2013/658793
- Longenberger, P.S., C.W. Smith, P.S. Thaxton, and B.L. McMichael. 2006. Development of a screening Method for Drought tolerance in Cotton Seedlings. *Crop Science* 46: 2104-2110.

- Lugan, R. 2008. Phénotypage métabolique des réponses aux stress abiotiques chez *Arabidopsis thaliana*. Analyse fonctionnelle et intégrative du métabolome. Thèse Doctorat Université de Rennes 1. 139 pp.
- Mac Adam J.W., C.J. Nelson and R.E. Sharpe (1992). Peroxidase activity in the leaf elongation zone of tall fescue. *Plant Physiol.* 99: 872-878.
- MadhavaRao, K.V. 2006. Introduction pp. 1-14. In: Physiology and molecular Biology of stress tolerance in Plants. Edited by MadhavaRao, K.V., Raghavendra, A.S. and Janardhan Reddy, K. (ed.) Springer. The Netherland. 345pp.
- Mahajan, S. and Tuteja, N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 444: 139-158.
- Majourhat, K. et M. Baaziz. 2004. Diversité et caractéristiques des peroxydases foliaires du palmier dattier. In *Congrès International de Biochimie. Enzymologie et Métabolisme. (3-6 Mai) Marrakech. Maroc.*
- Maruyama, K., Sakuma, Y., Kasuga, M., Ito, Y., Seki, M., Goda, H., Shimada, Y., Yoshida, S., Shinozaki, K., and K. Yamaguchi-Shinozaki 2004. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *Plant J.* 38: 982–993.
- Masson, P. and G. Gintzburger. 2000. Les légumineuses fourragères dans les systèmes de production méditerranéens : utilisations alternatives. In *Sulas, L. (Ed.), Legumes for Mediterranean Forage Crops, Pastures and Alternative Uses. Cahiers options Méditerranéennes* 45: 265-270.
- Maurières, M. 1994. La luzerne aujourd'hui. *Editions France Agricole*, 252 p.
- McDonald, M.B. (1994). The history of seed vigor testing. *J. Seed Technol.* 17: 93-101.
- McKenzie, K.S., Rutger, and J.N., Peterson, M.L. 1980. Relation of seedling vigor to semidwarfism, early maturity, and pubescence in closely related rice lines. *Crop Sci.* 20 (2): 169-172.
- McKersie B.D. and Bowley, S.R. 1998. Active oxygen and freezing tolerance in transgenic plants. — In: Li, P.H., Chen, T.H.H. (ed.): *Plant Cold Hardiness*. Pp. 203-212. Plenum Press, New York 1998.
- McKersie B.D. and Leshem, Y.Y. 1994. *Stress and stress coping in cultivated plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. The Netherlands.

- Meyer, D.W. and M. Badaruddin. 2001. Frost tolerance of ten seedling legume species at four growth stages. *Crop Sci.* 41: 1838-1842.
- Minorsky, P. V. and R. M. Spanswick, 1989. Electrophysiological evidence for a role for calcium in temperature sensing by roots of cucumber seedlings. *Plant Cell Environ.* 12, 137–143.
- Mittler, R., S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V.B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev and B.F. Van. 2011. ROS signaling: thenewwave? *Trends Plant Science* 16, no. 6: 300-309.
- Mohamed, A.A. and A.A. Aly. 2004. Iron deficiency stimulated some enzymes activity, lipid peroxidation and free radicals production in *Borage officinalis* induced *in vitro*. *Int. J. Agri. Biol.* 6(1): 179-184.
- Mohapatra, S.S., Wolfrain, L., Pool, R.J. and Dhindsa, R.S. 1989. Molecular cloning and relationship to freezing tolerance of cold-acclimation-specific genes of alfalfa. *Plant Physiol.* 89: 375-380.
- Moieni-Korbekandi Z., Karimzadeh G., and M. Sharifi. 2013. Evaluation of total soluble protein and antioxidant activities in two spring cultivars of canola (*Brassica napus* L.) in response to low temperature. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5 (4): 401-409.
- Moncousin C., and G. Ducreux. 1984. Activité peroxydasique et rhizogenèse dans le cas *Cynarascolumus* L. : évolution au cours de repiquages successifs de bouture cultivées *in vitro*. Comparaison avec de jeunes plantes issues de graines, *Agronomie* 4 (2) : 105-111.
- Monroy A.F., Castonguay Y., Laberge S., Sarhan F., Vezina L.P. and R S. Dhindsa. 1993. A new cold- induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol.* 120: 873–879.
- Monroy, A.F. and R.S. Dhindsa. 1995. Low-temperature signal-transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25°C. *Plant Cell.* 7: 321–331.
- Moon, H., B. Lee, G. Choi, D. Shin, D.T. Prasad, O. Lee, S.S. Kwak, D.H. Kim, J. Nam, J. Bahk, J.C, Hong, S.Y. Lee, M.J. Cho, C.O. Lim and D.J. Yun. 2003. NDP Kinase 2 interacts with two oxidative stress activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhance multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 358-363.

- Nazari M., MaaliAmiri R., Mehraban F.Z., and H.Z. Khaneghah. 2012. Change in antioxidant responses against oxidative damage in black chickpea following cold acclimation. *Russian Journal of Plant Physiology* 59 (2): 183-189.
- Nelson, C.J. 1995. Photosynthesis and carbon metabolism. p. 31-44. Dans *Forages Volum I: An introduction to grassland agriculture*. Barnes, R.F., D.A., Miller et C.J. Nelson. 5^e édition. Iowa state University Press, Ames, Iowa, USA. ISBN 0-8138-681-X.
- Nelson, C.J. and Moser, L.E. 1995. Morphology and systematics. P. 15-30. Dans *Forages Volum I: An introduction to grassland agriculture*. Barnes, R.F., D.A., Miller et C.J. Nelson. 5^e édition. Iowa state University Press, Ames, Iowa, USA. ISBN 0-8138-681-X.
- Nieuwenhuis, R. and J. Nieuwelink. 2005. La culture du soja et d'autres légumineuses. *Série Agrodok*. (10). *Seconde édition*. *Fondation Agromisa, Wageningen, Netherland*. Pp. 75.
- Nilsen, E.T. and D.M. Orcutt. 1996. The physiology of plants under stress – abiotic factors. John Wiley & Sons, Inc., New York. 696 pp.
- Noctor, G. and C.H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Biol.* 49: 249-279.
- O'Brien P.J. (2000). Peroxidases. *Chemico- Biological Interactions*. 129: 113-139.
- Omran, R. G. 1980. Peroxide levels and the activities of catalase, peroxidase, and Indole acetic Acid Oxidase during and after Chilling Cucumber Seedlings. *Plant Physiol* 65: 407-408.
- Oono, Y., Seki, M., Satou, M., Iida, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and K. Shinozaki. 2006. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics* 6: 212–234.
- Öquist, G., Hurry, V. and N.P.A. Huner. 1993. Low-temperature effects on photosynthesis and correlation with freezing tolerance in spring and winter cultivars of wheat and rye. *Plant physiol.* 101: 245-250.
- Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F. and R.S. Dhindsa. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The plant journal*. 23: 785-794.

- Ouellet, F. 2002. Out of the cold: unveiling the elements required for low temperature induction of gene expression in plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 38: 396-403.
- Ouellet, F. 2007. Cold Acclimation and Freezing Tolerance in Plants. *ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES*. doi: 10.1002/9780470015902.a0020093
- Palva, E.T. and P. Heino. 1998. Molecular mechanism of plant cold acclimation and freezing tolerance. *Plant Cold Hardiness*, pp. 3-14. Plenum Press, New York.
- Paquin, R. 1984. Paquin, R. 1984. Influence of the environment on cold hardening and winter survival of forage plants and cereals; proline as a metabolic marker of hardening. Dans : Margaris, N.S., M. Ananoustov-Faraggitaki et W.C. Oechel (ed.). Being dive on land. Dr. W. Junk, Pub. Kluwer Academic Publishers Group, Boston, pp. 137- 154
- Paquin, R. et G.R. Mehuys. 1980. Influence of soil moisture on cold tolerance of alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 60: 139-147.
- Paquin, R. et H. Pelletier. 1980. Influence de l'environnement sur l'acclimatation au froid de la luzerne (*Medicago media pers.*) et sa résistance au gel. *Can. J. Plant Sci.* 60 :1351-1366.
- Parent, C., N. Capelli, and J. Date. 2008. Formes réactives de l'oxygène, stress et mort cellulaire chez les plantes. *C. R. Biologies* 331: 255-261.
- Parra Gonzalez, L., S. Straub, J. Doyle, P. Mora Ortega, H. Salvo Garrido and I. Maureira Butler. 2010. Development of microsatellites in *Lupinus luteus* (Fabaceae) and cross-species amplification in other lupine species. *Am. J. Bot.* 97:e72-e74.
- Parvanova, D., S. Ivanov, T. Konstantinova, E. Karanov, A. Atanassov, T. Tsvetkov, V. Alexieva, and D. Djilianov. 2004. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant PhysiolBiochem* 42:57-63
- Pastori, G.M. and C.H. Foyer. 2002. Common components network, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated control. *Plant Physiology*, 124: 460-468.
- Pavla, E.T., Htiherju, S.T., Tamminen, I., Puhakainen, T., Laitinen, R., Svensson, J., Parvanova, D., S. Ivanov, T. Konstantinova, E. Karanov, A. Atanassov, T. Tsvetkov, V. Rahnama, H. and H. Ebrahimzadeh. 2005. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings. *Biologia Plantarum* 49, no. 1: 93-97.

- Pearce, R.S. 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant growth regulation*.29: 47-76.
- Pearce, R.S. 2001. Plant freezing and damage. *Annals of Botany* 87:417-424.
- Pirzadah, T.B., B.Malik, R. UI Rehman, K.R. Hakeem and M.I. Qureshi. 2014. Signaling in response to cold stress. In: K.R. Hakeem et al. (eds), *Plant signaling: Understanding the molecular crosstalk*, doi 10. 1007/978-81-322-1542-4_10. Springer India 2014.
- Pomar, F., N. Caballero, M.A. Pedreno and A.R. Barcelo. 2002. H₂O₂ generation during the auto-oxidation of coniferyl alcohol drives the oxidase activity of a highly conserved class III peroxidase involved in lignin biosynthesis. *F.E.B.S. Letters*. 529: 198-202.
- Prosperi, J. M., E. Jenczewski, M. Angevain and J. Ranfort. 2006. Morphologic and agronomic diversity of wild genetic resources of *Medicago sativa* L. collected in Spain. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53: 843-856.
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li Y Q, Shinozaki K, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2004. Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol.* 45: 1042–1052.
- Rahnama H. and H. Ebrahimzadeh. 2005. The effect of NaCl on antioxidant enzyme activities in potato seedlings. *Biol. Plant.* 49(1): 93-97.
- Reyes L., O.M. Martinez M. Beltran 1998. Chimio-variabilité chez le genre *Musa*: caractérisation génétique à l'aide de neuf systèmes enzymatiques. *InfoMusa.* 7 (1): 6-10.
- Rife, C.L. and H. Zeinali. 2003. Cold tolerance in Oilseed Rape over varying acclimation duration. *Crop Science* 43: 96-100.
- Robinson, S.J. and I.A. Parkin 2008. Differential SAGE analysis in *Arabidopsis* uncovers increased transcriptome complexity in response to low temperature. *BMC Genomics* 9: 434.
- Roy, B. and A.B. Mandal. 2005. Increased Fe-toxicity tolerance in rice calli and modulation in isozyme profiles. *Indian Journal of Biotechnology* 4: 65-71.
- Ruelland, E., M.N. Vaultier, A. Zakowski and V. Hury. 2009. Cold signaling and cold acclimation in plant. Elsevier Waltham.

- Safarnejad, A. 2004. Characterization of Soma clones of *Medicago sativa* L. for drought tolerance. *J. Agric. Sci. Technol.* 6: 121-127.
- Saher S., A. Piqueras, E. Hellin and E. Olmos (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiol. Plant.* 120: 152–161.
- Saibo, N.J.M., T.Lourenço, and M.M. Oliveira. 2009. Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of botany.* 103: 609-623.
- Sakai, A. and Larcher, W. 1987. Frost survival of plants: responses and adaptation to freezing stress. Springer-Verlag, Berlin.
- Santoni, S., P. Faivre-Rampant, E. Prado, et D. Prat. 2000. Marqueurs moléculaires pour l'analyse des ressources génétiques et l'amélioration des plantes. Cahiers d'études et de recherches francophones / Agricultures.9 (4) : 311-27.
- Sarhan, F. and Danyluk, J. 1998. Engineering cold-tolerance crops throwing the mater switch. *Trends in Plant Science.* 3: 289-290.
- Scebba, F., L. Sebastiani, and C. Vitagliano. 1998. Changes in activity of antioxydative enzyme in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 104: 747-752.
- Schuller D.J., N. Ban, R.B. Van Huystee, A. McPherson and T.L. Poulos. 1996. The crystal structure of peanut peroxidase. *Structure.* 4: 311-321.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y. and Shinozaki, K. 2002. Monitoring the expression profiles of ca. 7000 Arabidopsis genes under drought, cold, and highsalinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant J* 31: 279–292
- SenhadriMaamri F., RahalBouziane H., Abdelguerfi A. et D.H. Rahmani. 2000. Etude bi ométrique des gousses et des graines de populations de deux générations de *Medicago truncatula* Gaert. In: Sulas L. (Ed.). *Legumes for Mediterranean forage crops, pastures and alternative uses.* Zaragoza : CIHEAM, 2000. p. 2 49 -2 53 (Cahiers Options Méditerranéennes ; n. 45).
- Sharma, L. B.M. Prasanna and B. Ramesh. 2010. Analysis of phenotypic and microsatellite-based diversity of maize landraces in India, especially from the North East Himalayan region. *Genetica* 138: 619-631.

- Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Molecular responses to dehydration and low-temperature: differences and cross talk between two stress-signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217–223.
- Shrestha, A., Hesterman, O.B., Squire, J.M., Fisk, J.W., and C.C. Sheaffer. 1998. Annual medics and berseem clover as emergency forages. *Agron. J.*90: 197-201.
- Simon, H.U., A. Haj-Yahia and F. Levi Schaffer. 2000. Role of reactive oxygen species in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418.
- Simonovicova, M., L. Tamas, J. Huttova, and I. Mistrik. 2004. Effect of aluminium on oxidative stress related enzymes activities in barley roots. *Biologia Plantarum* 48, no. 2: 261-266.
- Singh, K.B., Foley, R.C. and L. Onate-Sanchez. 2002. Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology.* 5: 430-436.
- Smallwood, M. and D.J. Bowles. 2002. Plants in a cold climate. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 357, 831–847. DOI 10.1098/rstb.2002.1073.
- Solanke, A.U. and A. K. Sharma. 2008. Signal transduction during cold stress in plants. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 14 (1& 2): 69-79.
- Staub J.E. and L.J. Kuhns 1979. An electrophoretic survey of potato tuber enzymes. *Hortscience.* 14, 406.
- Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu Rev Plant Physiol.*35: 543-584.
- Steponkus, P.L., Uemura, M., Webb, M.S. 1993. A contrast of the cryostability of the plasma membrane of winter rye and spring oat-two species that widely differ in their freezing tolerance and plasma membrane lipid composition. *In* PL Steponkus, (ed.), *Advances in Low-Temperature Biology*, Vol. 2. JAI Press, London, pp: 211-312.
- Stitt, M. and V. Hurry. 2002. A plant for all seasons: alterations in photosynthetic carbon metabolism during cold acclimation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology.*5: 199-206.
- Stockinger, E.J. Gilmour, S.J. and M.F. Thomashow. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 1035–1040.

- Sultan, K., Gintzburger, G., Obaton, M., Robin, C., Touchane, H., and A. Guckert. 2001. Growth and nitrogen fixation of annual *Medicago-Rhizobium* association during winter in Mediterranean region. *Eur. J. Agron.* 15: 221-229.
- Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J. and Guy, C.L. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in plant Science.* 8 (4): 179-187.
- Swapna, T.S. 2003. Salt stress induced changes on enzyme activities during different developmental stages of rice (*Oryza sativa* Linn.). *Indian Journal of Biotechnology* 2: 251-258.
- Syros, T., T. Yupsanis, D. Petkou, and A.S. Economou. 2005. Protein, leucine amino peptidase, esterase, acid phosphatase and photosynthetic responses of Oleander (*Nerium oleander* L.) during cold acclimation and freezing treatments. *Journal of Plant Physiology* 162: 886-894.
- Tasgin, E., O. Atici, B. Nalbantoglu, and L.P. Popova. 2006. Effects of salicylic acid and cold treatments on protein levels and on the activities of antioxidant enzymes in the apoplast of winter wheat leaves. *Phytochemistry* 67: 710-715.
- Thapa B, A.D. Knapp and E.C. Brummer. 2008. Applying freezing test to quantify cold acclimation in *Medicago truncatula*. *J. AMER. SCO. HORT. SCI.* 133 (5): 684-691.
- Thomashow, M.F. 2010. Molecular Basis of Plant Cold Acclimation: Insights Gained from Studying the CBF Cold Response Pathway¹. *Plant Physiology.* 154 (2): 571-577.
- Thomashow, M.F. 1990. Molecular genetics of cold acclimation in higher plants. *Adv Genet* 28: 99-131.
- Thomashow, M.F. 1998. Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. *Plant Physiol.* 118: 1-7.
- Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571-599.
- Thomashow, M.F. 2001. So what's new in the field of plant cold acclimation? Lots! *Plant Physiol.* 125: 89-93.
- Tiryaki, I., and D.J. Andrews. 2001. Germination and seedling cold tolerance in *Sorghum*: 1. Evaluation of rapid screening methods. *Agron Journal* 93: 1386-1391.
- Touil, L., F. Guesmi, K. Fares, C. Zagrouba and A. Ferchichi. 2008. Genetic diversity of some Mediterranean populations of the cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) using SSR markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (15): 1923-1928.

- Trifi-Farah N., W.S. Chatti, M. Marakchi et J. Pernest 1989. Analyse de la variabilité morphologique et enzymatique des formes cultivées et spontanées de *Hedysarum coronarium* L. en Tunisie. *Agronomie*, EDP Sciences. 9 (6): 591-598.
- Uemura, M. Raymond, A. Joseph, and P.L. Steponkus. 1995. Cold acclimation of *Arabidopsis thaliana*: Effect on plasma membrane lipid composition and freeze induced lesions. *Plant Physiol.* 109: 15-30.
- Uemura, M., and Steponkus P.L. 1997. Artificial manipulation of the intracellular sucrose content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of isolated protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. *Cryobiology* **35**: 336
- Vallejos, C.E. 1983. Enzyme activity staining. *In: Isozymes in plant Genetic and Breeding*, Elsevier Science Publishers éd. Part. I. S.D. Tanksley, and T.J. Orton, 469-514. B.V. Amsterdam.
- Verdaguer, B., M.H. Bonnacuelle, C. Balardelle, M. Romestant, and P. Lacaze. 2005. Génie génétique appliqué à l'amélioration des espèces fourragères. *Fourrages* 183: 347-364.
- Vogel, J.T., Zarka, D.G., Van Buskirk H.A., Fowler S.G., and M.F. Thomashow. 2005. Roles of the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of *Arabidopsis*. *Plant J* 41: 195–211.
- Wang, W., Vinocur, B and A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Wang, Z-F., Wang, J-F., Bao, Y-M., Wang, F-H., and Zhang, H-S. 2010. Quantitative trait loci analysis for rice seed vigor during the germination stage. *Biomed & Biothechnologie*. 11 (12): 958-964.
- Welinder K.G. 1992. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Cur. Op. Struc. Bioi.* 2: 388-393.
- Wisniewski, M. and Fuller M. 1999. Ice nucleation and deep supercooling in plants: new insights using infrared thermography. In: Margesin R., Schinner F. (Eds), Cold-adapted organisms – ecology, physiology, enzymology and molecular biology. Springer-Verlag, Berlin, Germany: pp. 105–118.
- Xiong, L. and J.K. Zhu. 2002. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell and Environment* 25: 131-139.

- Xiong, Y.W. and S.Z. Fei. 2006. Functional and phylogenetic analysis of a DREB/CBF-like gene in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Planta*. 224: 878–888.
- Yahia, N. et F.Z. Fyad-Lameche. 2003. Evaluation de la variabilité de jeunes plants de *Medicago* soumis à un régime de basse température. *Acta Bot. Gallica.*, 150 (1). 3-17.
- Yoshida, K., P. Kaothien, T. Matsui, A. Kawaoka and A. Shinmyo. 2003. Molecular biology and application of plant peroxidase genes. *Appl. Microbial. Biotechnol.* 60: 665-670.
- Zaccardelli, M., F. Lupo, A. R. Piergiovanni, G. Laghetti, G. Sonnante, M. G. Daminati, F. Sparvoli and L. Lioi. 2012. Characterisation of italian lentil (*Lens culinaris* Medik.) germplasm by agronomic traits, biochemical and molecular markers. *Gent. Resour Crop Evol.* 59: 727-738.
- Zeng, Y., H. Zhang, S. Yang, J. Du, X. Pu, L. Wang, J. Liu, F. Xiao and Z. Li. 2009. Correlation between allele sizes of microsatellites and phenotypic variations in rice landraces. *Front. Agric. China.* 3(2):130-139.
- Zhang, F-L., Niu, B., Wang, Y-C., Chen, F., Wang, S-H., Xu, Y., Jiang, L-D., Gao, S., Wu, J., Tang, L. and Y-J. Jia. 2008. A novel betain aldehyde dehydrogenase gene from *Jatropha curcas*, encoding an enzyme implicated in adaptation to environmental stress. *Plant Science.* 174: 510-518.
- Zhang, Q. 2007. Strategies for developing green super rice. *PNAS* 104: 16402-16409. DOI/10.1073/pnas.0708013104.
- Zhang, X., Fowler, S.G., Cheng, H. M., Lou, Y.G., Rhee, S. Y., Stockinger, E.J. and M. F. Thomashow. 2004. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing tolerant *Arabidopsis*. *Plant J.* 39: 905–919.
- Zhao R., J. Sheng, S. Lv, Y. Zheng, J. Zhang, M. Yu and Shen L. 2011. Nitric oxide participates in the regulation of *LeCBF1* gene expression and improves cold tolerance in harvested tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 62 (2) :121-126.
- Zou, W., Y. Chen., C. Lu. 2007. Differences in biochemical responses to cold stress in two contrasting varieties of rapeseed (*Brassica napus* L.). *For. Stud. China*, 9. 2: 142-146.

Annexes

Tableau 27. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, Chez les populations de *M. aculeata*

Accessions	Rt01/Tt01	Rt1/Tt1	Rt02/Tt02	Rt2/Tt2
	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type
A80	1,102777± 0,854647	1,628875± 1,768792	1,056299± 0,525738	2,310714± 1,719751
A15679	0,869536± 0,252288	0,827222± 0,370843	1,274709± 0,932709	1,122828± 1,240019
A14821	1,320122± 0,894675	0,933714± 0,824324	1,087646± 0,378374	1,675000± 2,128806
A15678	1,270960± 0,906563	1,180984± 0,748869	1,494536± 1,201767	1,444675± 1,164128

Accessions	Rt03/Tt03	Rt3/Tt3
	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type
A80	1,150514 ± 0,493083	1,348271 ± 1,299551
A15679	1,059004 ± 0,491659	1,312395 ± 0,448588
A14821	1,085238 ± 0,296970	1,683300 ± 1,229733
A15678	1,429727 ± 0,763885	1,345738 ± 0,847812

Ec-type : écart-type à la moyenne ; **Rt/Tt** : ratios racine /tige pour les différentes durées de traitement et leurs témoins respectifs.

Tableau 28. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, Chez les populations de *M. ciliaris*

Accessions	Rt01/Tt01	Rt1/Tt1	Rt02/Tt02	Rt2/Tt2
	Moyennes ± Ec-type	Moyennes± Ec-type	Moyennes± Ec-type	Moyennes± Ec-type
C124	1,151740± ,872580	1,277836±0,704249	1,319609±1,181455	1,205521±0,726536
C126	1,320086±1,084262	1,440751±0,641371	1,150541±1,093195	1,058958±0,916068
C123	1,553844 ± 1,040124	0,597708±0,411075	0,785349±0,355177	1,163444±0,708406
C125	1,106925 ± 0,493173	2,122572±2,367190	1,183975±0,524518	1,661692±1,165798

Accession	Rt03/Tt03	Rt3/Tt3
	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type
C124	0,892908 ±0,298243	1,046606 ± 0,850711
C126	1,039806 ±0,385310	0,775262 ± 0,469180
C123	0,825690 ±0,296902	0,949802 ± 0,376017
C125	1,022889 ±0,260881	1,050794 ± 0,565956

Ec-type : écart-type à la moyenne ; **Rt/Tt** : ratios racine /tige pour les différentes durées de traitement et leurs témoins respectifs.

Tableau 29. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, Chez les populations de *M. polymorpha*

Accessions	Rt01/Tt01	Rt1/Tt1	Rt02/Tt02	Rt2/Tt2
	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type
Poly 57	0,825822 ±0,480441	1,031920 ± 0,698255	0,836311 ± 0,298040	0,846800 ± 0,465449
Poly 54	0,980177 ±0,846919	0,703373 ± 0,463834	0,748739 ± 0,637294	0,968439 ± 0,686882
Poly 136	1,147078 ±0,692725	1,562034 ± 1,644437	0,970286 ± 0,646224	0,868429 ± 0,422302
Poly 213	1,197607 ±1,074324	0,888548 ± 1,024743	1,062174 ± 0,555320	0,750833 ± 0,256587

Accessions	Rt03/Tt03	Rt3/Tt3
	Moyennes ±Ec-type	Moyennes ± Ec-type
Poly 57	0,735831 ±0,511527	0,650709 ± 0,272168
Poly 54	0,618645 ±0,396041	0,691529 ± 0,393727
Poly 136	0,827702 ±0,229088	0,783495 ± 0,309293
Poly 213	0,792175 ±0,350464	0,933644 ± 0,440260

Ec-type : écart-type à la moyenne ; **Rt/Tt** : ratios racine /tige pour les différentes durées de traitement et leurs témoins respectifs.

Tableau 30. Valeurs moyenne des différents ratios racine/tige sous un régime de basse température en comparaison avec le témoin, Chez les populations de *M. truncatula*

Accessions	Rt01/Tt01	Rt1/Tt1	Rt02/Tt02	Rt2/Tt2
	Moyennes ±Ec-type	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type
Tru 62	1,281740 ± 0,803134	1,484580 ± 1,420282	1,015501 ±0,671701	1,295089 ± 0,849013
Tru 26	1,068025 ± 0,494635	1,132985 ± 1,734529	1,009984 ±0,534883	0,823812 ± 0,638655
Tru 210	0,881599 ± 0,576969	1,153847 ± 0,882857	0,850225 ±0,340929	1,022999 ± 0,587857
Tru 216	1,185019 ± 1,131811	1,421452 ± 0,714692	0,953735 ±0,535205	1,060680 ± 0,715415

Accessions	Rt03/Tt03	Rt3/Tt3
	Moyennes ± Ec-type	Moyennes ± Ec-type
Tru 62	0,886891 ± 0,366579	0,698551 ± 0,628408
Tru 26	0,891329 ± 0,701287	1,390008 ± 0,720349
Tru 210	0,876084 ± 0,386696	0,769689 ± 0,542995
Tru 216	1,180063 ± 1,124028	1,169120 ± 1,626199

Ec-type : écart-type à la moyenne ; **Rt/Tt** : ratios racine /tige pour les différentes durées de traitement et leurs témoins respectifs.

Tableau31. Moyenne $\pm \sigma$ de l'activité des peroxydases (POD) en $\mu \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, chez les accessions de *M. polymorpha* et *M. ciliaris*

Traitements	Accessions			
	Poly 57	Poly 136	Cil 124	Cil 123
J2	0,012 \pm 0.005	0,006 \pm 0.004	0,008 \pm 0.004	0,005 \pm 0.004
J4	0,012 \pm 0.008	0,018 \pm 0.015	0,014 \pm 0.007	0,009 \pm 0.006
J6	0,019 \pm 0.007	0,014 \pm 0.007	0,012 \pm 0.002	0,008 \pm 0.009
J8	0,016 \pm 0.010	0,013 \pm 0.005	0,010 \pm 0.002	0,009 \pm 0.001
J10	0,015 \pm 0.008	0,018 \pm 0.012	0,013 \pm 0.005	0,013 \pm 0.006
J11	0,023 \pm 0.006	0,027 \pm 0.010	0,016 \pm 0.008	0,012 \pm 0.004
J12	0,013 \pm 0.004	0,020 \pm 0.012	0,010 \pm 0.003	0,011 \pm 0.001
J14	0,020 \pm 0.006	0,026 \pm 0.002	0,010 \pm 0.001	0,014 \pm 0.006
T1	0,012 \pm 0.004	0,018 \pm 0.008	0,015 \pm 0.012	0,018 \pm 0.008
T2	0,015 \pm 0.005	0,011 \pm 0.004	0,010 \pm 0.005	0,009 \pm 0.004
T3	0,008 \pm 0.006	0,013 \pm 0.010	0,010 \pm 0.003	0,011 \pm 0.011

Tableau 32. Moyenne $\pm \sigma$ de l'activité des peroxydases (POD) en $\mu \text{ mol. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$, chez les accessions de *M. aculeata* et *M. truncatula*

Traitements	Accessions			
	Ac 15679	Ac 80	Tru 210	Tru 26
J2	0,005 \pm 0.005	0,013 \pm 0.005	0,009 \pm 0.011	0,011 \pm 0.006
J4	0,008 \pm 0.008	0,011 \pm 0.009	0,009 \pm 0.008	0,011 \pm 0.012
J6	0,005 \pm 0.002	0,012 \pm 0.009	0,013 \pm 0.011	0,016 \pm 0.015
J8	0,014 \pm 0.012	0,009 \pm 0.007	0,013 \pm 0.009	0,009 \pm 0.006
J10	0,016 \pm 0.009	0,021 \pm 0.020	0,017 \pm 0.015	0,007 \pm 0.004
J11	0,012 \pm 0.008	0,015 \pm 0.013	0,016 \pm 0.012	0,011 \pm 0.007
J12	0,013 \pm 0.007	0,016 \pm 0.017	0,029 \pm 0.029	0,011 \pm 0.007
J14	0,020 \pm 0.018	0,016 \pm 0.013	0,015 \pm 0.009	0,015 \pm 0.011
T1	0,006 \pm 0.003	0,011 \pm 0.004	0,010 \pm 0.009	0,008 \pm 0.004
T2	0,008 \pm 0.006	0,016 \pm 0.011	0,013 \pm 0.017	0,008 \pm 0.005
T3	0,005 \pm 0.001	0,008 \pm 0.006	0,007 \pm 0.003	0,005 \pm 0.002

$\pm \sigma$: \pm écart-type

Tableau 33.Loci étudiés pour les différentes populations de *Medicago*

Loci	ATPase 456	ATPase 456	FMT13	FMT13	mtic79	mtic79
Populations	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2
Ciliaris 126-1	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 126-2	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 126-3	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 126-4	117	117	0	0	136	136
Ciliaris 126-5	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 123-1	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 123-2	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 123-3	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 123-4	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 123-5	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 124-1	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 124-2	117	117	131	131	0	0
Ciliaris 124-3	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 124-4	117	117	0	0	0	0
Ciliaris 124-5	117	117	0	0	0	0
Tru 26-1	119	119	128	128	0	0
Tru 26-2	119	119	128	128	0	0
Tru 26-3	119	119	128	128	0	0
Tru 26-4	119	119	128	128	0	0
Tru 26-5	119	119	128	128	0	0
Acu 15679-1	117	117	134	134	0	0
Acu 15679-2	117	117	134	134	0	0
Acu 15679-3	119	119	134	134	0	0
Acu 15679-4	119	119	134	153	154	154
Acu 15679-5	117	119	134	153	133	133
Acu 80-1	128	128	146	146	154	154
Acu 80-2	128	128	146	146	154	154
Acu 80-3	111	128	146	146	133	133
Acu 80-4	128	128	146	146	-1	-1
Acu 80-5	128	128	146	146	-1	-1
Acu 15678-1	122	122	131	131	-1	-1
Acu 15678-2	119	122	131	131	-1	-1
Acu 15678-3	122	122	122	122	-1	-1
Acu 15678-4	117	117	134	134	-1	-1
Acu 15678-5	122	122	122	122	140	140
Poly 57-1	128	128	137	137	140	140
Poly 57-2	53	53	0	-1	140	140
Poly 57-3	117	128	137	137	133	140
Poly 57-4	117	117	137	137	0	0
Poly 57-5	117	128	137	137	0	0
Poly 213-1	128	128	137	137	0	0
Poly 213-2	53	117	137	137	0	0
Poly 213-3	117	128	137	137	0	0
Poly 213-4	53	117	-1	-1	0	0
Poly 213-5	117	117	137	137	0	0
Poly 42-1	128	128	137	137	0	0
Poly 42-2	-1	0	0	0	0	0
Poly 42-3	117	128	137	137	0	0
Poly 42-4	117	117	137	137	0	0
Poly 42-5	117	128	137	137	0	0
Poly 136-1	117	117	0	0	0	0

Poly 136-2	128	128	137	146	0	0
Poly 136-3	111	111	157	157	0	0
Poly 136-4	111	111	157	157	0	0
Poly 136-5	111	111	150	157	0	0
Poly 54-1	128	128	137	137	0	0
Poly 54-2	117	128	137	137	0	0
Poly 54-3	128	128	137	146	0	0
Poly 54-4	53	128	137	137	0	0
Poly 54-5	117	128	137	137	0	0

Loci	mtic332	mtic332	mtic338	mtic338	mtic134	mtic134
Populations	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2
Ciliaris 126-1	116	116	179	179	185	192
Ciliaris 126-2	116	116	179	192	0	0
Ciliaris 126-3	116	116	179	192	0	0
Ciliaris 126-4	116	116	179	163	185	185
Ciliaris 126-5	0	-1	179	192	185	185
Ciliaris 123-1	0	-1	179	179	185	185
Ciliaris 123-2	116	116	179	179	0	0
Ciliaris 123-3	116	116	179	179	0	0
Ciliaris 123-4	116	116	179	179	0	0
Ciliaris 123-5	116	116	179	179	0	0
Ciliaris 124-1	116	116	179	179	185	185
Ciliaris 124-2	116	116	179	179	185	185
Ciliaris 124-3	116	116	179	179	185	185
Ciliaris 124-4	0	-1	179	179	185	185
Ciliaris 124-5	116	116	179	179	0	0
Tru 26-1	119	119	179	179	192	192
Tru 26-2	119	119	179	179	0	0
Tru 26-3	119	119	179	179	192	192
Tru 26-4	119	119	179	179	0	0
Tru 26-5	119	119	179	179	192	192
Acu 15679-1	116	116	166	166	189	189
Acu 15679-2	116	116	166	166	189	189
Acu 15679-3	119	119	166	166	189	189
Acu 15679-4	119	119	0	0	189	189
Acu 15679-5	116	119	166	166	0	0
Acu 80-1	129	129	163	163	191	191
Acu 80-2	129	129	163	163	195	195
Acu 80-3	110	129	163	163	0	0
Acu 80-4	129	129	163	163	0	0
Acu 80-5	129	129	163	163	0	0
Acu 15678-1	122	122	174	174	195	195
Acu 15678-2	119	122	174	174	0	0
Acu 15678-3	122	122	174	188	0	0
Acu 15678-4	116	116	174	174	0	0
Acu 15678-5	122	122	174	174	0	0
Poly 57-1	0	0	166	166	181	181
Poly 57-2	0	0	166	166	181	181
Poly 57-3	0	0	166	166	0	0
Poly 57-4	0	0	0	-1	181	181
Poly 57-5	0	0	166	166	181	181
Poly 213-1	0	0	188	188	181	181
Poly 213-2	0	0	192	192	0	0

Poly 213-3	110	110	188	188	0	0
Poly 213-4	0	-1	0	0	0	0
Poly 213-5	0	-1	188	188	0	0
Poly 42-1	0	-1	188	188	0	0
Poly 42-2	0	-1	188	188	0	0
Poly 42-3	0	-1	188	188	180	181
Poly 42-4	0	-1	188	188	180	180
Poly 42-5	0	-1	188	192	181	181
Poly 136-1	116	116	188	188	0	0
Poly 136-2	0	0	188	188	181	181
Poly 136-3	0	0	188	188	0	0
Poly 136-4	110	110	188	188	0	0
Poly 136-5	110	110	188	188	0	0
Poly 54-1	0	0	179	179	0	0
Poly 54-2	0	0	192	192	181	181
Poly 54-3	0	0	185	185	0	-1
Poly 54-4	0	0	0	-1	180	180
Poly 54-5	0	0	188	188	181	181

Loci	mtic365	mtic365	mtic082	mtic082	mtic451	mtic451
Populations	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2
Ciliaris 126-1	148	148	139	139	159	159
Ciliaris 126-2	148	148	139	139	159	159
Ciliaris 126-3	148	148	139	139	159	159
Ciliaris 126-4	148	148	139	139	159	159
Ciliaris 126-5	148	148	139	139	159	159
Ciliaris 123-1	154	154	139	139	159	166
Ciliaris 123-2	150	150	139	139	174	174
Ciliaris 123-3	150	150	139	139	174	174
Ciliaris 123-4	150	150	139	139	174	174
Ciliaris 123-5	154	154	139	139	156	156
Ciliaris 124-1	148	154	139	139	166	166
Ciliaris 124-2	154	154	139	139	156	156
Ciliaris 124-3	147	147	139	139	168	168
Ciliaris 124-4	154	154	139	139	156	156
Ciliaris 124-5	154	154	139	139	156	156
Tru 26-1	148	148	146	146	159	159
Tru 26-2	148	148	146	146	159	159
Tru 26-3	148	148	146	146	161	161
Tru 26-4	148	148	146	146	159	159
Tru 26-5	148	148	146	146	158	158
Acu 15679-1	152	152	142	142	163	163
Acu 15679-2	152	152	142	142	163	163
Acu 15679-3	150	150	142	142	153	153
Acu 15679-4	150	150	142	142	153	163
Acu 15679-5	150	152	142	142	153	163
Acu 80-1	137	137	142	142	144	144
Acu 80-2	137	137	142	142	144	144
Acu 80-3	137	137	142	142	144	155
Acu 80-4	137	137	142	142	144	144
Acu 80-5	137	137	142	142	144	144
Acu 15678-1	148	175	150	150	149	149
Acu 15678-2	148	175	150	150	149	149
Acu 15678-3	148	148	150	150	144	144
Acu 15678-4	150	152	0	0	153	163

Acu 15678-5	148	148	150150	150	144	144
Poly 57-1	0	0	134	134	151	151
Poly 57-2	0	0	134	134	151	151
Poly 57-3	0	0	134	134	151	151
Poly 57-4	150	150	134	134	151	151
Poly 57-5	148	148	134	134	151	151
Poly 213-1	0	0	139	139	153	153
Poly 213-2	148	148	139	139	153	153
Poly 213-3	155	155	139	139	153	153
Poly 213-4	150	150	139	139	153	153
Poly 213-5	0	0	139	139	151	153
Poly 42-1	0	0	134	134	151	151
Poly 42-2	0	0	134	141	151	151
Poly 42-3	0	0	134	134	151	151
Poly 42-4	150	155	134	134	151	151
Poly 42-5	148	148	134	134	151	151
Poly 136-1	148	148	0	0	159	159
Poly 136-2	0	0	139	142	153	153
Poly 136-3	137	137	0	0	156	156
Poly 136-4	0	0	0	0	156	156
Poly 136-5	130	137	142	166	156	156
Poly 54-1	0	0	139	139	153	153
Poly 54-2	148	148	134	139	151	153
Poly 54-3	137	137	132	139	151	153
Poly 54-4	0	0	139	139	151	151
Poly 54-5	0	0	133	134	151	151

Loci	B14B03	B14B03	mtic135	mtic135	mtic343	mtic343
Populations	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2
Ciliaris 126-1	170	170	183	183	148	148
Ciliaris 126-2	170	170	183	183	148	148
Ciliaris 126-3	170	170	183	183	148	148
Ciliaris 126-4	170	170	184	194	148	148
Ciliaris 126-5	170	170	183	183	0	0
Ciliaris 123-1	170	170	183	183	0	0
Ciliaris 123-2	170	170	183	183	145	145
Ciliaris 123-3	170	170	183	183	145	145
Ciliaris 123-4	170	170	183	183	145	145
Ciliaris 123-5	170	170	183	183	148	148
Ciliaris 124-1	170	170	183	183	148	148
Ciliaris 124-2	170	170	183	183	148	148
Ciliaris 124-3	170	170	183	183	145	145
Ciliaris 124-4	170	170	183	183	148	148
Ciliaris 124-5	170	170	183	183	148	148
Tru 26-1	170	170	192	192	156	156
Tru 26-2	170	170	187	187	156	156
Tru 26-3	170	170	192	192	151	151
Tru 26-4	170	170	192	192	156	156
Tru 26-5	170	170	192	192	156	156
Acu 15679-1	172	172	187	187	154	154
Acu 15679-2	172	172	187	187	154	154
Acu 15679-3	172	172	187	187	154	154
Acu 15679-4	172	172	187	187	154	154
Acu 15679-5	172	172	187	187	154	154
Acu 80-1	161	161	189	189	155	155

Acu 80-2	161	161	194	194	151	151
Acu 80-3	161	161	189	189	143	155
Acu 80-4	161	161	189	194	156	156
Acu 80-5	161	161	194	194	151	151
Acu 15678-1	170	170	194	194	148	148
Acu 15678-2	170	170	194	194	148	148
Acu 15678-3	170	170	194	194	151	151
Acu 15678-4	170	172	187	187	154	154
Acu 15678-5	170	170	194	194	151	151
Poly 57-1	185	185	178	178	145	145
Poly 57-2	179	179	178	178	145	145
Poly 57-3	181	181	178	178	150	150
Poly 57-4	185	185	178	178	0	0
Poly 57-5	185	185	178	178	142	142
Poly 213-1	165	165	178	178	140	140
Poly 213-2	165	165	178	178	140	140
Poly 213-3	165	165	178	178	140	140
Poly 213-4	165	165	178	178	140	140
Poly 213-5	165	165	178	178	140	140
Poly 42-1	179	179	0	0	143	143
Poly 42-2	165	179	178	178	148	154
Poly 42-3	179	179	178	178	143	143
Poly 42-4	179	179	176	176	143	143
Poly 42-5	179	179	176	178	143	143
Poly 136-1	170	170	183	183	0	-1
Poly 136-2	0	0	178	178	129	145
Poly 136-3	158	158	198	198	145	145
Poly 136-4	158	158	198	198	143	143
Poly 136-5	158	158	0	0	143	143
Poly 54-1	167	167	178	178	148	148
Poly 54-2	167	183	178	178	141	148
Poly 54-3	167	167	178	178	141	148
Poly 54-4	183	183	176	178	150	150
Poly 54-5	183	183	178	178	141	141

Loci	mtic131	mtic131	mtic432	mtic432
Populations	allèle1	allèle2	allèle1	allèle2
Ciliaris 126-1	132	132	181	181
Ciliaris 126-2	132	132	181	181
Ciliaris 126-3	132	132	181	181
Ciliaris 126-4	132	132	181	181
Ciliaris 126-5	132	132	181	181
Ciliaris 123-1	132	132	181	181
Ciliaris 123-2	132	132	181	181
Ciliaris 123-3	132	132	181	181
Ciliaris 123-4	132	132	181	181
Ciliaris 123-5	132	132	181	181
Ciliaris 124-1	132	132	181	181
Ciliaris 124-2	141	141	181	181
Ciliaris 124-3	132	132	181	181
Ciliaris 124-4	132	132	181	181
Ciliaris 124-5	132	132	181	181
Tru 26-1	140	140	187	187
Tru 26-2	144	144	187	187

Tru 26-3	144	144	187	187
Tru 26-4	140	140	187	187
Tru 26-5	140	140	187	187
Acu 15679-1	137	137	190	190
Acu 15679-2	137	137	190	190
Acu 15679-3	137	137	190	190
Acu 15679-4	137	137	190	190
Acu 15679-5	137	137	190	190
Acu 80-1	135	135	187	187
Acu 80-2	135	135	187	187
Acu 80-3	135	135	187	187
Acu 80-4	135	135	187	187
Acu 80-5	135	135	187	187
Acu 15678-1	141	141	187	187
Acu 15678-2	141	141	187	187
Acu 15678-3	144	144	187	187
Acu 15678-4	0	0	190	190
Acu 15678-5	144	144	187	187
Poly 57-1	135	135	207	207
Poly 57-2	0	0	197	197
Poly 57-3	0	0	205	205
Poly 57-4	144	144	207	207
Poly 57-5	137	137	207	207
Poly 213-1	139	135	195	195
Poly 213-2	135	135	195	195
Poly 213-3	135	135	195	195
Poly 213-4	135	135	195	195
Poly 213-5	135	135	195	195
Poly 42-1	135	135	236	236
Poly 42-2	0	0	207	207
Poly 42-3	135	135	236	236
Poly 42-4	135	135	236	236
Poly 42-5	0	0	236	236
Poly 136-1	132	132	181	181
Poly 136-2	135	135	200	200
Poly 136-3	0	0	0	0
Poly 136-4	140	140	0	0
Poly 136-5	137	137	0	0
Poly 54-1	135	132	204	204
Poly 54-2	135	135	204	204
Poly 54-3	135	135	216	216
Poly 54-4	141	135	191	191
Poly 54-5	135	135	216	216

Tableau 34. Fréquences alléliques au locus ATPase- 456 (nombres d'allèles détectés = 06 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
53	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,2500	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000
111	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,0000
117	1,0000	1,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,2000	0,6000	0,5000	0,7500	0,2000	0,4000	1,0000
119	0,0000	0,0000	1,0000	0,4000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
122	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
128	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,8000	0,0000	0,2000	0,2500	0,2500	0,2000	0,4000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,4800	0,3200	0,5600	0,5600	0,6250	0,3750	0,5600	0,6400	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,5333	0,3556	0,6222	0,6222	0,7143	0,4286	0,6222	0,7111	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

(**H exp.** = H calculée avec biais, **H n.b.** = H calculée sans biais (Nei 1978) et **Hobs.** = H observée).

Tableau 35. Fréquences alléliques au locus FM-13 (Nombres d'allèles détectés = 08 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
122	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
128	-----	-----	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
131	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
134	-----	-----	0,0000	1,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
137	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,2500	1,0000	0,0000
146	-----	-----	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
150	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,0000
157	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000
Hexp.	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,6400	0,0000	0,0000	0,0000	0,6250	0,0000	0,0000
Hn.b.	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,7111	0,0000	0,0000	0,0000	0,7143	0,0000	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 36. Fréquences alléliques au locus mtic79 (Nombres d'allèles détectés = 04 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
133	0,0000	-----	-----	0,5000	0,3333	0,0000	0,3333	-----	-----	-----	-----	-----
136	1,0000	-----	-----	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	-----	-----	-----	-----	-----
140	0,0000	-----	-----	0,0000	0,0000	1,0000	0,6667	-----	-----	-----	-----	-----
154	0,0000	-----	-----	0,5000	0,6667	0,0000	0,0000	-----	-----	-----	-----	-----
Hexp.	0,0000	-----	-----	0,5000	0,4444	0,0000	0,4444	-----	-----	-----	-----	-----
Hn.b.	0,0000	-----	-----	0,6667	0,5333	0,0000	0,5333	-----	-----	-----	-----	-----
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 37. Fréquences alléliques au locus mtic-332 (Nombres d'allèles détectés = 05 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
110	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	-----	1,0000	-----	0,6667	-----	0,0000
116	1,0000	1,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,2000	-----	0,0000	-----	0,3333	-----	1,0000
119	0,0000	0,0000	1,0000	0,4000	0,0000	0,2000	-----	0,0000	-----	0,0000	-----	0,0000
122	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	-----	0,0000	-----	0,0000	-----	0,0000
129	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,8000	0,0000	-----	0,0000	-----	0,0000	-----	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,4800	0,3200	0,5600	-----	0,0000	-----	0,4444	-----	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,5333	0,3556	0,6222	-----	0,0000	-----	0,5333	-----	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 38. Fréquences alléliques au locus mtic-338 (Nombres d'allèles détectés = 07 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
163	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
166	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
174	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
179	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	1,0000
185	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000
188	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,7500	1,0000	1,0000	0,2500	0,0000
192	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3750	0,0000	0,0000	0,7500	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4286	0,0000	0,0000	0,8571	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 39. Fréquences alléliques au locus mtic-134 (Nombres d'allèles détectés = 07 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
180	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,3333	0,0000
181	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,6667	0,0000
185	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000
189	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
191	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
192	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
195	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4444	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6667	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5333	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 40. Fréquences alléliques au locus mtic-365 (Nombres d'allèles détectés = 08 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
130	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3333	0,0000	0,0000
137	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3333	0,5000	0,0000
147	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000
148	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,8000	0,5000	0,3333	0,5000	0,3333	0,5000	0,2000
150	0,0000	0,6000	0,0000	0,6000	0,0000	0,2000	0,5000	0,3333	0,5000	0,0000	0,0000	0,0000
152	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
154	0,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000
155	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3333	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,4800	0,0000	0,4800	0,0000	0,3200	0,5000	0,6667	0,5000	0,6667	0,5000	0,5600
Hn.b.	0,0000	0,5333	0,0000	0,5333	0,0000	0,3556	0,6667	0,8000	0,6667	0,8000	0,6667	0,6222
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 41. Fréquences alléliques au locus mtic-082 (Nombres d'allèles détectés = 07 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
132	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000
133	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000
134	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,8000	0,0000	0,2000	0,0000
139	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,8000	0,2000	0,5000	0,4000	1,0000
142	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000
146	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
150	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3200	0,3200	0,5000	0,7200	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3556	0,3556	0,6667	0,8000	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 42. Fréquences alléliques au locus mtic-451 (Nombres d'allèles détectés = 12 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
144	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
149	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
151	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,2000	1,0000	0,0000	0,8000	0,0000
153	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,2000	0,0000	0,8000	0,0000	0,2000	0,2000	0,0000
156	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,6000
158	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
159	1,0000	0,2000	0,6000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000
161	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
163	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
166	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000
168	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000
174	0,0000	0,6000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,5600	0,5600	0,4800	0,0000	0,6400	0,0000	0,3200	0,0000	0,5600	0,3200	0,5600
Hn.b.	0,0000	0,6222	0,6222	0,5333	0,0000	0,7111	0,0000	0,3556	0,0000	0,6222	0,3556	0,6222
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 43. Fréquences alléliques au locus B14B03 (Nombres d'allèles détectés = 10 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
158	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,7500	0,0000	0,0000
161	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
165	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000
167	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000
170	1,0000	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,8000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	1,0000
172	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
179	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,8000	0,0000	0,0000	0,0000
181	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
183	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,0000
185	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3200	0,5600	0,0000	0,3200	0,3750	0,4800	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3556	0,6222	0,0000	0,3556	0,4286	0,5333	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 44. Fréquences alléliques au locus mtic-135 (Nombres d'allèles détectés = 08 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
176	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,2000	0,0000
178	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	1,0000	0,7500	0,2500	0,8000	0,0000
183	0,8000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	1,0000
187	0,0000	0,0000	0,2000	1,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
189	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
192	0,0000	0,0000	0,8000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
194	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,8000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
198	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,3200	0,0000	0,3200	0,0000	0,4800	0,3200	0,0000	0,0000	0,3750	0,6250	0,3200	0,0000
Hn.b.	0,3556	0,0000	0,3556	0,0000	0,5333	0,3556	0,0000	0,0000	0,4286	0,7143	0,3556	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 45. Fréquences alléliques au locus mtic-343 (Nombres d'allèles détectés = 12 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
129	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,0000
140	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
141	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000
142	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
143	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,8000	0,5000	0,0000	0,0000
145	0,0000	0,7500	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,2000
148	1,0000	0,2500	0,0000	0,0000	0,0000	0,4000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,2000	0,8000
150	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000
151	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,4000	0,4000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
154	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
155	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
156	0,0000	0,0000	0,8000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Hexp.	0,0000	0,3750	0,3200	0,0000	0,7200	0,6400	0,6250	0,0000	0,3200	0,6250	0,5600	0,3200
Hn.b.	0,0000	0,4286	0,3556	0,0000	0,8000	0,7111	0,7143	0,0000	0,3556	0,7143	0,6222	0,3556
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 46. Fréquences alléliques au locus mtic-131 (Nombres d'allèles détectés = 06 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
132	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,2000	1,0000	1,0000
135	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,3333	1,0000	1,0000	0,2500	0,8000	0,0000	0,0000
137	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,3333	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,0000	0,0000
140	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,0000	0,0000	0,0000
141	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,7500	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
144	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2500	0,3333	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3750	0,6667	0,0000	0,0000	0,7500	0,3200	0,0000	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,7500	0,3200	0,0000	0,0000	0,8571	0,3556	0,0000	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Tableau 47. Fréquences alléliques au locus mtic-432 (Nombres d'allèles détectés = 13 allèles)

	Cil126	Cil123	Tru 26	Ac15679	Ac 80	Ac 15678	Poly 57	Poly 213	Poly 42	Poly 136	Poly 54	Cil 124
181	1,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	1,0000
187	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,8000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
190	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
191	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000
195	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
197	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
200	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000	0,0000
202	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,1000	0,0000
204	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,5000	0,0000
205	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
207	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,6000	0,0000	0,1000	0,0000	0,0000	0,0000
216	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000
236	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,9000	0,0000	0,0000	0,0000
Hexp.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3200	0,5600	0,0000	0,1800	0,5000	0,6600	0,0000
Hn.b.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,3556	0,6222	0,0000	0,2000	0,6667	0,7333	0,0000
Hobs.	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,2000	0,0000	0,4000	0,0000

ERROR: undefined
OFFENDING COMMAND: eexec

STACK:

/quit
-dictionary-
-mark-