

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة سعد دحلب البليدة (1)  
Université SAAD DAHLEB-Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie  
**Mémoire de fin d'études**  
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière : Sciences Biologiques  
Option : *Génétique*

## Thème

**Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du  
polymorphisme génétique d'*Artemisia herba-alba* provenant  
de différents étages bioclimatiques**

*Présentés par :*

Elkhchine Noufel

MEKDAD Nacera

*Soutenus le :*

Devant le jury :

Nom

Grade/Lieu

Qualité

Mme HAMZI S.

MCA /USDB1

Présidente

Mme CHERIF H S.

MCA/USDB1

Examinatrice

Mme BENMANSOUR N

MCA/USDB1

Promotrice

Année universitaire : 2022/2023

# Remerciements

*Dans un premier temps, je voudrais exprimer ma gratitude à BENMANSOUR N, mon directeur de mémoire, pour sa patience, son attention et surtout pour ses conseils judicieux qui ont guidé ma réflexion. En outre, je lui exprime ma gratitude pour m'avoir envoyé tous les articles concernant la synthèse bibliographique..*

*Je suis reconnaissante à Mme **HAMZI** et à Mme **CHERIF** d'avoir pris le temps d'évaluer ce modeste document.*

*J'exprime mes sincères remerciements à tous les enseignants, intervenants et toutes les personnes qui ont éclairé mes Zones d'ombre par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques.*

*Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce mémoire*

**MEKDAD Nacera**

# Remerciements

*Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude à ALLAH, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a fourni la force, la volonté et le courage nécessaires pour terminer ce projet.*

*Je tiens à exprimer ma gratitude à Madame « BENMANSOUR N » pour son orientation et son soutien tout au long de la réalisation de ce projet.*

*Je remercie également les membres du jury pour leur approbation de ce travail modeste..*

*Enfin, j'exprime mes sincères remerciements à mes parents, mon frère et mes amis, qui m'ont toujours soutenu et encouragé à réaliser cette mémoire.*

*A tous ceux qui, par un geste, une parole ou un conseil, m'ont aidé de près ou de loin  
Je les remercie.*

***ELKHCHINE Noufel***

## Résumé

*Artemisia herba-alba* est une plante herbacée aromatique et thérapeutique. Elle est largement présente dans les régions semi-arides, arides et sahariennes d'Algérie et de Tunisie, et elle pourrait être utile pour rétablir des écosystèmes endommagés.

L'étude repose sur une synthèse théorique des recherches antérieures menées par trois équipes de chercheurs : les Algériens (**Bougoutaia et al (2014)**, **Benchohra et al (2016)**) et les Tunisiens **Haouari et Ferchichi (2008)**.

La recherche repose sur la variation génétique de 216 espèces *d'Artemisia herba alba* collectées dans diverses régions tunisiennes, y compris 12 espèces récoltées dans la région de Djelfa et 18 espèces récoltées dans la région de Tiaret en Algérie. Le polymorphisme de l'espèce *Artemisia herba alba* a été évalué à l'aide de marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).

Un total de 60 locus polymorphes a été identifié parmi les 216 espèces *D'Artemisia.herba.alba.L* à l'aide de quatre amorces, indiquant un polymorphisme génétique élevé.

Les 18 individus *d'Artemisia herba alba* récoltées dans la région de Djelfa (**Bougoutaia et al, 2014**) et 12 individus *d'Artemisia herba alba* collectées dans la région de Tiaret (**Benchohra et al, 2016**) ont montré une grande variabilité génétique, constituée respectivement de 47 et 37 bandes amplifiables de tailles différentes. L'amorce X14 Primer TRAAR (GCC) 4 a été choisie pour fournir des bandes plus claires dans les réactions d'amplification.

Selon **Haouari et Ferchichi (2008)**, il n'y a pas de lien direct entre les caractéristiques morphologiques, la distance géographique et la distance génétique, selon l'analyse de corrélation. La variabilité génétique des accessions *d'A. herba alba* est inégalement répartie, selon l'analyse du corrélogramme, suggérant que les conditions écologiques et géographiques locales ont un impact sur la variabilité.

**Mots clés :** *Artemisia herba-alba*, extraction d'ADN, polymorphisme génétique, marqueurs ISSR

## Summary

*Artemisia herba-alba* is an aromatic and therapeutic herbaceous plant. It is widely found in semi-arid, arid, and Saharan regions of Algeria and Tunisia, and it could be useful for restoring damaged ecosystems.

The study is based on a theoretical synthesis of previous research conducted by three teams of researchers: Algerians (**Bougoutaia et al., 2014; Benchohra et al., 2016**) and Tunisians **Haouari and Ferchichi (2008)**.

The research relies on the genetic variation of 216 species of *Artemisia herba-alba* collected from various Tunisian regions, including 12 species collected from the Djelfa region and 18 species collected from the Tiaret region in Algeria. The species polymorphism of *Artemisia herba-alba* was evaluated using Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers.

A total of 60 polymorphic loci were identified among the 216 *Artemisia herba-alba* species using four primers, indicating high genetic polymorphism.

The 18 individuals of *Artemisia herba-alba* collected from the Djelfa region (**Bougoutaia et al., 2014**) and 12 individuals collected from the Tiaret region (**Benchohra et al., 2016**) showed high genetic variability, consisting of 47 and 37 amplifiable bands of different sizes, respectively. X14 Primer TRAAR (GCC) 4 was chosen to provide clearer bands in the amplification reactions.

According to **Haouari and Ferchichi (2008)**, there is no direct correlation between morphological characteristics, geographic distance, and genetic distance. Genetic variability of *A. herba-alba* accessions is unevenly distributed, suggesting that local ecological and geographic conditions have an impact on variability.

**Keywords:** *Artemisia herba-alba*, DNA extraction, genetic polymorphism, ISSR Markers

## ملخص

الشيح الأبيض (*Artémisia herba alba*) هو نبات عشبي عطري وعلاج يتواجد على نطاق واسع في المناطق شبه الجافة والجافة والصحراوية في الجزائر وتونس، ويمكن أن يكون مفيداً في استعادة النظم البيئية التالفة.

تقوم الدراسة على تركيبة نظرية للبحوث السابقة التي أجرتها ثلاثة فرق بحثية: الفريق الجزائري (بوقوتايا وآخرون، 2014)، والفريق الجزائري بنشهرة وآخرون (2016)، والفريق التونسي هواري وفرشيشي. (2008)

يعتمد البحث على التباين الوراثي لـ 216 نوعاً من نبات الشيح الأبيض، تم جمعها في مناطق مختلفة في تونس، بما في ذلك 12 نوعاً جمعت من منطقة جلفة و 18 نوعاً جمعت من منطقة تيارت في الجزائر. تم تقييم تعدد الأشكال في نوع الشيح الأبيض باستخدام الوسماث الوراثية (ISSR).

تم تحديد مجموعة من 60 موقعاً متعددة الأشكال بين الأنواع 216 للشيح الأبيض باستخدام أربعة برايمر، مما يشير إلى وجود تعدد وراثي عالي.

تم جمع 18 فرداً من الشيح الأبيض في منطقة جلفة بوقوتايا وآخرون، (2014)، و 12 فرداً من الشيح الأبيض في منطقة تيارت) بنشهرة وآخرون، (2016) و قد أظهروا تنوعاً وراثياً كبيراً، وتتكون من 47 و 37 شريطاً يمكن تضخيمها وذات أحجام مختلفة، على التوالي. تم اختيار مبادر 4 (GCC) X14 Primer TRAAR لتوفير شرائط أكثر وضوحاً في ردود الفعل التكاثرية.

ووفقاً لهواري و فرشيشي (2008)، لا يوجد ارتباط مباشر بين الخصائص المورفولوجية و المسافة الجغرافية و المسافة الجينية، وفقاً لتحليل الترابط. وتوزع التباين الجيني للوصلات الشيح الأبيض بشكل غير متساو، وفقاً لتحليل الترابط الهندسي، مما يشير إلى أن الظروف البيئية والجغرافية المحلية لها تأثير على التباين.

**كلمات مفتاحية:** الشيح الأبيض (*Artémisia herba alba*)، استخراج الحمض النووي، تعدد الوراثي، ISSR

## *Liste Des Abréviations*

**A : Adénine**

**ADN : Acide désoxyribonucléique**

**ARN: Acideribonucléique**

**BET : bromure d'éthidium**

**°C : Degré Celsius**

**C: Cytosine**

**CM : Carré Moyen cm: Centimètre**

**CTAB: Cetyl Trim ethyl Ammonium Bromide**

**DAF: DNA Amplification Fingrprinting**

**D'NTP: Désoxynucléoside triphosphates**

**ISSR: Inter Simple Sequence Repeats**

**IMA: Inter Microsatellite Amplification**

**IRA: Inter-Repeat Amplification**

**ISA: Inter-SSR Amplificatio).**

**G: Guanine**

**Kb: Kilobase (1000 Pb)**

**MS: Matière sèche**

**NMDS : L'analyse multidimensionnelle non métrique**

**NTSYS-pc: Numérique Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers**

**Pb : Paire de base**

**PCR: Polymerase Chain Reaction**

**PH : Potentiel hydrogène**

**Pop: Population**

**RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA**

**RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphisme**

**RNase : Ribonucléase**

**SM : matrice de similarité**

**SSRs: Sequence repeats**

**SSRPs: Simple sequences repeat polymorphisms**

**STMS: Sequence-tagged microsatellite sites**

**STS: Sequence-Tagged Site**

**T : Tymine**

**Taq : Thermusaquaticus**

**TE: Tampon d'Extraction**

**UV : ultraviolet**



## Liste des Figures

Titre du de la figure	Page
<b>Figure 01</b> : Aire de distribution d' <i>Artemisia herba-alba</i> en Algérie	02
<b>Figure 02</b> : Illustration des différents aspects morphologiques d' <i>Artemisia herba- alba</i> <i>Asso</i>	04
<b>Figure 03</b> : Principe de la technique ISSR	11
<b>Figure 04</b> : La technique RAPD	12
<b>Figure 05</b> : Illustration schématique des différentes étapes de notre travail	21
<b>Figure 06</b> : Visualisation de l'ADN	24

# Liste des tableaux

Titre du Tableau	Page
<b>Tableau 01</b> : Classification APG III selon <b>Mark W. Chase and James L. Reveal, (2009)</b>	03
<b>Tableau 02</b> : Présentation de la nature des données	18
<b>Tableau 03</b> : Site, période de récolté et méthode d'extraction des échantillons <i>d'Artemisia herba alba</i>	19
<b>Tableau 04</b> : Ratio, valeur et l'indication de pureté d'un échantillon d'ADN extrait	25
<b>Tableau 05</b> : Caractéristiques des amorces ISSR	30
<b>Tableau 06</b> : Indices de diversité génétique	30
<b>Tableau 07</b> : Séquence d'amorce sélectionné, nombre de bandes avec leur taille Amplifiées	34
<b>Tableau 08</b> : Séquence d'amorce sélectionné, nombre de bandes avec leur taille Amplifiées	36
<b>Tableau 09</b> : Séquence d'amorce sélectionné, nombre de bandes avec leur taille amplifiées de chaque région étudiée	39

# SOMMAIRE

<b>Introduction</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I : Généralités sur <i>Artemisia heba-alba</i></b>	<b>02</b>
I.1: Répartition géographiques	02
I.2 : Systématique de la plante	03
I.3 : Aspects morphologiques	03
I.4 : Ecologie	04
I.5 : Utilisations et Intérêts et de l'armoise blanche	04
I.6 : L'étude caryologique et cytogénique d' <i>Artemisia herba alba</i>	05
<b>Chapitre II : La Diversité génétique</b>	<b>06</b>
II .1 : Diversité génétique et variabilité génétique	06
II.2 : Diversités des espèces	06
II.3 : Polymorphisme génétique	06
II.4 : Méthodes d'analyse de variabilité génétique	07
II.5 : Les marqueurs génétiques	07
II.5.1 : Les marqueurs morphologiques	08
II.5.2 : Les marqueurs biochimiques	08
II.5.2.1 : Les marqueurs enzymatiques	08
II.5.2.2 : Les protéines totales	08
II.5.3 : Les Marqueurs moléculaires	09
II.6: Extraction et purification des acides nucléiques	13
II.6.1 : Principe de la lyophilisation	13
II.6.2 : Extraction d'ADN génomique	14
<b>Chapitre III : Matériel et Méthodes</b>	<b>18</b>
III.1 : Présentation de l'étude	18
III.2. Nature de données	18
III.3 : Matériel végétal	19
III.4 : Méthodes	20
III.4.1 : Stratégie du travail	20
III.4.2 : Collecte des échantillons	21
III.4.3 : Séchage des Echantillons	21
III.4.4 : Broyage des feuilles	22
III.4.5: Extraction de l'ADN	22

III.4.6 : Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait	24
III.4.7 : Amplification in vitro de l'ADN extrait par PCR	25
<b>Chapitre IV : Résultats et Discussion</b>	<b>27</b>
IV.1 : Marqueurs moléculaires étudiés	27
IV.2 : Travaux antérieurs	27
IV.2.1 : Travaux de Haouariet Ferchichi ; 2008	28
IV.2.2 : Travaux de Bougoutaia et <i>al</i> , 2014	32
IV.2.3 : Les travaux de Benchohra et al ; 2016	35
IV.3 : Etude comparative entre les travaux de Haouariet Ferchichi ; 2008, Bougoutaia et <i>al</i> , 2014, Benchohra et al ; 2016	37
<b>Conclusion</b>	<b>40</b>
<b>Références bibliographiques</b>	



# Introduction

---

## Introduction

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à étudier la variabilité génétique de l'espèce *A. herba-alba* Asso, en synthétisant des travaux antérieurs basés sur l'étude du polymorphisme génétique de la plante *A. herba-alba* Asso au niveau de l'ADN en utilisant des marqueurs inter simples séquences répétées (ISSR-PCR).

Ces amorces ISSR sont faciles à manipuler en raison de leur température de recuit plus élevée et de leur séquence plus longue. Ils fournissent également des bandes plus fiables et reproductibles par rapport aux marqueurs étudiés (**Tsumura et al., 1996 ; Nagaoka et Ogiwara, 1997**), et ils s'hybrident directement avec les séquences répétées simples.

Les études antérieures ont été menées par des Chercheurs tunisiens (**Haouari et Ferchichi Ali, 2008**) et algériens (**Bougoutaia et al, 2014 et Benchohra et al, 2016**). En **2008, Haouari et Ferchichi** ont accompli une étude sur le polymorphisme génétique de 216 variétés d'*Artemisia herba alba* Asso récoltée dans diverses régions tunisiennes. En **2014, Bougoutaia et al.** ont étudié les variations génétiques dans les 18 espèces d'*Artemisia herba alba* Asso récoltée dans la région de Djelfa, tandis que **Benchohra et al. (2016)** ont examiné 12 espèces d'*Artemisia herba alba* Asso récoltée dans la région de Tiaret.

### I.1 : Répartition géographiques :

L'aire géographique d'*Artemisia herba-alba* s'étend depuis les Canaries et l'Espagne, à l'ouest, jusqu'au Turkménistan et l'Ouzbékistan à l'est, à travers tout le nord de l'Afrique et le Proche-Orient (Le Floc'het *et al.* 1989 ; Quezel et Santa, 1962 ; Pottier Alapetite, 1981).

En Afrique du Nord, les superficies occupées par les steppes armoise blanche sont évaluées à plus de dix millions d'hectares. Selon Nabli (1989) l'armoise herbe blanche est largement répandue depuis les îles Canaries et le sud-est de l'Espagne jusqu'aux steppes d'Asie centrale (Iran, Turkménistan, Ouzbékistan et à travers l'Afrique du Nord, l'Arabie et le Proche-Orient. (Figure 01)

En Algérie les steppes à armoise blanche couvrent 3 millions d'hectares (Nedjraoui, 2004). C'est dans le sud oranais où couvrant près de 30 % des parcours, elle est la mieux représentée, formant un paysage végétal très monotone (Djebaili *et al.*, 1995)

L'armoise blanche est une plante steppique très abondante sur les hauts plateaux, plus rare au Sahara septentrional en altitude dans le Sahara central (au-dessus de 1400 m dans le Hoggar). Espèce Saharo-arabique et méditerranéenne.

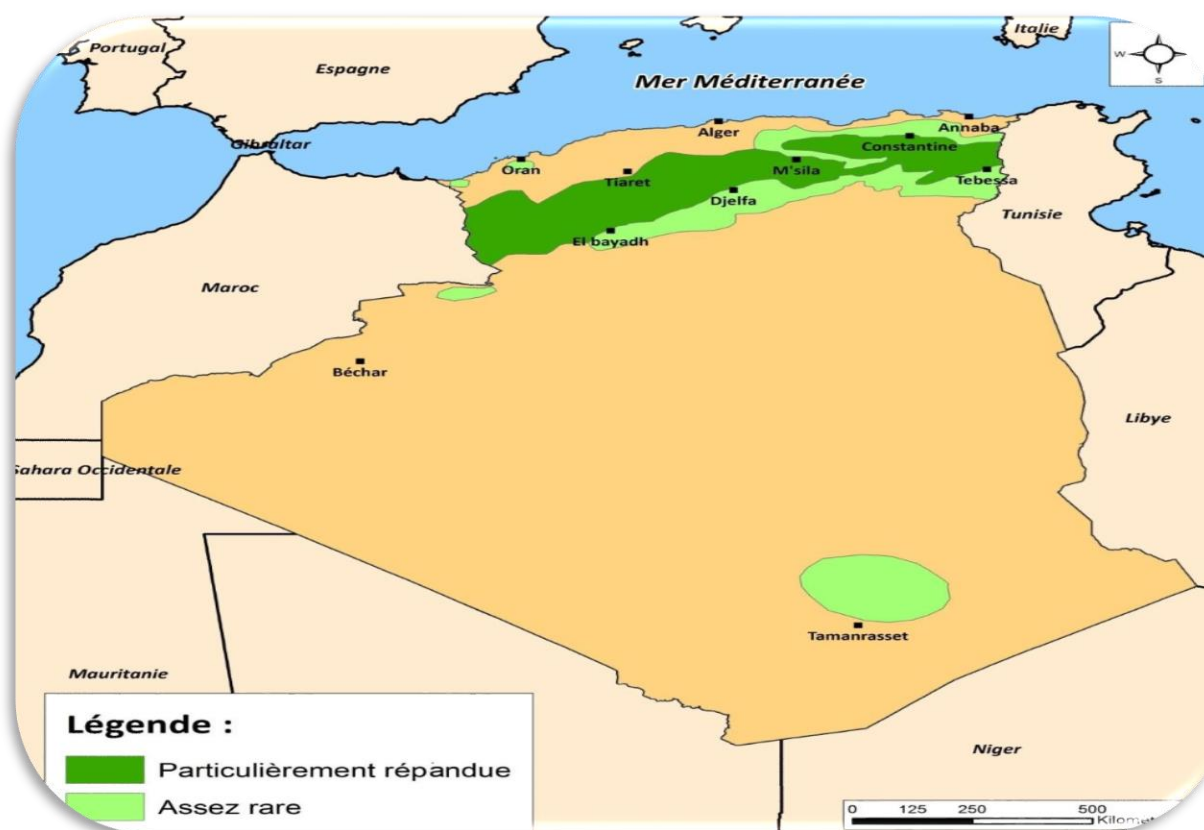


Figure 01 : Aire de distribution d'*Artemisia herba-alba* en Algérie (Quézel et Santa, 1963; Aidoud, 1988)

**I.2 : Systématique de la plante**

Elle est présentée par le **tableau 01**

**Tableau 01** : Classification APG III selon **Mark W. Chase and James L. Reveal, (2009)**

Règne	Plante
Sous-règne	Tracheobionta
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sous-classe	Asteridae
Ordre	Asterales
Famille	Asteraceae
Sous-famille	Asteroideae
Tribu	Anthemideae
Sous-tribu	Artemisiina
Genre	Artemisia
Espèce	<i>Artemisia herba alba</i> (Asso)

**I.3 Aspects morphologiques**

*Artemisia herba-alba* est une chaméphyte herbacée qui se développe en touffes bien individualisées très ramifiée dès la base à tiges ligneuses, pouvant atteindre 80 cm de haut

Selon **Quezel et Santa (1963)** et **Ozenda (1991)** et **Maghni (2013)**., l'armoise blanche présente une tige principale très ramifiée qui se prolonge par de nombreuses tiges de plus en plus fines beiges, tomenteuses de 30-50 cm Elles sont ligneuses et ramifiées beiges. les feuilles sont blanches, laineuses, courtes, généralement pubescentes et argentées. Elles sont alternées ou opposées sur le rameau. Le fruit est un akène coiffé latéralement par le périlanthe, oblong, glabre et lisse. Les fleurs sont groupées en grappes, à capitules très petites (1 à 1,5 mm). Elle présente une racine principale, épaisse, et ligneuse, bien distincte des racines secondaires qui s'enfoncent dans le sol comme un pivot. Elle peut être définie comme un organe dont le rôle est de fixer la plante au sol et d'absorber l'eau et les sels minéraux. (**Figure 03**).





**Figure 03 :** Illustration des différents aspects morphologiques d'*Artemisia herba-alba* Asso. (Abderrabi, 2018)

#### I.4 Conditions écologiques

L'Armoise herbe blanche existe dans des bioclimats allant du semi-aride jusqu'au saharien (entre les isohyètes de 150 à 500 mm). Elle semble indifférente aux altitudes et peut vivre dans des régions d'hiver chaud à frais. Par ailleurs, cette espèce est abondante dans le centre sur des sols, à texture fine, assez bien drainés (marnes, marno-calcaires en pente). Dans le sud, elle pousse sur des sols bruns steppiques de texture moyenne et en extrême sud sur des sols sableux. L'armoise résiste à la sécheresse, supporte le gypse et des niveaux des salinités modérément élevés. Dans un biome steppique type, les groupements d'*Artemisia herba-alba* sont marqués par deux strates : une strate de ligneux bas (environ 40 cm du sol) et une autre constituée d'herbacées annuelles (hauteur moyenne de 20 cm) (Nabli, 1989). En Algérie, la texture la plus répandue de l'armoise blanche est limono-sableuse (Pouget, 1980).

#### I.5 Utilisations et Intérêts et de l'armoise blanche

L'espèce *Artemisia herba alba* est largement utilisée en médecine traditionnelle. Elle a été utilisée :

- Comme aromatisant dans le thé et le café
- Pour traiter les désordres gastriques, pour son activité antihelminthique
- Contre l'hypertension, et également la présence d'activité emménagogue.
- Et elle présente aussi un caractère vermifuge très prisé pour le bétail.

Des études ethno pharmacologiques ont montré l'intérêt de l'armoise blanche contre le diabète grâce à son activité hypoglycémiant, ont révélés que les extraits aqueux d'armoise blanche possèdent des activités antileishmaniose, antigénotoxiques, antibactériennes et antispasmodiques et

ils ont montré que les huiles essentielles sont douées d'activités: antimicrobiennes, antifongiques, spasmolytiques et hypoglycémiques (Marrif, 1995; Bellakhdar, 1997).

### 1.6 Etude caryologique et cytogénique d'*Artemisia herba alba*

Les travaux de cytogénétique classique qui ont été réalisés sur ce taxon ont porté essentiellement sur le dénombrement chromosomique. Les premières études cytogénétiques Sur *Artemisia herba-alba* remontent à 1964, avec les travaux de **Kawatani et Ohno (1964)**, Ayant dénombré un nombre chromosomique  $2n = 36$ , à partir de matériel végétal tunisien. Par la suite, **Valdés-Bermejo et Gómez (1976)**, dans une étude Cary morphologique sur des Taxons provenant de la région d'Aranjuez (Espagne), ont signalé pour la première fois L'existence du cytotype diploïde ( $2n = 18$ ) pour ce taxon (**Ouyahya et Viano 1988**). Ce même cytotype a été révélé en Tunisie (**Ferchichi, 1997**) et en Algérie (**Bougoutaia et al. 2014**).

Pour les approches caryologiques et cytogénétiques moléculaires plus poussées, les études ont porté principalement sur l'estimation de la quantité d'ADN Nucléaire (**Torrell et Vallès, 2001**), l'étude des régions d'ADN riches en bases GC au niveau des chromosomes par les techniques de fluorochrome banding et la localisation des sites d'ADNr par la technique de FISH (**Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell et al. 2003**).

## II.1 Diversité génétique et variabilité génétique

La diversité génétique est l'étendue de la variabilité génétique mesurée dans un individu, une population, une métapopulation, une espèce ou un groupe d'espèces (**Frankham (2002), Freeland (2005). John Avise (2004)** élargit le concept de la variabilité génétique et déclare « la biodiversité est la diversité génétique »

Au sein d'une population, les généticiens des populations et les généticiens quantitatifs, utilisent des paramètres différents pour estimer la variabilité génétique. Le polymorphisme des marqueurs moléculaires sera appelé diversité génétique et celui des caractères phénotypiques sera appelé variabilité génétique. La diversité génétique fait appel à l'étude des distributions des fréquences alléliques alors que la variabilité génétique s'appuie sur les composantes de la variance génétique de caractères quantitatifs. (**Kremer, 1994**)

La relation entre variabilité et diversité, suggère l'existence d'une corrélation entre ces deux paramètres. Les données relatives à la diversité, ne concernent pas les locus contrôlant les caractères quantitatifs, mais des marqueurs génétiques neutres vis-à-vis de la sélection naturelle.

## II.2 Diversités des espèces

En observant de près les plantes dans la nature, l'on découvre la grande variété et la diversité des végétaux qui la compose. Il en existe plus de 350 000 espèces végétales dont plus 240 000 espèces de plantes à fleurs et des millions de variétés horticoles. Les botanistes ont été amenés à identifier les plantes en faisant une description précise des caractères qui leur sont propres et ensuite à les classer selon un système ordonné et cohérent. Linné reconnaissait déjà l'existence d'une telle variabilité mais l'interprétait, uniquement ou presque, en fonction de l'action du milieu.

C'est donc à une époque récente, depuis la découverte des lois de Mendel vers 1900, que l'étude de la variation intra spécifique s'est trouvée pleinement justifiée pour finalement devenir la base des analyses taxonomiques et le support de toutes les considérations relatives au phénomène de l'évolution (**Bidault, 1971**).

## II.3 Polymorphisme génétique :

Le concept de polymorphisme génétique (du grec « *poly* » plusieurs et « *morphê* » forme) désigne la coexistence de plusieurs allèles pour un gène ou locus donnés, dans une population (**Pierre, 1998**).

Il explique qu'une espèce présente des individus aux caractères phénotypiques différents (appelés morphotypes) au sein d'une même population. C'est un des éléments, interspécifique, de la diversité génétique qui est considérée comme facilitant l'adaptation des populations à leur environnement plus ou moins changeant (**Frankham, 1997**)

Le Polymorphisme des marqueurs moléculaires est appelé diversité génétique et celui des caractères phénotypiques est variabilité génétique.

#### **II.4 Méthodes d'analyse de variabilité génétique :**

Il existe trois approches pour estimer la variabilité génétique intra spécifique :

##### **A. Soit on basant sur la variabilité phénotypique**

À l'aide des techniques statistiques d'analyse on traite nos données (mesures quantitative et qualitative), on estime l'importance relative de cette variabilité (significative ou non). Cette méthode est très utilisée à cause de leur simplicité, rapidité et elle est peu onéreuse.

##### **B. Par l'analyse de la variabilité enzymatique (Murphy et al, 1990 in Parizeau, 1997).**

À l'aide de l'électrophorèse et à cause la propriété des protéines (souvent chargée négativement), on établit une correspondance entre la variabilité de ces molécules (qui sont le produit de la transcription de l'ADN) et celle génétique. Malgré les importantes limites identifiées dans cette approche (elles ne représentent que les gènes Codants), mais elle est fréquemment utilisée (elle est relativement rapide et peu coûteuse) (**Parizeau, 1997**)

##### **C. Soit par une analyse directe de la variabilité génétique,**

Qui consiste à établir la séquence des nucléotides. Cette approche qui est la plus fiable, elle est de plus en plus régulièrement utilisée bien que des techniques employées soient coûteuses et lentes, et qu'elles exigent des équipements spécialisés ainsi qu'un personnel qualifié la variabilité et la diversité. Au sein d'une population, les généticiens des populations et les généticiens quantitatifs, utilisent des paramètres différents pour estimer la variabilité génétique.

#### **II.5 Les marqueurs génétiques**

Un marqueur génétique est simplement une portion de l'ADN (acide désoxyribonucléique) de l'organisme étudié, ou un sous-produit codé par cet ADN (comme une protéine).

Un marqueur génétique représente n'importe quel caractère visible ou mesurable chez un être vivant. Chaque marqueur possède des caractères spécifiques favorisant ou limitant son utilisation dans une application particulière. Le marqueur doit répondre aux caractéristiques essentielles encourageant son emploi à savoir : un coût convenable permettant son utilisation et développement, il ne doit pas être soumis aux variations environnementales et il ne doit pas être polymorphe et codominant dans son expression (**White et al, 2007**).

Parmi les marqueurs génétiques, on a : Les marqueurs morphologiques, les marqueurs enzymatiques et les marqueurs moléculaires

### **II.5.1 Les marqueurs morphologiques**

Les caractères morphologiques ont été les premiers marqueurs génétiques utilisés. Ils représentent généralement des mutations observées chez les plantes (**Franklin et al, 1970**).

Les Variations, dues à ces mutations, peuvent être de type qualitatif tel que la couleur des fleurs et la forme des feuilles ou des résistances à des maladies ou ravageurs (**Ward et al 2008**).

Les caractères morphologiques intéressent diverses parties de la plante, par exemple Longueur des tiges, surface foliaire, initiation de la floraison (**Cui z et al, 2001 ; Gomez et al, 2004**).

### **II.5.2 Les marqueurs biochimiques**

Les marqueurs biochimiques ont été les premiers marqueurs avoir été mis en œuvre pour étudier la variabilité génétique (**Harry., 2001**). Ils sont représentés par les marqueurs enzymatiques et Les protéines totales :

#### **II.5.2.1 Les marqueurs enzymatiques**

Elles se basent sur l'utilisation des allozymes révélateurs (**Wheeler et al, 1992**)

#### **II.5.2.2 Les protéines totales**

Dans le cas de l'analyse de la variation des protéines totales, la technique d'électrophorèse à deux dimensions sur gel de polyacrylamide (2-D PAGE) est utilisée. Contrairement aux allozymes, la technique 2-D PAGE révèle la variation entre l'ensemble des enzymes et les autres protéines de la plante (**White et al, 2007**).

Les marqueurs biochimiques ont également été utilisés en combinaison avec des marqueurs Morphologiques pour comparer la structuration de la diversité génétique (**Jenczewski et al ; 1999**).

Vu le faible niveau de polymorphisme révélé par les marqueurs biochimiques et sa variabilité en fonction des conditions environnementales, il est souvent nécessaire d'utiliser

les marqueurs moléculaires pour compléter l'évaluation et l'étiquetage des ressources génétiques.

### **II.5.3 Les Marqueurs moléculaires**

Les marqueurs moléculaires sont utilisés pour étudier la variabilité de la diversité génétique directement sur l'ADN, plutôt que sur des caractères qui sont soumis à l'influence de l'environnement comme les propriétés morphologiques. Ils sont particulièrement utiles dans les recherches sur la diversité génétique des plantes et la structure génétiques des espèces (**Becerra et al, 2000 in Carmen R., 2008.**). Ils offrent de nombreuses possibilités de révélation du polymorphisme d'ADN (**Hamon et al, 2003 in Carmen R., 2008.**).

Les marqueurs moléculaires sont des petites séquences d'ADN génomique qui Représentent des variations et/ou des mutations dans la séquence d'ADN de différents Individus (**Singh et Singh, 2015.**). Si cette variation est liée à un gène d'intérêt, ces marqueurs Peuvent être utilisés dans la détection de polymorphisme entre les allèles ou les génotypes De ce gène (**Jiang, 2017.**)

Plusieurs systèmes de marqueurs moléculaires sont développés dès les années 1980 en parallèle avec le progrès des technologies de révélation récapitulées en trois méthodes Essentielles : la technique d'hybridation ADN/ADN ou ARN/ADN, la technique de PCR (Polymerase Chain Réaction) et la technologie de séquençage.

#### **A. Les marqueurs basés sur l'hybridation d'ADN**

##### **II.5.3.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisme)**

Les marqueurs RFLP ou polymorphisme de longueur des fragments de restriction constituent des marqueurs moléculaires basés sur les techniques d'hybridation. Les RFLP sont les premiers marqueurs moléculaires développés et ont été utilisés en 1980 dans la construction de la carte génétique humaine (**Botstein et al ; 1980.**). Dans ce système, l'ADN génomique est digéré par des endonucléases (restrictions) qui réduisent le génome gigantesque à un pool de fragments à différentes tailles suivi d'une séparation par électrophorèse sur gel d'agarose (**Mohler et Schwarz., 2005.**).

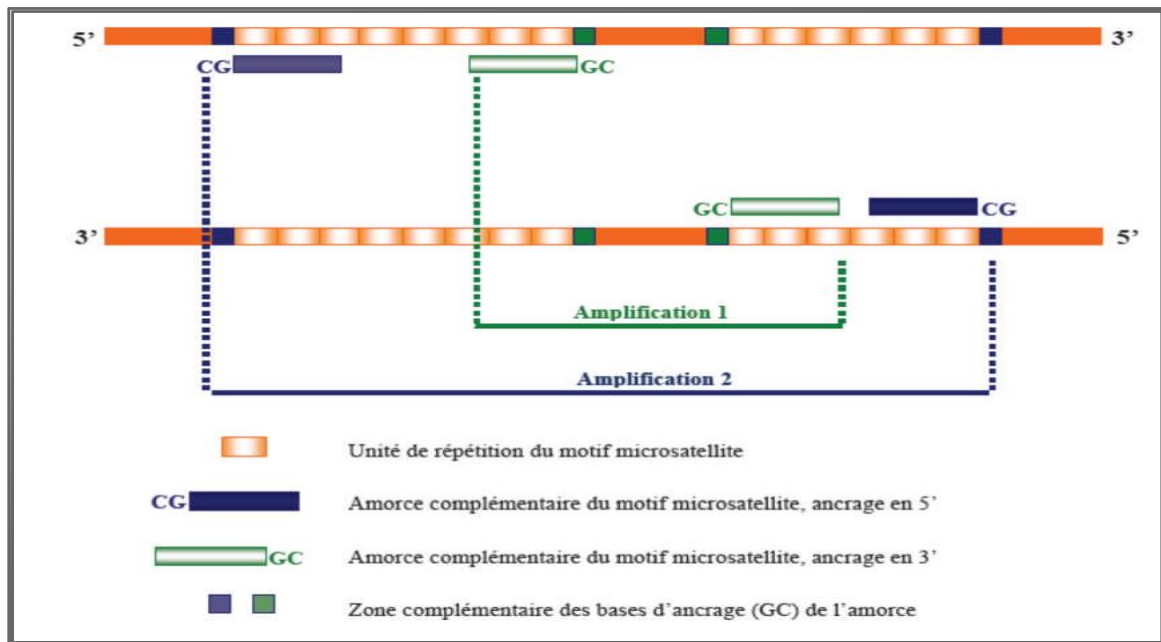
#### **B. Les marqueurs basés sur la technique PCR**

Le développement de la technique de PCR (polymérase Chain Réaction) offre l'avantage d'analyser les marqueurs moléculaires en un temps court tout en utilisant des

concentrations faibles d'ADN. Les marqueurs basés sur la technique de PCR tendent à remplacer les systèmes classiques (les marqueurs morphologiques, iso-enzymes et RFLP) et deviennent très nombreuses (AFLP, ISSR, RAPD, SSR,...) (Najimi et al, 2003). Les plus employés dans les études de la diversité génétique sont sans doute les microsatellites ou SSR.

### II.5.3.2 ISSR (Inter Simple Sequence Repeat)

Cette technique, principalement développée par Zietkiewicz *et al.* (1994) et Wu *et al.* (1994), est basée sur l'amplification par PCR des régions entre les microsatellites. On retrouve plusieurs autres appellations pour cette technique : **I-SSR PCR** (*Inter Simple Sequence Repeat PCR*), **IMA** (*Inter Microsatellite Amplification*), **IRA** (*Inter Repeat Amplification*) et **ISA** (*Inter-SSR Amplification*). On utilise une amorce constituée d'une séquence de microsatellites et parfois d'une partie arbitraire (amorces ancrées, en 5' ou en 3'). Par la suite, en effectuant une simple PCR, il y aura amplification de fragments flanqués de microsatellites. Les ISSR sont donc des marqueurs non spécifiques de locus, de type dominant. Contrairement à l'utilisation d'amorces spécifiques des régions flanquant les microsatellites, il n'est pas nécessaire de connaître ici la séquence étudiée. Cette technique permet d'amplifier un grand nombre de fragments d'ADN par réaction, et est supérieure aux marqueurs RAPD en terme de détection de polymorphismes et de reproductibilité (Zietkiewicz *et al.* 1994; Quian *et al.*, 2001; Ye *et al.*, 2008). L'usage d'amorces plus longues que pour les RAPD (jusqu'à 17 bases contre 10 à 12 généralement utilisées dans les analyses RAPD) contribue à cette reproductibilité (Charters *et al.*, 1996). Les appliquons polymorphes peuvent être séparés sur un gel d'agarose et révélés suite à une coloration au bromure, mais une meilleure résolution est généralement obtenue sur gel de polyacrylamide et par coloration au nitrate d'argent ou par marquage radioactif ou fluorescent (**Figure 03**)



**Figure 03:** principe de la technique ISSR (Julio, 2005).

Les amorces correspondant à un motif microsatellite sont ancrées soit en 5' soit en 3'. Lorsque les amorces sont ancrées en 5', le polymorphisme peut provenir soit du nombre de répétitions du motif microsatellite, soit de la longueur de la séquence entre les microsatellites. Lorsque les amorces sont ancrées en 3' le polymorphisme ne peut provenir que de la longueur de la séquence entre les microsatellites.

La technique ISSR –PCR, principalement développée par **Zietkiewicz *et al.* (1994)** et **Wu *et al.* (1994)**, est basée sur l'amplification par PCR des régions entre les microsatellites. Les ISSR sont des marqueurs non spécifiques de locus, de type dominant. Contrairement à l'utilisation d'amorces spécifiques des régions flanquant les microsatellites, Cette technique permet d'amplifier un grand nombre de fragments d'ADN par réaction, et est supérieure aux marqueurs RAPD en terme de détection de polymorphismes et de reproductibilité (**Zietkiewicz *et al.*, 1994; Quianet *et al.*, 2001; Yeet *et al.*, 2008**).

### II.5.3.3 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Les marqueurs RAPD sont les premiers marqueurs basés sur la PCR, ils sont développés indépendamment par **Welsh et McClelland (1990)** et **Williams *et al.* (1990)**. Ce type de marqueur est facile à utiliser car il ne nécessite pas d'informations préalables sur la séquence d'ADN pour établir les amorces adéquates.

La réaction PCR dans une analyse RAPD n'exige qu'une petite quantité d'ADN à amplifier (généralement moins de 10 nanogrammes) et des amorces universelles simples Brin



à séquences aléatoires d'ordre de 10 paires de base (pb). Ce marqueur a la potentialité d'amplifier aléatoirement l'ADN génomique cible ce qui révèle tout possible polymorphisme entre individus, dont l'amplification aura lieu dans les fragments d'ADN génomique complémentaire à l'amorce utilisée (White et al. 2007).

La technique RAPD est simple, rapide et ne nécessite ni un marquage radioactif ni une connaissance préalable de la séquence nucléotidique. Néanmoins, elle manque de reproductibilité puisqu'elle est très sensible à la concentration d'ADN et aux conditions d'amplification (Najimi et al. 2003) (Figure 04)

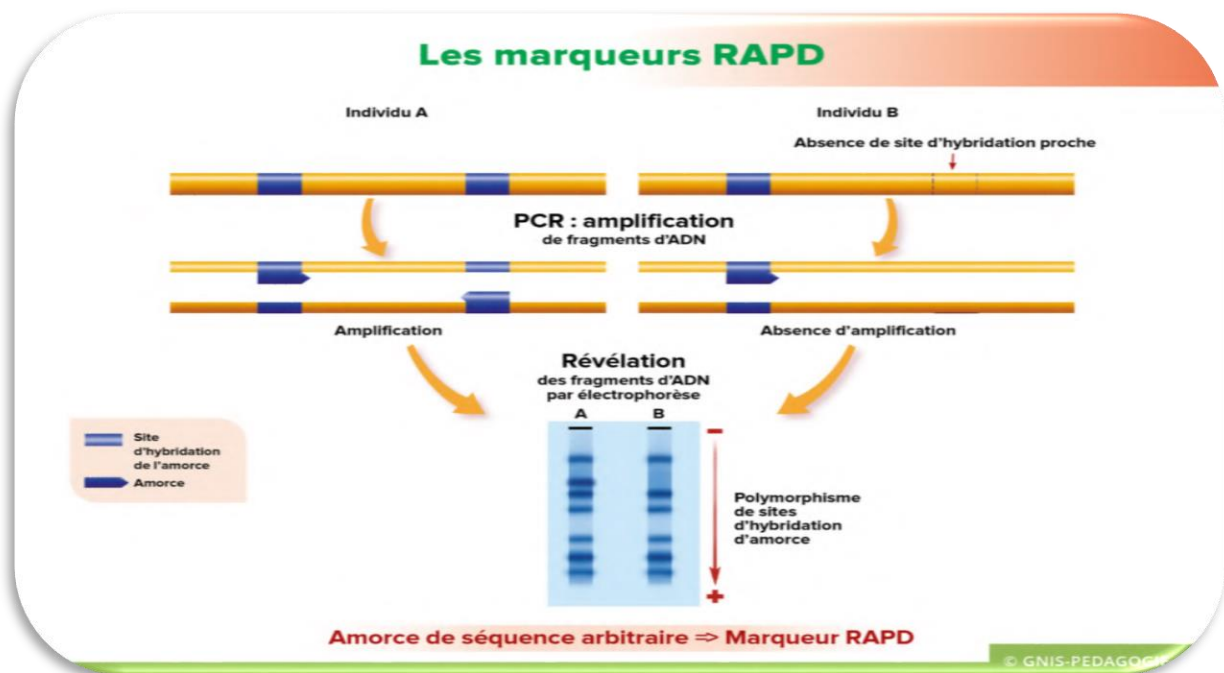


Figure 04 : La technique RAPD

#### II.5.3.4 Microsatellites ou SSR (Simple Sequence Repeat)

Les microsatellites, dénommés aussi marqueurs SSR, STR (short tandem repeats) ou STMS (sequence-tagged microsatellite sites) sont des petits fragments d'ADN, généralement de l'ordre de 2 à 5 pb, répétés en tandem dans le génome. Les bons SSRs ont habituellement une répétition de motif nucléotidique de 9 à 30 fois. Ces marqueurs sont développés, initialement, pour établir les cartes génétiques humaines (Weber et May, 1989).

En pratique, les SSRs constituent de bons marqueurs moléculaires en termes de reproductibilité et codominance, mais leur caractérisation initiale nécessite un investissement relativement considérable. En effet, leur production doit passer d'abord par le clonage et le séquençage afin de créer une base de données des séquences de ces éléments répétés (Ostrander et al, 1992).

## II.6 Extraction et purification des acides nucléiques

### ➤ technique permettant d'isoler l'ADN

Dans la grande majorité des cas, la technique d'extraction des acides nucléiques doit être adaptée à

- L'échantillon biologique
- La nature du génome (cellulaire, exogène)
- Au nombre de copies dans l'échantillon
- Aux méthodes de biologie moléculaire utilisées ultérieurement (polymerase chain reaction (PCR), Southern- blot, électrophorèse en champ pulsé...).

### ➤ Les principaux procédés d'extraction de l'ADN différent et peuvent se classer en trois principaux types:

- Les méthodes utilisant des solvants organiques.
- Les méthodes utilisant des solvants non organiques.
- Les méthodes basées sur l'utilisation de micro colonnes de résines échangeuses d'ions.

### II.6.1 Principe de la lyophilisation

La lyophilisation est un procédé discontinu, lent et mis au service de l'industrie pharmaceutique depuis 1930 pour améliorer la conservation d'un produit (**Thorne, 2015**). La lyophilisation permet d'obtenir des produits de la meilleure qualité par rapport aux produits séchés avec des méthodes traditionnelles (**Kunal et al. 2015**). La lyophilisation est une opération de déshydratation à basse température et à basse pression qui consiste à éliminer principalement par sublimation la majeure partie de l'eau contenue dans un produit (**Eni, 2011**). L'absence d'eau permet sa conservation et sa stabilité dans le long terme (**Thorne, 2015**). Par l'abaissement de l'activité de l'eau, vitesses de réactions chimiques ou biochimiques peuvent alors être fortement ralenties (**Eni, 2011**). Parmi les techniques à froid ; la lyophilisation permet de conserver le volume, l'aspect (forme final) et les propriétés du produit (**Thorne, 2015**).

Le procédé de lyophilisation est composé de trois étapes principales, successives et indissociables :

- la congélation : consiste à diminuer la température de celui-ci à une valeur comprise entre  $-10\text{ C}^\circ$  et  $-80\text{ C}^\circ$  qui transforme l'eau libre en cristaux de glace (**Eni, 2011 ; Thorne, 2015**) ;

- la dessiccation primaire (sublimation) : c'est un changement d'état au cours duquel un corps passe directement de l'état solide à l'état gazeux sans passage par l'état liquide, sous un vide. Elle consiste à sublimer les cristaux de glace formée. Elle est la plus longue des trois étapes de la lyophilisation (Desage, 2009 ; Eni, 2011 ; Kunal, 2015).
- la dessiccation secondaire (désorption) : une fois que la lyophilisation primaire est terminée et que toute la glace s'est sublimée, l'humidité liée est toujours présente dans le produit. Donc cette étape permet d'éliminer l'eau liée et non congelée adsorbée à la surface des pores de la matière sèche ou incluse dans la masse du lyophilisat. Pour l'objectif de réduire l'humidité résiduelle à un niveau de l'ordre de 3 à 1 % pour augmenter la durée de conservation à long terme (Thorne, 2015 ; Kunal, 2015 ; Eni, 2011). La désorption est la raison principale de l'utilisation de la lyophilisation, car justement on peut atteindre une très bonne qualité du produit (Desage, 2009).

## II.6.2 Extraction d'ADN génomique

L'extraction et l'isolement de l'ADN génomique intact est une étape essentielle dans différentes applications de la biologie moléculaire (Abdellaoui, 2012). Leur objectif est d'isoler la molécule d'ADN de toute autre molécule organique, et d'en obtenir une quantité suffisante et de pureté satisfaisante pour permettre toutes les manipulations postérieures de biologie moléculaire (Ben larbi et al, 2014).

- **Différents protocoles pour extraire l'ADN avec même schéma de principe :**

- Lyse des cellules
- Dénaturation et élimination des protéines
- Élimination des autres acides nucléiques (ARN...)
- précipitation et récupération et concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool

### II.6.2.1 Différentes méthodes d'extraction d'ADN génomique

#### A. Méthode conventionnelle (SDS)

Les méthodes classiques sont des méthodes manuelles qui assurent l'isolement de l'ADN par l'utilisation de solutions chimiques de différentes concentrations et/ou l'introduction d'éléments qui facilitent l'isolement de l'ADN (Ben larbi et al., 2014). La plupart des protocoles d'extraction d'ADN tissulaire utilisent un détergent SDS (Dodécyl sulfate de sodium), puisque leur utilisation aide à digérer la membrane cellulaire et libérer plus d'acides nucléiques au cours de la lyse cellulaire. Il a également la propriété de perturber

les interactions acide nucléique / protéine, en séparant les protéines des acides nucléiques (**Barbier et al., 2019 ; André et al. 2018**).

Il y a la possibilité d'adapter les protocoles pour extraire l'ADN plus rapidement, sans toute fois perdre la qualité de l'échantillon (**André et al., 2018**).

### **B. Méthodes des kits**

En laboratoire, les méthodes traditionnelles d'extraction de l'ADN génomique sont remplacées par les kits commerciaux (**Holzappel, 2018**). Un kit d'extraction est un paquet commercialisé qui contient tous les réactifs prêt à l'emploi et / ou matériels permettant de réaliser l'extraction de l'ADN de façon rapide (**Ben larbi et al., 2014**). L'extraction de l'ADN par le kit se caractérise par la reproductivité et l'absence de l'utilisation des solvants toxiques (**Benedict et al. 2018**). Cependant, ils sont souvent coûteux, ce qui empêche leur utilisation. Les kits trouvés aujourd'hui sur marché sont spécifiques à l'espèce ou au type de l'organisme étudié, au type de source de l'ADN, au type d'acides nucléique qu'on veut extraire et la méthode d'extraction (kits manuelles et kits pour les extracteurs automatiques qui contiennent juste les tampons de lyse d'élution) (**Ben larbi et al., 2014**).

### **C. Extraction d'ADN génomique à la méthode CTAB**

La majorité des méthodes d'extraction d'ADN végétal sont dérivées de la méthode originale basée sur le CTAB (**Healey et al., 2014**), qui a été élaboré pour la première fois par **Murray et Thompson en 1980**, elle convient pour l'extraction et la purification d'ADN des végétaux et convient particulièrement pour la suppression des polysaccharides et des composés poly phénoliques qui affectent la pureté de l'ADN et donc sa qualité (**Murray et Thompson, 1980**). La méthode se repose sur l'utilisation d'un détergent cationique CTAB pour faire une lyse chimique qui va permettre la solubilisation de la paroi cellulaire afin d'extraire l'ADN (**Marsal et al., 2011**).

## **II.6.3 Différentes techniques d'analyse d'ADN**

### **II.6.3.1 Analyse de la concentration d'ADN par spectrophotomètre**

La spectrophotométrie est une méthode analytique quantitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique d'une substance chimique donnée en solution. L'absorbance maximale des acides nucléiques est fixée à 260 nm, tandis que l'absorbance maximale de solutions à base de protéines est de 280 nm et l'absorbance à 230 nm caractérise les acides phénoliques (**Ben larbi et al., 2014**).

La pureté de l'ADN est déterminée grâce aux rapports : Un rapport 260/280 supérieur à 1,7 signifie que l'acide nucléique est pur, tandis qu'une faible valeur indique une contamination par des protéines. Un rapport 260/230 supérieur à 2 est également un indicateur de pureté, une faible valeur est le signe d'une contamination par des acides phénoliques, des sucres, ou des sels.

### II.6.3.2 Analyse par migration électrophorétique sur gel d'agarose

La migration sur gel d'agarose permet d'évaluer l'intégrité de l'ADN. Elle consiste à séparer les fragments d'ADN en fonction de leur taille. L'ADN étant chargé négativement va migrer dans le gel soumis à un champ électrique vers le pôle positif (anode). Il est visualisé sous forme de bandes colorées, grâce au bromure d'éthidium (BET) sous illumination par UV (Tellaa, 2013). L'intensité de la fluorescence est proportionnelle à la quantité de l'ADN linéaire. Cette méthode peut être utilisée pour obtenir une estimation de la quantité d'ADN dans les échantillons.

### II.6.3.3 La PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) est fondée sur une réaction enzymatique *in vitro* permettant d'amplifier plusieurs millions de fois des séquences d'ADN génomique, on utilisant des amorces nucléotidiques. L'incorporation de désoxyribonucléotides libres grâce à une enzyme ADN polymérase thermostable. Des variations cycliques de températures vont permettre successivement la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces et leur extension par l'ADN polymérase (Zafrani et al., 2019). La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend :

➤ **L'acide désoxyribonucléique contenant le fragment à amplifier**

Avant la réaction de PCR, l'ADN est extrait à partir de l'échantillon que l'on veut analyser. Puis, cet extrait purifié, contenant le fragment d'ADN que l'on souhaite amplifier, peut être utilisé en PCR (Tellaa, 2013).

➤ **Les amorces (primers)**

Ce sont des oligonucléotides d'une taille comprise entre 17 Pb et 30 Pb (Tellaa, 2013) capables de s'hybrider de façon spécifique, par complémentarité des bases, sur l'un des deux brins d'ADN. Les amorces encadrent la séquence d'intérêt, et l'allongement se fait dans des

directions opposées (**Goossens, 1990**). Ils possèdent une composition globale de 50 % [G+C] (**Tellaa, 2013**). De plus, Les amorces sont en très forte concentration par rapport à celle de l'ADN à amplifier (**Reddahi, 2017**). Leur choix est très important, ils déterminent les caractéristiques de l'ADN amplifié (longueur, spécificité et nature) (**Onnier, 1999**).

➤ **L'enzyme, Taq polymérase**

Cette enzyme a été purifiée à partir d'une bactérie vivante *Thermus Aquaticus* (Taq), il s'agit d'une ADN polymérase ADN-dépendante, thermorésistante et possédant une activité exonucléase 5' 3' (**Tellaa, 2013**), permettant la synthèse des nouveaux brins d'ADN lors de l'amplification (**Onnier, 1999**).

➤ **Les Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)**

Les dNTP (Désoxyribonucléotides-Tri-Phosphates) sont des molécules de base, qui constituent l'ADN, seront assemblés par la Taq-polymérase et formeront le brin d'ADN complémentaire (**Tellaa, 2013**).

➤ **Un tampon**

Le tampon 10X est souvent utilisé, il contient en général du Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$  (15mM), pH8 (**Onnier, 1999**).

➤  **$\text{MgCl}_2$**

Ce cation est un cofacteur indispensable au bon fonctionnement de la polymérase et l'incorporation des précurseurs. Il doit être apporté en concentration précises sous forme de  $\text{MgCl}_2$  (**Tellaa, 2013**). La présence dans le milieu réactionnel des cations bivalents  $\text{Mg}^{2+}$  et de cations monovalents ( $\text{K}^+$  ou  $\text{NH}_4^+$ ) vont neutraliser les charges négatives des groupements phosphates au niveau de l'ADN et ainsi stabiliser les hybrides ADN /ADN (**Benaissa, 2008**).

### Présentation de l'étude

Nous avons réalisés durant l'année 2022/2023, une étude théorique sous forme d'une analyse systématique sur 3 articles basant sur l'étude de polymorphisme génétique d'*Artemisia Herba alba* provenant de plusieurs régions du monde ayant des étages bioclimatiques différents: Algérie, Tunisie, Jordan et Libye.

Les chercheurs scientifiques (**Bougoutaia et al, 2014, Benchohra et al, 2016 Haouari et Ferchichi Ali, 2008**) ont utilisé des marqueurs ISSR ou RAPD en se basant sur l'utilisation de la méthode PCR.

Notre synthèse bibliographique a duré 6 mois successives de mois de janvier jusqu'au mois de juin.

### Nature de données :

Nous avons réalisé une recherche en ligne qui nécessite des moteurs de recherche scientifique et des mots clés.

**Tableau 02** : présente la nature des données de notre documentation scientifique

**Tableau 02: Présentation de la nature des données**

	Nature des données
Les moteurs de recherche	SNDL
	Google scolaire
	Pub Med
	ResearchGate
	Nature
Les mots clés	<i>Artemisia herba-alba</i> , polymorphisme génétique, marqueurs moléculaires, ISSR,RAPD
La langue	Anglais, Français
L'année de publication	2006-2021
Nombre d'articles	Total/ 20 articles
	Éliminés/ 17 Articles
	Inclus / 03 Articles

## III.1 Matériel végétal

le **Tableau 03** indique la localisation géographique et le matériel végétal récolté dans la zone choisie par chaque auteur.

**Tableau 03** : Site et période de récolte d'*Artemisia herba alba*

Numéro d'Article	Auteur	Nombre d'individu étudiés	Partie du Végétal récoltée	Lieu et année de récolte	Marqueurs génétiques utilisées
Article 1	Haouari et Ferchichi Ali, 2008	216 individus	<b>Feuilles conservées</b> Ces accessions ont été collectées et conservées depuis plusieurs années dans l'institut des Régions Arides de Médenine	<b>Tunisie (2007)</b> Medenine, Gafsa, Tataouine, Sidi Bouzid, Gabes	<b>ISSR A830241</b> <b>ISSR HB10</b> <b>ISSR HB12</b> <b>ISSR 17899B</b>
Article2	Bougoutaia et al, 2014	18 individus	<b>Feuilles fraîches</b>	<b>Algérie (2013)</b> -Taadmit (1220md'altitude) -Oued Sedar (1270md'altitude)	<b>L'amorce ISSR X14 TRAAR (GCC)</b>
Article 3	Benchohra et al, 2016	12 individus	<b>Feuilles fraîches</b>	<b>Algérie (2013)</b> El-Manseb (Altitude 1326m) sont situés sur les hauts plateaux du Sud Est de la province de Tiaret	<b>L'amorce ISSR X14 TRAAR (GCC)</b>

Les chercheurs ont utilisé les apex racinaires de l'espèce *Artemisia herba alba asso* récoltée dans la région de Taadmit pour effectuer de le dénombrement chromosomique

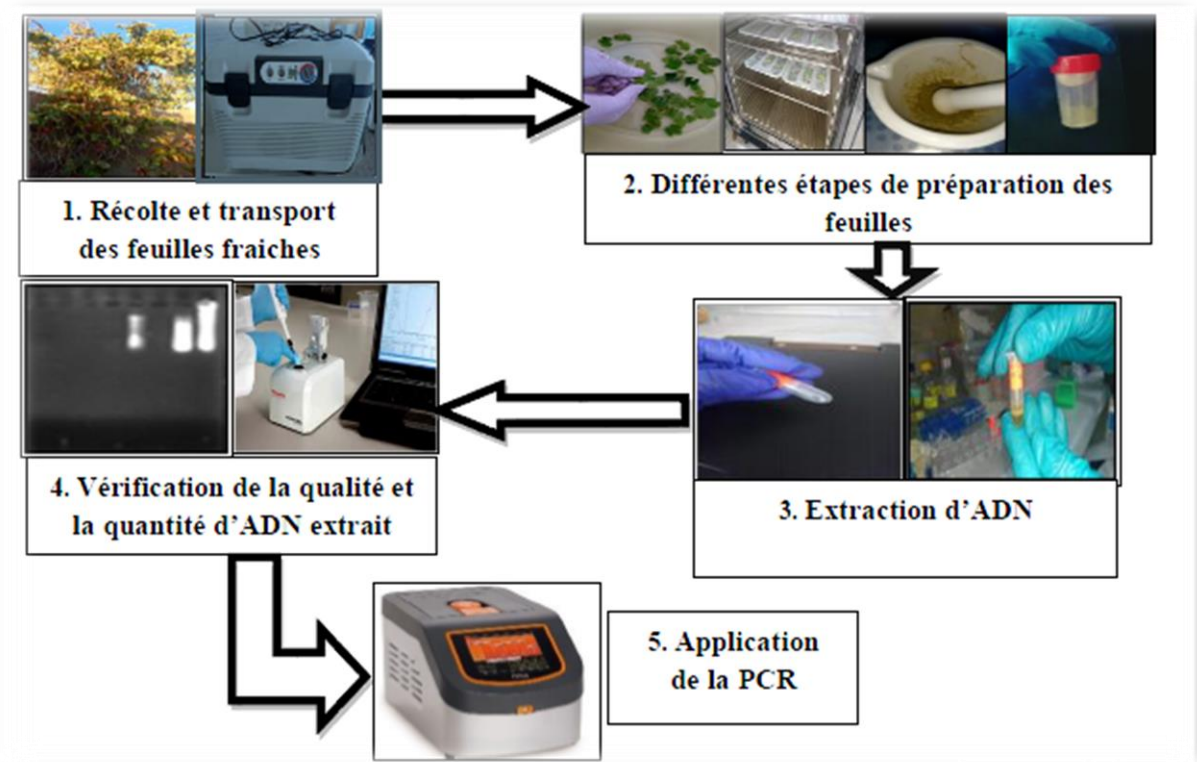


### III.2 Méthodes utilisés

#### III.2.1 : Stratégie du travail

Les chercheurs scientifiques ont réalisé presque la même stratégie du travail. Leur étude est effectuée en plusieurs étapes (**Figure 05**)

1. La récolte des feuilles des racines ou des plantes entières, Laver, sécher et conserver les échantillons
2. Broyages des parties de la plante conservée suivies une lyse cellulaire (destruction de la membrane plasmique et nucléaire pour libérer l'acide nucléique) puis l'élimination des différents contaminants comme les lipides, les protéines et les métabolites secondaires.
3. Extraction d'ADN génomique (Isoler l'ADN génomique par l'application de la méthode CTAB (une extraction liquide-liquide) et la purifier
4. Vérifier la qualité et la quantité d'ADN extrait en réalisant une migration sur gel d'agarose qui permet de déterminer l'existence et l'intégrité d'ADN extrait (appliquer la méthode d'électrophorèse).
5. Déterminer la concentration de l'ADN et sa pureté par la méthode spectrophotométrique
6. Finalement, PCR où l'ADN extrait est amplifiée grâce à un couple d'amorces spécifiques (ISSR). Les produits de PCR obtenus (d'une taille entre 233pb et 263pb) sont contrôlés par une électrophorèse sur gel d'agarose (2%). Après coloration au BET (bromure d'éthidium), les bandes sont visualisées sous U.V, et leurs tailles sont estimées par rapport au standard de poids moléculaire.



**Figure 05** : Illustration schématique des différentes étapes de travail des auteurs

#### III.4.2 : Collecte des échantillons :

Les feuilles, racines ou plantes entières récoltées sont mises dans des sachets en plastique et sont transportés dans une glacière (+4°C). En premier temps, Les échantillons collectés sont nettoyés par l'eau distillée pour éliminer toute trace de poussière, insectes ...etc.

#### III.4.3 : Séchage des Echantillons

Les feuilles collectées ont été séchées en appliquant deux différentes méthodes de séchage, à l'étuve ventilée et par lyophilisateur.

##### III.4.3.1 : Séchage des feuilles à l'étuve ventilée

Les Echantillons ont été séchées selon la procédure de **Benbouza et al. (2006)**. Le séchage à chaud a été réalisé dans l'étuve ventilée pendant 5 jours à 27°C afin de bien les sécher sur des plateaux. Les feuilles sèches ont été mises dans des bocaux stériles bien fermés.

### III.4.3.2 : Séchage des Echantillons par lyophilisation selon Kang et Yang (2004) et Nunes et al. (2011)

- D'abord, il faut passer par une étape de congélation. les Echantillons nettoyés sont déposés dans des boites des pétries stériles ; mettre ces boites dans un congélateur à -25°C pendant un jour.
- Après la congélation, mettre les échantillons congelées sur les plateaux de lyophilisateur et lancer l'appareil à une température égale à -100°C et à une pression égale à 1000 mBar. Cette étape se fait de façon discontinue pendant une durée de 14 heures 40 min.
- Déposer les échantillons séchés dans des bocaux stériles en présence de gel de silice.
- Fermer les boites hermétiquement et Conserver les échantillons à température ambiante pendant 5 mois.

### III.4.4. Broyage des feuilles

La plupart des cellules végétales ont une paroi cellulaire très dure (Nguyen-Kim, 2015) et elles nécessitent une méthode délicate pour lyse cette paroi en petits morceaux qui sont accessibles au traitement aux détergents (Surzcki, 2000). La qualité et la quantité de l'ADN extrait sont influencées par la proportion des parois cellulaires brisées (Henry, 2008). Les Echantillons sèches sont broyées manuellement par un pilon et mortier sans azote liquide. Après chaque échantillon, on a changé le mortier qui est désinfecté auparavant par l'éthanol 70%, sans oublier de nettoyer la paillasse avec l'eau de javel afin d'éviter les contaminations croisées. Puis, on met la poudre obtenue dans des flacons stériles bien étiquetés et bien fermés. La conservation des échantillons a été effectuée à température ambiante en présence de gel de silice (Chase et Hills, 1991).

### III.4.5 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été réalisée sur feuilles, des racines ou sur des parties entières de la plante en utilisant la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée.

Le protocole de base utilisé est une modification de celui préparé par Vroh Bi et al. (1996) à partir de la méthode CTAB (bromure de céthyl méthyle ammonium) de Murray & Thompson (1980). Les paramètres testés dans le cadre de cette étude pour optimiser cette méthode sont la quantité de charbon actif rajouté, la température de centrifugation à chaque

étape, la température et la durée de la précipitation de l'ADN à l'isopropanol, le temps de lavage de l'ADN (par le tampon) et l'incubation de l'ADN dilué dans le TE (Tris-EDTA) à 60 ° C.

#### III.4.5.1 Tampon d'extraction utilisé

Le tampon d'extraction est composé de 2 % (p/v) CTAB (bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium), 2 % (p/v) (poly vinyl pyrrolidone, Sigma), 2,0 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCL (pH 8,0) et 5 % (v/v) β-mercaptoéthanol (ajouté juste avant l'utilisation sous hôte). Les autres produits d'extraction sont le charbon actif (Sigma), un tampon de lavage (80 % d'éthanol, 10 mM d'ammonium acétate), une solution de pré-lavage au chloroforme : alcool isoamylique 24:1 (v/v) et la RNase A 10 µg.µl<sup>-1</sup> dans de l'eau distillée et autoclavée.

#### III.4.5.2 Protocole d'extraction d'ADN

Les tissus foliaires frais (70mg) se chaque individu d'A.Herba alba ont été broyée en présence d'azote liquide à l'aide d'un vibro-broyeur (RETSCH\_MM 4000), après addition de 1ml de CTAB de 2µl de b-mercaptoéthanol. la solution broyée a été incubée à 65C pendant 1h (termomixeur COMPACT EPPENDORF). L'ensemble a ensuite été centrifugé à 11000rpm pendant 10min à 4°C ; le surnageant a été récupéré et transféré dans un nouveau tube et un mélange en volume (v /v) de chloroforme : alcool isoamylique (24 :1) a été ajouté a une autre centrifugation a 13000rpm pendant 10 min a 4°C. Son pas fut répété deux fois, dans le tube ou le dernier surnageant est récupéré, un volume (2 /3) désopropanol froid a été ajouté et mélangé doucement en retournant les tubes puis incubé a -20 °C pendentif une nuit. après centrifugation a 700rpm pendant 20 min a 4°C le surnageant est éliminé et le culot est récupéré puis l&vés avec un tampon de lavage (éthanol 75%, Acétate d'ammonium 15 mm), centrifugé a 900 rpm pendant 10min a 4°C (le lavage est répété 3fois) et séché a l'air.

L'ADN a ensuite été lavé avec 500µl d'éthanol à 70% puis mis en suspension dans 50µl de tampon TE PH 8. Le culot D'ADN a été traité avec 7 µl de RNase par 100µl d'ADN et incubé pendant 30min à 37°C. Enfin, l'ADN a été stocké a 4°C pendant une courte période est a (-20°C) pendant une longue période.

### III.4.6 Evaluation de la qualité et la quantité d'ADN extrait

#### III.4.6.1. Vérification de l'intégrité d'ADN

L'intégrité d'ADN extrait ainsi que sa présence ont été vérifiées par l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 0,8%.

- Préparation et dépôt des échantillons (**Figure 08**) :
- dans un tube mettre 6  $\mu$ l de l'échantillon et ajouter 2  $\mu$ l du colorant de chargement
- déposer délicatement les échantillons, et noter son ordre
- placer le gel dans la cuve et s'assurer qu'il est recouvert de tampon TAE 1X
- brancher les fils et mettre le générateur de puissance sous tension à 100 volts pendant 17 min ; à la fin de la migration, l'ADN a été visualisé sous U.V après coloration au BET.

**Remarque :** Le BET s'intercale entre les bases azotées de la double hélice d'ADN et devient fluorescent après excitation par les ultraviolets. Plus le fragment d'ADN est long, plus la coloration émise est intense.



**Figure 06 :** Visualisation de l'ADN (Achour et Medjadbi 2019)

#### III.4.6.2 : Détermination du rendement d'extraction et la concentration d'ADN extrait

La spectrophotométrie ultra violette est la plus couramment utilisée pour la détermination de la concentration d'ADN. Les structures de résonance des bases pyrimidiques et purines sont responsables de ces absorptions (**Surzycki, 2000**).

### A. Rendement de l'extraction

Le rendement a été calculé en réalisant le rapport entre la quantité d'ADN obtenue et la masse initiale utilisée (Bienvenu *et al.*, 1999).

### B. Concentration de l'ADN extrait

L'ADN peut être mesuré directement dans des solutions aqueuses, par une mesure effectuée à 260 nm dans des solutions diluées au 1/100 ou 1/50 (selon le procédé), sachant que 1 unité d'absorbance correspond à 50 µg/ml d'ADN.

La concentration d'ADN extrait est calculée comme suit :

$$[\text{ADN}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{facteur de dilution.}$$

### C-Détermination de la pureté d'ADN extrait

L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un ratio. Les indications de la pureté ainsi les ratios sont représentés dans le **tableau 04** :

**Tableau 04** : Ratio, valeur et l'indication de pureté d'un échantillon d'ADN extrait.

Ratio	Valeur	Indication de pureté
A260nm/A280nm	>2,0	Contamination par les ARNs (Surzycki, 2000 ; Tiwari <i>et al.</i> ,2017)
	1,8-2,0	ADN pure (Surzycki, 2000)
	< 1,8	Contamination par des protéines et substance aromatique (Surzycki, 2000 ; Tiwari <i>et al.</i> , 2017)
A260nm/A230nm	>1,8	ADN pure (Ahakoud, 2015 ; Varma <i>et al.</i> 2007)
	<1,8	Contaminants corporifiés (poly phénols, polysaccharides) ou contamination par des solvants (phénol) (Varma <i>et al.</i> 2007 ; Tiwari <i>et al.</i> 2017)

## III.4.7. Amplification in vitro de l'ADN extrait par PCR

### III.4.7.1.1 Utilisant les marqueurs ISSR

Six amorces ont été testées pour cette étude l'amorce utilisé était celle a bandes claires (X14 primer TRAAR(GCC) 4), les réactions de PCR ont été réalisé dans un volume totale de 50ul contenant 10ul de tampon PCR 10X (KCl 50Mm, Tris-HCL 10mm, Mgcl2 1,5 mm, PH

9,0), 2ul de DNTP (2mm), 5ul d'amorces oligonucléotidique (20um), 1ul d'ADN polymérase Taq (0,5U/ul) et 27 ul de H<sub>2</sub>O.

Les différents des cycles de température pour les réactions PCR ont été réalisés selon la méthode de Zietkiewiez et al 1995 sur un thermocycleur (Eppendorf-TECHNETC 5000)

Le programme de polymérisation à comportement les étapes suivantes :

1. Dénaturation initiale de l'ADN
2. Activation suivie de la polymérase Taq à 95°C pendant 2min
3. 30 cycles d'amplification

Chaque cycle consiste en une dénaturation à 94°C pendant 30s et une élongation de 2min à 72°C.

#### **III.4.7.2 Séparation et visualisation de l'ADN :**

Après 30 cycles, une extension finale à 72°C a été appliquée pendant 5min  
Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en utilisant 3ul d'ADN ajoutés a 2ul d'eau ultra pure et 1ul de bleu de bromophinol dans un gel d'agarose à 1% (w /v TBE) pendant 1h80 volts. Les bandes d'ADN ont été détectées par de bromue d'éthidium (0,1%) pendant 90min, visualisées sous rayonnement UV et photographiées avec un appareil pour prendre des photos UV (DOC-PRINTVX2). La quantification de la taille des bandes d'ADN ampli est faite par le logiciel d'image J Gen

#### **III.4.7.3 L'analyse des données**

la similarité des données qualitatives a été générée à l'aide de l'indice de similarité (Nei est Li / Dice 1979) et a été analysé à l'aide de l'UPGMA ( méthode des groupes de pairs non pondérés utilisant des moyennes arithmétiques) et la calculé des coefficients de similarité qui ont été utilisés pour produire un dendrogramme

### IV.1 Marqueurs moléculaires étudiés

Plusieurs marqueurs moléculaires, tels que les séquences répétées simples (SSR), les polymorphismes de longueur de fragment amplifié (AFLP), les polymorphismes amplifiés liés à la séquence (SRAP), et technique (RAPD) sont devenues des marqueurs moléculaires de choix d'évaluer la divergence génétique de différentes espèces végétales. Cependant la plupart de ces marqueurs sont coûteux et nécessitent des amorces spécifiques. Dans notre étude, les marqueurs ISSR ont été utilisés pour évaluer la diversité génétique et la structure des populations d'*Artemisia herba alba*, ils sont très sensibles pour détecter le polymorphisme génomique et ne nécessitent pas de connaissance préalable de génome.

Les marqueurs ISSR impliquent l'amplification de l'ADN par une seule amorce de 16 à 18 pb composée d'une séquence répétée ancrée aux extrémités 3' ou 5' par 2 à 4 nucléotides arbitraires (Zietkiewicz *et al.* 1994). Ils sont faciles à manipuler, très informatifs et reproductibles. Étant donné que les séquences répétées sont abondantes dans tout le génome, les amorces SSR s'hybrident dans plusieurs régions, ce qui donne généralement un schéma d'amplification complexe dans lequel les fragments sont souvent polymorphes entre différents individus. Les amorces ISSR s'hybrident directement aux séquences répétées simples et donc, contrairement aux marqueurs SSR, aucune connaissance préalable de la séquence cible n'est requise pour les ISSR (Godwin *et al.*, 1997). De plus, les séquences ciblées par les amorces ISSR sont abondantes dans tout le génome eucaryote et évoluent rapidement.

Par conséquent, les ISSR peuvent révéler un nombre beaucoup plus élevé de fragments polymorphes par amorce que les RAPD (Fang et Roose, 1997 ; Esselman *et al.*, 1999). De plus, des études ont indiqué que l'ISSR produit des bandes plus fiables et reproductibles par rapport aux RAPD en raison de la température de recuit plus élevée et de la séquence plus longue des amorces ISSR (Tsumura *et al.* 1996; Nagaka et Ogihara, 1997). La principale limite à l'utilisation de tels marqueurs moléculaires chez *A. herba-alba* est sa trop grande richesse en métabolites secondaires (El-Kar, 2003). La présence de ces métabolites peut entraver les procédures et réactions d'isolement de l'ADN telles que la restriction, l'amplification et le clonage de l'ADN.

### IV.2 Travaux antérieurs

Après une recherche approfondie on a trouvé 03 articles scientifiques dont les auteurs sont Haouari et Ferchichi ; 2008, Bougoutaia *et al.*, 2014 et Benchohra *et al.* ; 2016 qui ont



réalisé l'Extraction d'ADN des feuilles vertes d'Armoise suivit par la Réaction PCR en utilisant plusieurs amorces ISSR

#### IV.2.1 Travaux de Haouari et Ferchichi ; 2008

**Thème : Etude du polymorphisme génétique d'*Artemisia herba-alba* de Tunisie à l'aide des marqueurs ISSR**

**Haouari et Ferchichi (2008)** ont réalisé une étude de la variabilité des traits morphologiques menée sur 226 accessions d'*A. herba-alba* provenant de plusieurs régions Tunisiennes ayant différents stades bioclimatiques en utilisant des marqueurs ISSR (Inter Simple Sequence Repeat). Ainsi, ils ont réalisé 08 étapes successives :

- Récolte du matériel végétal,
- Extraction d'ADN suivit par la Réaction PCR en utilisant 24 amorces ISSR,
- Caractériser la capacité de chaque marqueur ISSR : calculer

Le contenu informationnel du système de marqueurs ISS pour chaque locus en utilisant le contenu informationnel du polymorphisme (PIC) (Smith et al., 1997) qui fournit une estimation du pouvoir discriminant d'un locus en tenant compte non seulement du nombre d'allèles exprimés mais aussi de leurs fréquences relatives. Les valeurs PIC ont ensuite été utilisées pour calculer un indice d'amorce (PI), qui est généré en additionnant les valeurs PIC de tous les marqueurs amplifiés par la même amorce (Raina et al., 2001).

- Déterminer la similarité entre les accessions d'*A. herba-alba* en utilisant le coefficient SM (calculer l'aide du logiciel NTSYS-pc NUMERICAL Taxonomy and Multivariate Analysis System for personal computers), version 2.11 (Rolf, 2000) et Appliquer une analyse de mise à l'échelle multidimensionnelle non métrique (NMDS) à la matrice de similarité afin de révéler d'éventuels regroupements d'individus à l'aide du programme NTSYS-pc. L'indice de contrainte mesure la fiabilité du tracé NMDS : plus l'indice de contrainte est petit, meilleur est l'ajustement de la matrice de distance reproduite aux distances relatives sur le tracé.

- Appliquer le test de Mantel (1967) réalisé à l'aide du logiciel PC NTSYS : Pour trouver la relation entre la composition génétique et la répartition géographique des accessions
- Analyser Auto corrélation spatiale (Sokal et Oden, 1978) : Pour étudier la structure spatiale de la distribution de la diversité génétique
- Utiliser la statistique I de Moran (1950) incluse dans le logiciel PASSAGE

(Rosenberg, 2001) : pour construire un corrélogramme afin d'analyser cette auto corrélation

#### IV.2.1.1 Matériel végétal

Les chercheurs ont collectés Deux cent seize (216) accessions d'*A. herba-alba*. Ils ont été conservées depuis plusieurs années dans l'Institut des Régions Arides de Médenine. Ces accessions provenaient de différentes régions de la Tunisie (étages bioclimatiques différents : arides, semi arides, humides, subhumides, sahariennes).

#### IV.2.1.2 Extraction d'ADN, Réaction PCR (24 amorces ISSR utilisés)

L'extraction de l'ADN a été réalisée en utilisant le protocole de Linderet al. (2000) avec quelques modifications. Vingt-quatre amorces ont été testées. Ils sont composés de répétitions di-, tri- ou tétra-nucléotidiques et sont ancres ou non à leur extrémité 3'. Ces amorces ont été évaluées pour leur capacité à donner des schémas d'amplification clairs, polymorphes et reproductibles. Seuls les produits d'amplification ayant des bandes intensément colorées, non ambiguës et reproductibles ont été notés pour la présence (1) ou l'absence (0).

Vue l'isolement d'ADN à partir d'*A. herba-alba* selon le protocole de Linder et al. (2000) s'est avéré difficile car les feuilles sont très riches en composés polyphénoliques et ces composés peuvent se lier de manière covalente à l'ADN qui devient inutile dans les réactions enzymatiques (PCR, restriction), Haouari et Ferchichi (2008) ont réalisé certaines modifications du protocole de Linder pour extraire l'ADN avec une bonne qualité utilisable dans l'amplification par PCR. Ils ont apporté quelques modifications au tampon d'extraction comme suggéré par Linder et al. (2000). Ces modifications concernent :

1. L'utilisation du CTAB (au lieu du SDS) pour obtenir des polyphénols moins oxydés.
2. Remplacement du TRIS par de l'acide borique abaissant ainsi le pH du tampon et minimisant l'oxydation des polyphénols.
3. Augmenter la concentration de l'agent antioxydant.

Sur Vingt amorces testées 20 amorces ont été rejetées (elles ne donnaient aucune amplification) et quatre amorces ont été sélectionnées (Ils produisent des motifs de bandes interprétables et variables) (Tableau 05).

Les quatre amorces restantes ont été sélectionnées. Ils produisent des motifs de bandes interprétables et variables. Pour les 216 accessions, ces quatre amorces ont produit 60 bandes polymorphes scorables avec une fréquence moyenne de 15 bandes par amorce. L'amorce

HB10, composée de répétitions dinucléotidiques (GA) a donné le plus grand nombre de bandes (17 bandes) par contre l'amorce HB12 composée d'une répétition trinucleotide, a donné le plus petit nombre de bandes (12 bandes). Le pourcentage de bandes polymorphes est de 100 %. Scores.

**Tableau 05 : Caractéristiques des amorces ISSR**

Séquence d'amorce		Nombre de bandes	La taille des bandes amplifiées
A830241	(ACTG) 5	15	530-2300
HB10	(GA) 6CC	17	240 -1800
HB12	(CAC) 3GC	12	200 -1000
17899B	(CA) 6GG	16	350 -1600

#### IV.2.1.3 Capacité de chaque marqueur ISSR

Les valeurs PIC calculées pour les marqueurs ISSR allaient de 0,29 à 0,42. La valeur PIC moyenne la plus élevée (0,42) est donnée par l'amorce 17899B (tableau iii2) indiquant que cette amorce est la plus polymorphe. L'amorce A830241 donne la valeur PIC moyenne la plus basse de 0,29, est la moins polymorphe. L'indice d'amorce (PI) variait de 4,29 pour l'amorce A830241 à 6,59 pour l'amorce 17899B (**Tableau 06**). Ces valeurs PI confirment que l'amorce 17899B est la plus active pour détecter les polymorphismes des accessions d'*A. herba-alba* suivit par l'amorce **HB10 (PI=5.8)**. Donc la capacité de chaque marqueur ISSR a révélé des locus polymorphes chez *A. herba-alba*.

**Tableau 06 : Indices de diversité génétique**

Séquences d'amorce		PIC	PI
A830241	(ACTG) 5	0.29548575	4.29781232
HB10	(GA) 6CC	0.34665906	5.76258996
HB12	(CAC) 3GC	0.36861625	4.42339504
17899B	(CA) 6GG	0.41698291	6.59180436

De ce fait, les ISSR sont des outils précieux dans l'étude du polymorphisme génétique au niveau de l'espèce. Les amorces avec des répétitions de dinucléotide sont donné le plus grand nombre de bandes et sont les plus polymorphes avec  $PI > 5$ . Ces un IP élevé

indiquent que l'ADN d'*A. herba-alba* a une forte probabilité de mutation (Raina et al. 2001). Cette forte probabilité de mutation pourrait être due à une large distribution géographique et à une variation écologique considérable. Ces conditions impliquent une adaptation d'*A. herba-alba* aux niveaux morphologique et physiologique avec des accessions très adaptées aux conditions locales. Cette adaptation est illustrée par la distribution du NMDS

#### IV.2.1.4 Similarité entre les accessions d'*A. herba-alba* et distribution NMDS

La similarité entre les accessions d'*A. herba-alba* a été estimée par le coefficient SM. Les valeurs par paires du coefficient de similarité SM allaient de 0,38 à 0,88.

La matrice des coefficients de similarité SM a été utilisée pour l'analyse NMDS. La distribution NMDS montre une disposition des accessions d'*A. herba-alba* en trois groupes composés respectivement de 70, 90 et 56 accessions. Le premier groupe correspond au cytotype tétraploïde est essentiellement composé des accessions des régions de Médenine et Tataouine qui sont les régions les plus arides. Il semble donc que les accessions de ce groupe soient les plus tolérantes à la sécheresse (Ferchichi, 1997). Le troisième groupe ressemble au cytotype diploïde est composé d'accessions originaires des régions les plus hygrométriques donc les moins tolérantes à la sécheresse. Le deuxième groupe est un groupe intermédiaire avec des accessions de régions situées entre les deux régions. Ainsi cette distribution situe la disposition d'*A. herba-alba* en Tunisie en trois domaines : un domaine sub-saharien, un domaine semi-aride et entre ces deux domaines. A l'intérieur de chaque domaine cette espèce semble avoir acquis des adaptations génétiques aux conditions locales.

#### IV.2.1.5 Analyse de la corrélation par le test de Mantel et Analyse corrélogramme I de Moran

Le test de Mantel a donné une corrélation hebdomadaire ( $r=0,05910$ ) entre la matrice des distances génétiques et la matrice des distances géographiques indiquant que le processus d'isolement par la distance (IBD) n'est pas l'acteur principal dans la génération de la diversité donc l'analyse de corrélation n'a révélé aucune relation directe entre les traits morphologiques, la distance géographique et la distance génétique

Étant donné que le test de Mantel n'est efficace que pour détecter les corrélations linéaires, les chercheurs ont analysé le corrélogramme I de Moran pour vérifier la corrélation à un niveau inférieur en divisant les accessions en classes de distances

géographiques et en testant la corrélation pour chaque classe de distance. Ils obtiennent un **corrélogramme globalement significatif** ( $p < 0,005$ ) comme le montre le critère de Bonferroni. Le corrélogramme a une forme sinusoïdale avec une alternance entre des valeurs I de Moran significatives positives et négatives. Cette forme particulière du corrélogramme indique une répartition in égale de la variation de la variabilité génétique des accessions d'*A. herba-alba* révélant la contribution des conditions écologiques et géographiques locales sur la variabilité (**Radeloff et al. 2000**).

La corrélation entre la distance génétique et la distance géographique n'était pas significative indiquant l'effet très limité de la distance géographique sur la distribution de la variabilité. Certains auteurs (**Chapman et al. 2003**) ont obtenu une forte corrélation entre la diversité génétique, comme le montrent les marqueurs ISSR, et la distance géographique indiquant l'importance du processus IBD (Isolation By Distance) dans la génération de la diversité mais dans la plupart des cas dans les études (**Camacho et Liston, 2001; Bahulikar et al. 2004**), le processus de MICI a une importance moindre car les valeurs de corrélation étaient très faibles.

Des valeurs de corrélation non significatives pourrai en t'être dues à l'existence de barrières géographiques (**González-Astorga et Núñez- Farfán, 2001 ; Epperson, 2000**) qui conduisent à une relation non linéaire entre les distances géographiques et génétiques. Cette non-linéarité n'a pas pu être évidente lorsqu'elle a été testée par le test de Mantel (**Epperson, 2000 ; Epperson et Li, 1997 ; Epperson, 1995**). Pour expliquer cette distribution non linéaire, nous avons construit un corrélogramme de l'indice I de Moran.

La significativité de ce corrélogramme indique que la distribution de la variabilité n'est pas aléatoire. La forme du corrélogramme indique que la variabilité génétique d'*A. herba-alba* est inégale, ce qui confirme les résultats de l'analyse NMDS. La génération du polymorphisme semble agir localement du fait de l'adaptation aux conditions écologiques et géographiques locale extrêmement variables dans le sud de la Tunisie.

#### IV.2.2 Travaux de Bougoutaia et al, 2014

**Thème : Etude caryologique et moléculaire de deux populations algériennes d'*Artemisia herba alba* Asso. (Astraceae)**

**Bougoutaia et al (2014)** ont réalisé une caractérisation caryologique et moléculaire de 18 individus d'*Artemisia herba-alba* Asso. (Astraceae) provenant des zones steppiques algériennes : zone de *Taadmit* et d'*Oued Sedar* (Djelfa, Algérie). Ils ont accompli 04 étapes consécutives :

- Récolte du matériel végétal
- Dénombrement chromosomique
- Extraction d'ADN suivit par la Réaction PCR en utilisant plusieurs amorces.
- Classification des 18 individus en utilisant le critère du marqueur ISSR comme critère de divergence génétique

#### IV.2.2.1 Matériel végétal

18 échantillons sont été collectés en février 2013 dans la zone de *Taadmit* et d'*Oued Sedar* situées dans la steppe semi-aride algérienne.

#### IV.2.2.2 Dénombrement chromosomique

Traiter les apes racinaires avec une solution de Colchicine, fixer par le Carnoy, hydrolyser dans HCL, puis colorer par le réactif de Schiff. Les zones méristématiques sont déposées sur une lame dans une goutte de carmin acétique et écrasées entre lame et lamelle. Les lames préparées sont été observées au microscope photonique aux agrandissements 100x.

Les résultats des fréquences de variations du nombre chromosomique calculées sur les individus issus des deux stations montrent que sur 34 cellules examinées pour la provenance de *Taadmit*, 62% ont un nombre  $2n=36$ , par rapport à 28% qui ont un nombre inférieur. Alors que pour la provenance d'*Oued Sedar*, 89.29% des cellules analysées (94 cellules) possèdent un nombre de  $2n=36$ , par rapport à 10.71% qui ont un nombre inférieur. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par **Ferchichi (1997)** effectués sur des populations tunisiennes d'armoise blanche. Cependant d'autres études cytologiques sur la même espèce réalisées en Espagne ont révélées l'existence d'un autre cytotype avec  $2n=18$  (**Bermejo and Garcia, 1976**).

#### IV.2.2.3 Extraction d'ADN suivit par la Réaction PCR en utilisant L'amorce X14 Primer TRAAR (GCC) 4

L'extraction de l'ADN à partir des 18 individus d'armoise blanche de la zone d'*Oued Seda* a été effectuée selon la méthode CTAB (**Krizman et al. 2006**).

Des modifications ont été apportées à la méthode CTAB en raison de la présence des métabolites secondaires dans l'armoise blanche (polyphénols, terpènes, résines ou polysaccharides) qui souvent empêchent une bonne extraction de l'ADN (**Carmen, 2008**).

L'ADN obtenu est propre et aisément amplifiable. Pour le choix des amorces ISSR,

plusieurs amorces ont été testées. Sur plusieurs amorces testées ont été rejetées. **L'amorce X14 Primer TRAAR (GCC) 4** a été retenue dans les réactions d'amplification en donnant des bandes plus claires (**Tableau 07**).

Les individus analysés présentent une variabilité génétique très marquée, prouvée par un peuplement d'amplifiable de 47 bandes de tailles différentes. Les tailles de ces dernières vacillent entre des valeurs de 704 et 17348 paires de bases. Les valeurs obtenues indiquent que ce nombre se répartit à travers 03 groupes de bandes (**Tableau 07**)

**Tableau 07 : Séquence d'amorce sélectionné, nombre de bandes avec leur taille amplifiées**

Séquence d'amorce	Nombre de bandes	La taille des bandes amplifiées
<b>L'amorce X14 Primer TRAAR(GCC) 4</b>	33	1172 et 6968 paires de bases
	13	Supérieurs à 1000 pairs de base
	01	Inférieure à 1000 paires de bases.
Nombre totale des bandes	47	704 - 17348 paires de bases

#### **IV.2.2.4 : Classification des 18 individus en utilisant le critère du marqueur ISSR comme critère de divergence génétique**

La classification révèle l'existence de :

- 14 groupes distincts qui se constituent en groupes différents
- 05 groupes (individus 5, 6, 13, 14 et 15) qui présentent une similitude génétique et se distinguent ainsi en un groupe homogène.

Cette variabilité indique que l'espèce *A.herba-alba* est caractérisée par une richesse génétique très marquée et que le marqueur moléculaire ISSR s'avère très efficace pour l'étude des on polymorphisme génétique. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par **Haouari et Ferchichi (2008)** qui ont montré le même caractère de variabilité chez des populations tunisiennes d'armoise blanche. La variabilité génétique ainsi démontrée s'expliquerait essentiellement par les mutations spontanées affectant cette espèce. Le brassage génétique résultant du mode de reproduction de cette espèce serait également une cause explicative de la variabilité génétique existante.

### IV .2.3 Les travaux de Benchohra al ; 2016

**Thème :** Optimisation des conditions d'extraction d'ADN et de PCR pour la génétique : Étude de la diversité d'*Artemisia Herba Alba* d'Algérie

**Benchohra et al ; 2016** ont optimisé les conditions d'extraction d'ADN d'*Artemisia herba alba* récoltée dans la région de Tiaret (Algérie) et elle a été suivit par l'amplification ISSR-PCR. Cette méthode sera utilisée pour évaluer la diversité génétique d'*Artemisia herba alba* dans les régions de l'Ouest algérien .Ainsi ils ont réalisé trois étapes consécutives : La récolte du Matériel végétal, optimisation des conditions d'extraction d'ADN et détermination moléculaire (marqueur ISSR-PCR) et la détermination du dendrogramme à l'aide de l'analyse par grappes UPGMA

#### IV .2.3.1 Récolte du matériel végétal

Douze individus d'*Artemisia herba alba* ont été collectés dans la zone d'étude d'El-Manseb située dans la wilaya de Tiaret ils ont été utilisés pour l'extraction d'ADN qui a été réalisée en 2013. L'extraction de l'ADN a été réalisée sur des feuilles fraîches d'*A. herba alba* collectées, transférées au laboratoire et conservées à -20°C.

#### IV .2.3.2 Optimisation d'extraction d'ADN, Réaction PCR et Séparation et visualisation de l'ADN

##### A. Optimisation d'extraction d'ADN

**Benchohra et al ; 2016** a réalisé plusieurs ajustements dans le protocole d'extraction d'ADN (protocole de base de **Zidani et al. 2005**). à partir des tissus foliaires frais (70mg) de chaque individu d'*A. herba alba*. Cette méthode a donné des bandes d'ADN blancs. Ces modifications se résument comme suite :

- Incubation a été plus longue (une heure) et à température plus élevée (65°C) des feuilles broyées par rapport au protocole de base à 60°C pendant 30min.
- L'utilisation d'isopropanol au lieu d'éthanol permet une bonne précipitation de l'ADN à -20°C pendant la nuit.
- Lavage effectué avec un tampon composé de 75% d'éthanol et 15mM d'acétate d'ammonium au lieu de 75% d'éthanol, 3M d'acétate de sodium et TE (**Krizman et al, 2006**)



- Et centrifugation à 4°C a favorisé une bonne séparation des phases lors des différentes étapes de l'extraction (**Benbouza et al, 2006**).

L'ADN extraite a été stocké à 4°C pendant une courte période et à (-20°C) pendant une longue période.

### B. Réaction PCR et Séparation et visualisation de l'ADN

Six amorces ont été testées. L'amorce utilisée était celle à bandes claires (**X14 Primer TRAAR (GCC) 4**). Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en utilisant 3µL d'ADN. La quantification de la taille des bandes d'ADN amplifié est faite par le logiciel Image J Gen en référence au contrôle λDNA/Hind III.

L'optimisation des conditions d'amplification de l'ISSR- PCR a permis d'obtenir des profils clairs et reproductibles (bandes d'ADN blancs). Les différences avec la méthode de **Zidani et al 2005** sont très marquées :

- La concentration d'ADN utilisée était moins importante
- Le nombre de cycle PCR (30 cycles) et la température d'hybridation 55°C pendant 30s au lieu de 60°C pendant 1min permet d'obtenir des profils plus clairs

Une très grande variabilité génétique a été mise en évidence chez les 12 individus prouvée par un peuplement d'amplifiable de 37 amplifiées de tailles différentes (**Tableau 08**).

La taille des 37 bandes vacillent entre des valeurs de 709 et 17353pb:

- 13 bandes ayant des tailles de valeurs supérieures à 1000pb
- 29 bandes présentent des valeurs vacillant entre 1172 et 6968pb

Et enfin une bande à dé voilé une taille d'une valeur inférieure à 1000pb.

Parmi les 12 individus analysés, 29 bandes (78,4%) des bandes ISSR étaient polymorphes

**Tableau 08 : Séquence d'amorce sélectionné, nombre de bandes avec leur taille amplifiées**

Séquence d'amorce	Nombre de bandes	La taille des bandes amplifiées
<b>L'amorce X14 Primer TRAAR(GCC) 4</b>	29	1000-10 000pb
	13	Supérieurs à 1000pb
	01	Inférieure à 1000pb
Nombre totale des bandes	37	709à 17353pb

### C. Dendrogramme

Pour déterminer le Dendrogramme l'analyse par grappes UPGMA de douze individus d'*Artemisia herba alba* Asso récoltée à Tiaret (Algérie) avec des marqueurs ISSR-PCR a été établie en utilisant les coefficients Nei et Li/Dice. L'indice de similarité (Nei et Li, 1979).

Le dendrogramme obtenu à l'aide de l'analyse par grappes UPGMA a montré que :

- Les individus divergent en sept groupes différents.
- Quatre groupes parmi les 07 groupes présentaient un seul individu.
- Deux autres groupes comprennent deux individus ayant chacun le même nombre de bagues.
- Enfin un groupe se détache et est composé de quatre individus à répartition de 12 individus dans différents groupes.

Le Dendrogramme indique que cette population est caractérisée par une forte variabilité génétique intra spécifique qui est probablement due à des mutations spontanées affectant cette espèce. Toutefois, cette étude constitue une première étape pour étudier la diversité sur une plus grande collection de cette espèce.

### IV.3 : Etude comparative entre les travaux de Haouari et Ferchichi ; 2008 , Bougoutaia et al, 2014 et Benchohraet al ; 2016

Les 18 individus d'*Artemisia herba alba* collectée dans la région de Djelfa (**Bougoutaia et al. 2014**) et 12 individus d'*Artemisia herba alba* récoltée dans la région de Tiaret (Benchohra et al., 2016) ont montré une grande variabilité génétique, constituée de 47 et 37 bandes amplifiables de tailles différentes. L'amorce X14 Primer TRAAR (GCC) 4 a été choisie dans les réactions d'amplification pour fournir des bandes plus claires. (Tableau iii 5 )

**En 2008, Haouari et Ferchichi** ont choisi quatre amorces qui ont produit 60 bandes polymorphes pouvant être scorées, avec une fréquence moyenne de 15 bandes par amorce. L'amorce HB10, qui est composée d'une répétition de trinucleotide, a produit le plus grand nombre de bandes (17 bandes), tandis que l'amorce HB12, qui est composée d'une répétition de trinucleotide, a produit le plus petit nombre de bandes (12 bandes). (**Tableau 09**)

Par conséquent, les ISSR sont utiles pour étudier le polymorphisme génétique au niveau de l'espèce. Parmi les amorces ISSR, l'amorce X14 Primer TRAAR (GCC) a produit le

plus grand nombre de bandes, ce qui le rend le plus polymorphe par rapport aux amorces ISSR utilisés par les chercheurs Tunisiens.

En outre, **Bougoutaia et al. (2014)** ont découvert la présence de 14 groupes distincts composés de groupes différents et de 05 groupes de personnes présentant des similitudes génétiques. **En 2016, Benchohra et al.** Ont découvert sept groupes différents. Deux des sept groupes avaient deux individus avec la même quantité de bagues, tandis que quatre des autres groupes avaient un seul individu. Un autre groupe de quatre individus comprenait douze personnes réparties en différents groupes.

Le marqueur moléculaire ISSR est très efficace pour l'étude du polymorphisme génétique et cette variabilité indique que l'espèce *A. herba-alba* possède une richesse génétique très marquée. La variabilité génétique observée serait principalement due à des mutations spontanées qui ont un impact sur cette espèce. Le brassage génétique, qui expliquerait la variabilité génétique, serait également causé par le mode de reproduction de cette espèce. **Raina et al. (2001) et Radloff et al. (2000).**

**Haouari et Ferchichi (2008)** ont également calculé les valeurs PIC et IP des marqueurs ISSR. Il a été démontré par ces scientifiques que l'ADN d'*A. herba-alba* présente une forte probabilité de mutation. De plus, les mêmes chercheurs ont découvert une répartition inégale de la variabilité génétique des accessions d'*A. herba alba* en analysant la corrélation par le test Chapitre IV Résultats et Discussions de Mantel et le corrélogramme I de Moran, suggérant que les conditions écologiques et géographiques locales ont un impact sur la variabilité.

Tableau 09 : les amorces ISSR utilisés, nombre

Travaux des chercheurs	Amorce ISSR utilisé	Nombre des bandes polymorphes	Taille des bandes	Nombre des bandes trouvés	Taille de bandes amplifiées	Pourcentage de bande polymorphe
Bougoutaia et al, 2014	Amorce X14 Primer TRAAR (GCC)	47 bandes polymorphes (18 individus)	704-17348 paires de base	13 bandes	Supérieur à 1000pb	100%
				33 bandes	Entre 1172 et 6968pb	
				1 bande	Inférieur à 1000pb	
Benchohra Maghni et al, 2016	Amorce X14 Primer TRAAR (GCC)	37 bandes polymorphes (12 individus)	709-17353 Paires de base	29 bandes	Entre 1000 et 10000pb	85%
				13 bandes	Supérieur à 1000pb	
				1 bande	Inférieur à 1000pb	
Haouari et Ferchichi, 2008	A830241	60 bandes polymorphes (216 individus)	530-2300	15	/	100%
	HB10		240-1800	17	/	
	HB12		200-1000	12	/	
	17899B		350-1600	16	/	

## CONCLUSION GENERALE

---

### CONCLUSION GENERALE

Ce travail est une synthèse des recherches qui ont été réalisées par **Haouari et Ferchichi en 2008, Bougoutaia et al. en 2014 et Benchohrae et al. en 2016** , en utilisant la technique de marquage moléculaire : Inter Short Séquence Repeat ISSR.

Ces marqueurs ISSR ont détecté un taux élevé de polymorphisme génétique dans cette espèce.

Les chercheurs ont démontré que la génération du polymorphisme dans les populations *d'A. herba alba* est fortement influencée par l'adaptation aux conditions microécologiques et environnementales.

# REFERENCES BIOBLIOGRAPHYQUES

---

## REFERENCES BIOBLIOGRAPHYQUES

1. **Abdellaoui Raoudha, Sayah Amel, Gouja Hassen & Ouled Belgacem Azeiz, 2012**  
Extraction de l'ADN et optimisation de la PCR (Polymorphism Chain Reaction) pour L'application des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) chez *Stipa lagascae*, *Acta Botanica Gallica*, 159:1, 73-78p
2. **Abderrabi khadidja ; 2018.** Etude de la variabilité génétique et de potentialité d'adaptation chez *Artemisia herba-alba* dans la steppe de l'Ouest Algérienne. Thèse de doctora, Université DJILLALI LIABES Sidi BEL-Abbès. *Acta Bot. Malacitana*, 2: 39-50.
3. **Al-khazraji SM et al (1993), Al-Shamaony L et al (1994), Al-Waili NS (1986). Selon Haouari M., Ferchichi A., 2008.** Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7 : 44-50.
4. **Aidoud A., 1983.** Contribution à l'étude des écosystèmes steppiques du Sud-oranais. Phytomasse, productivité primaires et applications pastorales. Thèse 3ème cycle .Univ .Sci .Tech. H. Boumediene .245 P. + annexes.
5. **Aidoud A., 1988.** Les écosystèmes steppiques à armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso) :& caractères généraux .Biocénose : Bulletin d'écologie terrestre. CRBT. Alger .Tome 3 .N° 12.
6. **Aidoud A., 1989.** Les écosystèmes Armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso). II:Phytomasse et productivité primaire. *Biocénoses*, 1-2: 70-90.
7. **André Luís F. Santos, Carolina Q. P. Oliveira, Geovana Nicole P. N. Arruda, John Kenned Martins, 2018.** Comparison of DNA extraction using Proteinase K and extraction kit: analysis of the quality of the genetic material. *J Bras Patol Med Lab.* 2018 Apr; 54(2): 70-75.
8. **Ayad N et al (2013), Benjilali B, Richard H (1980), Bensid T, Debouzie D (1996), selon Benchohra Maghni , Youcef Bougoutaia , Khadidja Abderrabi , Ahmed Adda1 and Othmane Merah (2016)** Optimization of DNA Extraction and PCR Conditions for Genetic Diversity Study in *Artemisia Herba-Alba* from Algeria. *Scientific J Genetics Gen Ther* 2(1): 010-012.
9. **AVISE J.C., 2004.** Molecular Marker, Natured History, and Evolution, second edition edn. Sinauer Associates, Inc. publishers, Sunderland, Massachusetts.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

10. **Bahulikar RA, Preston CA, Stanculescu D, Baldwin IT (2004).** ISSR and AFLP analysis of the temporal and spatial population structure of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*, SW Utah BMC Ecol. 4: 12.
11. **Barbier François F., Tinashe G. Chabikwa , Muhammad U. Ahsan , Stacey E. Cook , Rosanna Powell , Milos Tanurdzic and Christine A. Beveridg, 2019.** A phenol/chloroformfree method to extract nucleic acids from recalcitrant, woody tropical species for gene expression and sequencing. Barbier et al. Plant Methods (2019) 15:62. 2-13p.
12. **Bellakhdar, H., Pharmaco péemarocain e traditionnelle, 1997,** Ed. IBIS Press, Paris
13. **Ben larbi M., Naouaria G., Yahyaoui M. H. et Hadded B, 2014.** Etude technico-économique de méthodes d'extraction de l'ADN chez le lapin Européen (*Oryctolagus cuniculus*) à partir du sang. Journal of New Sciences 5(1) : 5-6. 606.
14. **Benaissa Keltoum, 2008.** Caractérisation moléculaire de quelques espèces légumières. Mémoire de magister. Université SAAD DAHLAB de BLIDA. p 68-76.
15. **Benbouza H., Baudoin J.-P. et Mergeai G. 2006.** Amélioration de la méthode d'extraction d'ADN au CTAB appliquée aux feuilles de cotonnier. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 10(2):73–76.
16. **Benchohra Maghni , Youcef Bougoutaia , Khadidja Abderrabi , Ahmed Adda1 and Othmane Merah (2016)** Optimization of DNA Extraction and PCR Conditions for Genetic Diversity Study in *Artemisia Herba-Alba* from Algeria. Scientiic J Genetics Gen Ther 2(1): 010-012.
17. **Bermejo, V., Garcia, G., 1976.** Garcia, J. G., 1976. Notas cariosistematicas sobre flora espanala. Acta Botanica Malacitana 2 : 39-50.
18. **Betina, S., Khalfallah, N. & Khelifi, D. 2007.** Etude cytogénétique et biochimique de huit Populations d'armoise blanche algérienne *Artemisia herba-alba* Asso. Revue des Régions Arides, 2007(2): 602-607.
19. **Bidault M., 1971.** Variation et spéciation chez les végétaux supérieurs. Notion fondamentales de systématique moderne. Doin editeurs. 8, place de l'odéon. Paris
20. **Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314–331.
21. **Bougoutaia Youcef., 2009.** selon **BOUGOUTAIA Youcef., 2018.** Étude du complexe *Artemisia herba-alba* Asso d'Algérie par des approches pluridisciplinaires: cytogénétique

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- classique, cytogénétique moléculaire, phylogénie et phylogéographie. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (USTOMB).
- 22. Camacho FJ, Liston A (2001).** Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). *Am. J. Bot.* 88(6): 1065-1070.
- 23. Carmen R., 2008.** Diversité génétique et réponse aux contraintes du climat : une étude de Cas à partir de la biologie des populations de quinoa (*Chenopodium quinoa* WILL.) de Bolivie. The. Doc. En. Sci. Agr. Et. Ing. Bio. Communauté Française De Belgique. Faculté Universitaire des sciences agronomiques de Gembloux. 140 P.
- 24. Chapman H, Pearson ML, Robson B (2003).** Genetic diversity in tussock hawkweed (*Hieracium lepidulum*) and use of allele frequencies for identifying patterns of spread. DOC Science Internal Series 109. Department of Conservation, Wellington, p. 19.
- 25. Charters, Y.M., Robertson, A., Wilkinson, M.J., 1996.** PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5' -anchored simple sequence repeats (SSR) primers. *Theoret. Appl. Genetics*, 92: 442. doi:10.1007/BF00223691
- 26. Chase M.W. ET Hills H.H. 1991.** Silica gel: An ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. *Taxon* 40(2):215–220.
- 27. Claros, G.M. & Quesada, A.R., 2000.** PCR as a specific, sensitive and simple method suitable for diagnostics. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 28: 223-226.
- 28. Cui Z., Carter TE, Burton JW JR., ET Wells R., 2001.** Phenotypic Diversity of Modern Chinese and North American Soybean Cultivars. *CropSci* 41:1954-1967.
- 29. Desage Simon, Matthieu Toulemonde, 2009.** Projet thématique tutoré. La Lyophilisation
- 30. DJEBAILI S., DJELLOULI Y., DAGET P. H; 1995.** Essai de typologie des steppes pâturées Du secteur des hauts plateaux algériens. *Biocénoses*. Tome 6. 118 P. endemic species *Artemisia barrelieri* Besser. *Canadian Journal of Botany*, 75(4): 595-
- 31. El-Kar C (2003).** Les plantes aromatiques du sud Tunisien: inventaire, caractérisation et rendement en huiles essentielles. DEA spécialité Physiologie Végétale. Université Tunis-El Manar. Faculté des Sciences de Tunis, p. 75.
- 32. Epperson BK (1995), Epperson BK (2000), Epperson BK, Li T (1997), Esselman EJ, et al (1999), Escudero A et al (2000), selon Haouari M., Ferchichi A., 2008.** Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7 : 44-50.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

33. **Fang DQ, Roose ML (1997), Frankham R., 1997, Frankham R et al 2002, Freeland J R., 2005. selon ABDERRABI Khadidja(2018).** Etude de la variabilité génétique et de potentialité d'adaptation chez *Artemisia herba-alba* dans la steppe de l'Ouste Algérien. (Thèse de doctorat), Université DJILALI LIABES Sidi Bel-Abbèse
34. **Ferchichi, A. 1997.** Contribution à l'étude cytotaxonomique et biologique d'*Artemisia herba alba* Asso en Tunisie présaharienne. *Acta Botanica Gallica*, 144: 145-154. <http://dx.doi.org/10.1080/12538078.1997.10515761>.
35. **Franklin, E.G. 1970.** Survey of mutant forms and inbreeding depression in species of the Family Pinaceae. USDA Forest Service Research Paper 61.
36. **Godwin ID, Aiktken EAB, Smith LW (1997).** Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18: 1524-1528.
37. **Gomez OJ. , Blair W., Frankow-lindberg BE ET Gullberg U., 2004.** Molecular and Phenotypic Diversity of Common Bean Landraces from Nicaragua. *CropSci* 44:1412-1418.
38. **González-Astorga J, Núñez-Farfán J (2001).** Effect of habitat fragmentation on the genetic structure of the narrow endemic *Brongniartia vazquezii*- *Evol. Ecol. Res.* 3: 861–872
39. **Goossens M, 1990.** L'amplification des séquences de nucléotide par PCR et les nouvelles techniques de diagnostic. 8 e Réunion de la Société Française pour l'Étude de la Fertilité; Paris, 19-21 octobre 1989. *Reprod Nutr dev*(1990) supp 1, 117s-124s.
40. **Hanane HACHANI et Haifa LAROUI. , 2020.** Extraction et purification d'ADN génomique des feuilles de la vigne suivie par la technique PCR. MÉMOIRE DE MASTER, Université Mohamed Khider de Biskra.
41. **Harry M., 2001.** Génétique moléculaire et évolution. Editions Maloine. Paris. P39.
42. **Hatimi S, Boudouma M, Bichichi M, Chaib N, Guessous Idrissi N (2001).** Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Rencontres franco-africaines de pédiatrie* N o 14, Paris, FRANCE (07/10/2000) 2001, vol. 94, n o 1, pp. 57-70 (12 ref.), pp. 29-31.
43. **Haouari M., Ferchichi A., 2008.** Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7 : 44-50.
44. **Healey A., Furtado A., Cooper T. et Henry R.J. 2014.** Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species.
45. **Holzappel Marion, 2018.** De l'épidémiologie moléculaire aux analyses fonctionnelles de *Brucella* chez les ruminants, une approche intégrée pour l'identification et l'étude de la

## REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES

---

- diversité phénotypique d'un genre génétiquement homogène. Thèse de doctorat. Université PARIS-EST, école doctorale abies. p 49. Institute of Hygienic Sciences, 82: 183-193.
- 46. Idris UE, Adam SE, Tartour G (1982).** An anthelmintic efficacy of *Artemisia herba-alba* against *Haemonchus contortus* infection in goat. *Natl. Inst. Anim. Health* 22(3): 138-143.
- 47. Jenczewski E. et al (1999); Julio., E(2005).selon selon ABDERRABI Khadidja(2018).** Etude de la variabilité génétique et de potentialité d'adaptation chez *Artemisia herba-alba* dans la steppe de l'Ouste Algérien. (Thèse de doctorat), Université DJILALI LIABES Sidi Bel
- 48. Jiang, G. 2017.** Molecular Markers. In: Thomas, B., Murray, B.G., Murphy, D.J., (Eds.), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2<sup>nd</sup> edition, Volume 2. Academic Press, Massachusetts, pp. 207–214. *Journal of Enology and Viticulture* 62(3):376–381.
- 49. Jouad H, Haloui M, Rhiouani H, El Hilaly J, Eddouks M (2001).** Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez-Boulemane). *J. Ethnopharmacol.* 77: 175-182.
- 50. Kaeuffer R., R Réale D., Pontier D., Chapuis JL. AND Coltman DW. 2008.** Local effects of inbreeding on embryo number and consequences for genetic diversity in Kerguelen mouflon. *Biology letters* 4 (5), 504-507.
- 51. Kang T.-J. et Yang M.-S. 2004.** Rapid and reliable extraction of genomic DNA from various wild-type and transgenic plants. *BMC Biotechnology* 4(1):20.
- 52. Krizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik B., Prosek, M., 2006.** Robust CTAB-Activated charcoal protocol for plant DNA extraction. *Acta agriculturae Slovenica* 8: 87 – 92.
- 53. Kawatani, T. & Ohno, T. 1964.** Chromosome number in *Artemisia*. *Bulletin of the National Institute of Hygienic Sciences*, 82: 183-193.
- 54. Kremer A. 1994.** Diversité génétique et la variabilité des caractères phénotypique chez les arbres forestiers. *Genet. Sel. Evol.* 105-123.
- 55. Kunal A. Gaidhani, Mallinath Harwalkar, Deepak Bhambere, Pallavi S. Nirgude;** l'application des marqueurs RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) chez *Stipa lagascae*, *Acta Botanica Gallica*, 159:1, 73-78p.
- 56. LE FLOC'H E. 1989.** Biologie et écologie des principaux taxons dans "Essai de synthèse sur la Végétation et la phyto-écologie tunisienne: I. Eléments de botanique et de phyto-écologie". 193 p.
- 57. Linder CR et al, (2000); Lamiri A et al, (1997).selon Haouari M., Ferchichi A., 2008.** Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7 : 44-50.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES

---

58. **M. BOGDANI Eni, 2011.** Etude expérimentale et optimisation du procédé de lyophilisation de l'ibuprofène en milieu organique. Thèse de doctorat, Université CLAUDE BERNARD LYON1.
59. **Maghni B.** Etude du polymorphisme, morphologique, structural et moléculaire chez trois Populations d'Armoise blanche (*Artemisia herba alba Asso*) Dans la région de Tiaret. Mémoire de Magister, Univ. Ibnkhaldoun, Tiaret, **2013** : pp 72,88.
60. **Mark W. C and James L. R., 2009.** Classification APG III Maroc. Boletim da Sociedade Broteriana série 2, 61: 105-124.
61. **Marco JA, Barbera O (1990).** Natural products from the genus *Artemisia* L. In: Atta-ur-Rahman (Ed.), Studies in natural products chemistry, vol. 7 Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, pp. 201-264. Medhat Salah S, Jäger AK (2005). Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. J. Ethnopharmacol. 97: 145-149.
62. **Marrif, H.I., B.H. Ali and K.M. Hassan., 1995.** Some pharmacological studies on *Artemisia herba-alba (Asso.)* in rabbits and mice. J. Ethnopharmacol., 49: 51-55.
63. **Marsal G., Baiges I., Canals J.M., Zamora F. et Fort F. 2011.** A Fast, Efficient Method for Extracting DNA from Leaves, Stems, and Seeds of *Vitis vinifera* L. American.
64. **Medhat Salah S, Jäger AK (2005).** Screening of traditionally used Lebanese herbs for neurological activities. J. Ethnopharmacol. 97: 145-149.
65. **Mohler, V., Schwarz, G. 2005.** Genotyping Tools in Plant Breeding: From Restriction Fragment Length Polymorphisms to Single Nucleotide Polymorphisms In: Lörz, H., Wenzel, G. (eds.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, vol. 55. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 23–38.
66. **Moran PAP (1950).** Notes on continuous stochastic phenomena. Biometrika 37: 17-23.
67. **Murray M.G. ET Thompson W.F. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19):4321–4326.
68. **Nabli M A., 1989.** Essai de synthèse sur la végétation et la phyto-écologie tunisiennes, tome I. Ed. MAB (Faculté des sciences de Tunis); 186-188 p.
69. **Najimi, B., El Jaafari, S., Jlibène, M., Jacquemin, J-M. 2003.** Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. Biotechnologie Agronomie Société et Environnement 1: 17–35.
70. **Nagaoka T, Ogihara Y (1997).** Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 94: 597-602.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

71. **NEDJRAOUI, D.** Evaluation des ressources pastorales des régions steppiques algériennes et Définition des indicateurs de dégradation. Cahier Options, Méditerranéennes. **2004** Volume 62, 239-24.
72. **Neerman MF (2003).** Sesquiterpene lactones: a diverse class of compounds found in essential oils possessing antibacterial and antifungal properties. Int. J. Aroma. 13: 114-120.
73. **Nguyen-Kim H. 2015.** Recherche de la fonction de protéines riches en hydroxyproline dans les parois végétales. Thèse de doctorat, université Fédérale Toulouse Midi-Pyrénées, France, 231 p.
74. **Nunes C.F., Ferreira J.L., Fernandes M.C.N., Breves S., Generoso A.L., Soares B.D.F., Dias M.S.C., Pasqual M., Borem A. et Caçado G.M. 2011.** An improved method for genomic DNA extraction from strawberry leaves. Ciência Rural 41(8):1383–1389.
75. **Onnier Laure, 1999.** Techniques de biologie moléculaire (RAPD-PCR, PCR allèle spécifique) appliquées à la caractérisation d'un vecteur du paludisme en Asie du sud-est, anophelesdirus. Stage Ingénieur. Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier. p 24.
76. **Ostrander, E.A., Jong, P.M, Rine, J., Duyk, G. 1992.** Construction of small insert genomic libraries highly enriched for micro satellite repeat sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89: 3419–3423.  
ou Cryodessiccation. Université Jean Monnet de Saint-Etienne. p 2-11.
77. **Ouyahya, A. &Viano, J. 1988.** Recherchescytogénétiques sur le genre Artemisia L. au Maroc. Boletim da SociedadeBroterianasérie 2, 61: 105-124.
78. **Ozenda P., 1991.** Flore et végétation du sahara. 3Eme édition. CNRS Edition. Paris.662 P.
79. **Parizeau, M., 1997.** La biodiversité. Tout conserver ou tout exploiter ? Sciences, Ethiques, sociologies. Paris : DeBoeck & larcier s.a. 214p
80. **Pierre-Henri G ., 1998.** Précis de Génétique des populations, masson. [En ligne]<  
<http://fr.wikipedia.org> (consulté le 19.07.2015).Plant Methods 10(1):21.
81. **POTTIER G, 1981.** *Artemisia herba-alba*. Flore de la Tunisie: angiosperme dicotylédones Gamopétales, 1012 P.
82. **POUGET M., 1980.-** Les relations sols-végétation dans les steppes Sud-Algéroises. Trav. Doc. ORSTOM., Thèse Doct. Univ. Aix- Marseille, 555p.
83. **QUEZEL P ET SANTA S ., 1963.** Nouvelle flore de l'Algérie et des régionsdésertiques Méridionales. Tome II. Centre National de la Recherche Scientifique. Paris 7. 1170 P

## REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES

---

- 84. Quian W., Ge S. and Hong D-Y., 2001.** Genetic variation within and among population of a wild rice *Orizagranulata* from China detected RAPD and ISSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 102:440-449.
- 85. Radeloff VC et al (2000), Raina SN et al (2001), Rohlf FJ (2000).selon Haouari M., Ferchichi A., 2008.** Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7 : 44-50.
- 86. Reddahi Meriam, 2017.** PCR en temps réel : principe et application. Thèse de doctorat. Université MOHAMMED V- RABAT. p 8-17. *Research*, 2015; 4(8): 516-543.
- 87. Rosenberg MS (2001).** PASSAGE. Pattern Analysis, Spatial Statistics, and Geographic Exegesis. Version 1.1. Department of Biology, Arizona State University, Tempe, AZ
- 88. Salido S et al (2004), Smith JSC et al (1997), Sokal RR, Oden NL (1978).selon Haouari M., Ferchichi A., 2008.** Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology* 7 : 44-50.
- 89. Samouelian F., Gaudinv. Et Boccaram., 2009.** Génétique moléculaire des plantes. Edition Quae. 208p.
- 90. Singh, B.D., Singh, A.K. 2015.** Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices. Springer, New Delhi.2015. .
- 91. Surzycki S. 2000.** Basic Techniques in Molecular Biology. Springer-Verlag, Berlin, 444 p.
- 92. Tarik BB, Arslan AB (2005)** Dégradation des écosystèmes steppiques et stratégie de développement durable. Mise au point méthodologique appliquée à la Wilaya de Nâama (Algérie), Développement durable et territoires, 1339.
- 93. Tellaa Redouane, 2013.** Apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic des infections fongiques invasives revue de la littérature. Thèse de doctorat. Université Mohammed v – souissi. p 19-32.
- 94. Thorne Christopher, 2015.** Développement de suspension liposomales pour l'administration d'une substance médicamenteuse difficilement formulable. Thèse de doctorat, Université Joseph fourire GRENOBLE PHARMACIE.
- 95. Torrel, M., et Vallès, J. 2001b.** New or rare chromosome counts in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemideae) from Armenia and Iran. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 135: 51—60.
- 96. Torrell, M., Cerbah, M., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès J. 2003.** Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescent in situ

## REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES

---

- hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Systematics and Evolution*, 239: 141- 153. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0259-0>.
- 97. Torrell, M., Cerbah, M., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès J. 2003.** Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): fluorochrome banding and fluorescent in situ hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Systematics and Evolution*, 239: 141- 153. <http://dx.doi.org/10.1007/s00606-002-0259-0>.
- 98. Tsumura Y, Ohba K, Strauss SH (1996).** Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and Sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92: 40-45.
- 99. Tutin TG, Persson K, Gutermann W (1976).** *Artemisia* L. In: Tutin TG, Heywood BNA, Moore, DM, Valentine, DH, Walters SM, Webb DA, (Eds.), *Flora Europaea*, vol. 4. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 178-186.
- 100. Valdés-Bermejo, E. & Gómez, G. J. 1976.** Notas cariosistematicas sobre flora española, I. *Acta Bot. Malacitana*, 2 : 39-50.
- 101. Vallès, J. & Siljak-Yakovlev, S. 1997.** Cytogenetic studies in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae): fluorochrome-banded karyotypes of five taxa, including the Iberian endemic species *Artemisia barrelieri* Besser. *Canadian Journal of Botany*, 75(4): 595-606. <https://doi.org/10.1139/b97>.
- 102. Vernin G, Merad O, Vernin GMF, Zamkotsian RM, Parkanyi C (1995).** GC-MS analysis of *Artemisia herba-alba* Asso essential oils from Algeria. In: Charalambous G (Ed.), *Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence*. Elsevier Science BV, Amsterdam, pp. 147-205.
- 103. Vroh Bi I., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G., Du Jardin P. (1996).** Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant. Breed.* 115, p.205-206.
- 104. Ward, S.M., Gaskin, J.F., Wilson, L.M. 2008.** Ecological genetics of plant invasions: what do we know? *Invasive Plant Science and Management* 1: 98-109.
- 105. Weber, J.L. and May, P. 1989.** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396.
- 106. WELSH, J. and MCCLELLAND, M., 1990.** Fingerprinting genome using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHYQUES

---

- 107. Wheeler, N.C., Jech, K.S. 1992.** The use of electrophoretic markers in seed orchard research. *New Forests* 6:185-188.
- 108. White, T.L., Adams, W.T., Neale, D.B. 2007.** Forest genetics. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK / Cambridge, MA, USA.
- 109. WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A. and TINGEY, S.V., 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Ac. Res.* 18:6531-6535.
- 110. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. 1990.** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- 111. Wu K.S., R. Jones, L. Danneberger and P.A. Scolnik., 1994.** Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*, 22(15), 3257-3258.
- 112. Y. Bougoutaia 1 , B. Nedjimi 2 , A. Adda 3 , M. Kaid-Harche 4. 2014.** Etude caryologique et moléculaire de deux populations algériennes d'*Artemisia herba alba* Asso. (Astraceae). *Revue semestrielle – Université Ferhat Abbas Sétif 1 REVUE AGRICULTURE* Revue homepage: <http://www.revue-agro.univ-setif.dz/>.
- 113. Ye Y.M., J.W. Zhang, G.G. Ning and M.Z. Bao, 2008.** - A comparative analysis of the genetic diversity between inbred lines of *Zinnia elegans* using morphological traits and RAPD and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, 118, 1-7.
- 114. Zafrani F. Uhel, L., 2019.** Nouvelles techniques de biologie moléculaire *New Techniques in Molecular Biology*. Méd. Intensive Réa, DOI 10.3166/rea-2019-0119.
- 115. Zidani S, Ferchichi A, Chaieb M (2005).** Genomic DNA extraction method from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) leaves. *Afr J Biotechnol* 4 (8), 862-866.
- 116. Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda, 1994.** Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176-183.