الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية وزارة التعليم العالي و البحث العلمي جامعة وهران للعلوم و التكنولوجيا مججد بوضياف



# **THÈSE**

# En vue de l'obtention du Diplôme de Doctorat en Sciences

Présentée par : BOUGOUTAIA Youcef

Étude du complexe *Artemisia herba-alba* Asso d'Algérie par des approches pluridisciplinaires: cytogénétique classique, cytogénétique moléculaire, phylogénie et phylogéographie

Faculté: Sciences de la Nature et de la Vie

Département :BiotechnologieSpécialité :BiotechnologieOption :Biotechnologie

Soutenue à Oran, le 21 juin 2018, devant le Jury Composé de :

Membres de Jury	Grade	Qualité	Domiciliation
M. Djabeur Abderrazak	Professeur	Président	USTOMB - Oran
Mme Kaid-Harche Meriem	Professeur	Encadreur	USTOMB - Oran
M. Vallès Joan	Professeur	Co-Encadreur	Université de Barcelone
Mme Amirouche Nabila	Professeur	Examinatrice	USTHB - Alger
M. Amirouche Rachid	Professeur	Examinateur	USTHB - Alger
Mme Garnatje Teresa	Docteur	Examinatrice	Institut Botanique - Barcelone

Année universitaire 2017-2018

لِنسارات

### Remerciements

Cette thèse a été réalisée pendant une longue période au cours de laquelle j'ai travaillé avec beaucoup de gens qui m'ont aidé à rendre ce travail possible, auxquels je voudrais exprimer mes reconnaissances.

Toute ma gratitude va à **Mme Kaid-Harche** Meriem pour avoir accepté d'encadrer cette thèse et avoir bien voulu y consacrer son temps, ses conseils instructifs et sa précieuse aide tout au long de la conduite de ce travail de thèse de longue haleine. Je voudrais vous dire que j'ai eu grand plaisir à travailler sous votre direction.

J'exprime mes sincères remerciements à **M. Joan Vallès**, de m'avoir accueilli de manière si hospitalière dans son laboratoire de botanique et accepté d'être mon Co-encadrant. Je vous serais toujours reconnaissant pour votre générosité, votre soutien et votre aide et la qualité humaine que vous avez démontrée depuis le premier jour et durant tout mon séjour à Barcelone. Je vous remercie sincèrement pour les longues heures que vous avez passées avec moi dans le cytomètre chaque fois que j'ai amené des échantillons de l'Algérie. Vous m'avez fait bénéficier de vos connaissances, de votre immense expérience scientifique et de votre rigueur dans le travail.

Je remercie vivement **M. Djabeur Abderrezak** de l'Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf (USTOMB), d'avoir accepté spontanément de présider le jury de soutenance

J'adresse mes profonds remerciements à **Mme Amirouche Nabila** et **M. Amirouche Rachid** de l'Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene (USTHB) – Alger, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie du jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect, de ma grande estime et de mes remerciements les plus sincères pour avoir consacré votre temps précieux pour juger mon travail.

A **Mme Teresa Garnatje,** je vous remercie vivement pour votre accueil à l'Institut Botanique de Barcelone, et la confiance que vous m'avez accordé durant toute la période de mon stage en me facilitant l'accès au laboratoire de biologie moléculaire durant tout le temps, et même en jours féries et les weekends. Je dois vous remercier également d'avoir accepté d'être une partie si importante de cette thèse et de contribuer efficacement par vos nombreuses

remarques et suggestions à l'amélioration de ce manuscrit et de faire partie de mon jury de thèse, pour cela je vous serais très reconnaissant.

A **Mme Sònia Garcia**, l'experte de la technique de FISH, merci beaucoup pour votre aide précieuse dans les analyses de la cytométrie et les analyse du FISH, et pour votre disponibilité à répondre à mes courriers assez rapidement

A **M. Daniel Vitales**, je vous remercie vivement pour votre disponibilité, votre sympathie, votre esprit scientifique et votre aide dans le travail du labo et l'analyse des résultats. Vous êtes le maitre de la phylogénie et la phylogéographie avec qui j'ai travaillé et j'ai appris beaucoup de choses.

Je ne peux quitter Barcelone sans présenter ma profonde reconnaissance à **Mlle Paula Buenaventura** de m'avoir accompagné pendant de plusieurs mois, avec patience et rigueur, dans les manipulations de l'extraction et l'amplification de l'ADN de centaines d'échantillons d'armoise blanche. Je vous dirais, merci beaucoup Paula.

Mes remerciements à tout le personnel du laboratoire de botanique de la faculté de pharmacie et des sciences des aliments, Université de Barcelone, et de l'Institut Botanique de Barcelone pour le temps que j'ai passé entre eux et pour les facilités qui m'ont offert pendant tout mon séjour à Barcelone.

Sans être exhaustif, je remercie toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien dans la réalisation de ce travail :

- M. Amraoui Abdellaoui, de l'université de Djelfa, d'avoir sillonné volontairement avec moi la steppe Algérienne à plusieurs reprises pour la récolte des échantillons de l'armoise blanche
- M. Brouri Lakhdar, de l'HCDS de Djelfa, pour son aide à localiser les zones de distribution de l'armoise blanche en Algérie et de m'avoir facilité l'accès aux périmètres protégés par cette structure
- **M. Khader Saleh,** de l'université de Djelfa, et **M. Daifi Wail,** de l'URBATIA de Djelfa, pour leur aide à la réalisation des figures.
- M. Kantoli Ismail, de la conservation des forets de Tamanrasset, de m'avoir accompagné à la récolte des échantillons dans la région du Hoggar, et pour son accueil assez généreux
- M. Tahar Boukhalkhal, de m'avoir accompagné à plusieurs fois dans mes déplacements dans le cadre de ce projet de travail

Je suis très reconnaissant aux structures suivantes : La conservation régionale de l'HCDS de Tébessa, La conservation régionale de l'HCDS de Saida, la ferme pilote de l'HCDS de Taadmit, l'Institut National de la Recherche Forestière (INRF) de Djelfa pour leur aide et les moyens qui ont mis à ma disposition pour la récolte des échantillons.

Je dédie ce travail à l'âme de **mon père Ziane**, décédé trop tôt. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'un fils qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde

...à la perle de ma vie, **ma mère** qui m'a toujours biné par ses prières, et soutenu par ses précieux conseils; par la grâce d'Allah le plus puissant, sans toi *maman*, sans tes sacrifices, sans ton soutien je n'arriverai jamais à ce que je suis...ton appui et ton amour sont irremplaçables...

Ma profonde reconnaissance à ma chère **épouse** qui n'a jamais cessé de me soutenir pour que je puisse aboutir ce travail à ses fins. Je la remercie pour sa compréhension, sa patience et surtout sa contribution dans le partage de stress de la recherche en supportant mon absence pendant mes déplacements en Algérie et à l'étranger pour réaliser ce travail.

....à mes enfants : Mohamed, Khaled, Ziad et Saja, qui sont ma source d'inspiration et mon plus grand soutien

....à mes sœurs, qui me sont chères.

Merci à tous ceux qui de près ou de loin ont participé ou influencé ce travail de thèse.

# Sommaire

Liste des abréviations	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
Liste des Figures	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
Liste des Tableaux	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
Résumé	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
Summary	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
ملخص	
Avant-propos	1
CHAPITRE I	5
I. Introduction Générale	6
I.1 Synthèse bibliographique sur Artemisia herba-alba Asso	6
I.1.1 Les Asteraceae Dumortier (= Compositae Giseke)	6
I.1.2 Anthemideae Cass.	9
I.1.3 La sous-tribu Artemisiinae Less.	12
I.1.4 Le genre Artemisia L.	14
I.1.5 Artemisia herba-alba Asso	21
1.1.5 Tirichusta neroa atoa 1350	
I.1.5.1 Présentation et systématique	
	21
I.1.5.1 Présentation et systématique	21
I.1.5.1 Présentation et systématique  I.1.5.2 Répartition géographique (phytogéographie)	21 22 25
I.1.5.1 Présentation et systématique  I.1.5.2 Répartition géographique (phytogéographie)  I.1.5.3 Morphologie	21 22 25 27
I.1.5.1 Présentation et systématique  I.1.5.2 Répartition géographique (phytogéographie)  I.1.5.3 Morphologie  I.1.5.4 Écologie	21 22 25 27
I.1.5.1 Présentation et systématique  I.1.5.2 Répartition géographique (phytogéographie)  I.1.5.3 Morphologie  I.1.5.4 Écologie  I.1.5.5 Biologie, adaptation et dynamique	21 22 25 27 27

I.2.1.1	Caryotype	31
I.2.1.2	2 Cytogénétique classique	32
I.2.2 Q	uantité d'ADN nucléaire et cytométrie en flux	32
I.2.2.1	Quantité d'ADN nucléaire	32
I.2.2.2	2 Cytométrie en flux	34
I.2.3 G	ènes ribosomiques et la technique de l'hybridation in situ fluorescente (FISH)	35
I.2.3.1	Gènes ribosomiques	35
I.2.3.2	Technique d'hybridation in situ fluorescente (FISH)	36
I.2.4 D	iversité génétique, phylogénie et phylogéographie	39
I.2.4.1	Forces influant sur la structure de la diversité génétique	40
I.2.4.2	Pacteurs influençant la structure de la diversité	43
I.2.4.3	Estimation de la diversité génétique	46
I.2.4.	Phylogénie et phylogéographie	47
I.2.5 M	larqueurs moléculaires	49
I.2.5.1	Marqueurs nucléaires	50
1.2.5.2	Marqueurs mitochondriaux	53
1.2.5.3	Marqueurs chloroplastiques	54
CHAPIT	RE II	57
II. Ant	écédents et objectifs	58
II.1 Ant	écédents	58
II.2 Obj	ectifs	60
CHAPIT	RE III	62
TTT 3.4	42	<i>(</i> 2
III. Ma	tériel et Méthodes	63
III.1 Ma	tériel	63
III.1.1	Données des stations de prélèvement	63
III.1.2	Matériel biologique	67
·		<i>-</i> -
	thodes	
III.2.1	Technique de cytogénétique classique	68

III.2.1.1	Coloration, dénombrement des chromosomes et établissement du caryotype	
III.2.1.2	Analyse caryologique	69
III.2.2 Tec	chnique de cytogénétique moléculaire	72
III.2.2.1	Localisation des gènes d'ADN ribosomiques (ADNr)	72
III.2.3 Est	imation de la quantité d'ADN nucléaire par cytométrie en flux	76
III.2.4 Étu	ıde phylogénétique et phylogéographique	78
III.2.4.1	Extraction de l'ADN	78
III.2.4.2	Amplification par PCR	80
III.2.4.3	Électrophorèse sur gel d'agarose	81
III.2.4.4	Séquençage de l'ADN	82
III.2.4.5	Analyses des données phylogénétiques et phylogéographiques	83
Chapitre IV		85
IV. Résulta	ats et discussions	86
IV.1 Résulta	ats	86
IV.1.1 Étu	ıde caryologique	86
IV.1.1.1	Nombre de chromosomes	86
IV.1.1.2	Étude du caryotype	89
IV.1.1.3	Étude de l'asymétrie du caryotype	92
IV.1.2 Étu	ide de la cartographie physique de l'ADNr	93
IV.1.3 Est	imation de la taille du génome	94
IV.1.3.1	Relation entre le niveau de ploïdie, la longueur totale du caryotype et la taill	le
du génon	ne	97
IV.1.3.2	Effets des facteurs du milieu physique sur les variations des paramètres	
cytogéné	tiques 2C et $1Cx$ et le niveau de ploïdie $(2n)$	98
IV.1.3.3	Effet de l'altitude sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n	101
IV.1.3.4	Effet de la mise en défens sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n	102
IV.1.3.5	Analyses de l'effet des facteurs environnementaux sur les valeurs de 2C et 1	Cx
et 2 <i>n</i>		103
IV.1.3.6	Relation climat et niveau de ploïdie	
	ide phylogénétique et phylogéographique	
	Distribution spatiale des haplotypes	

IV.1.4.2	Structure génétique et phylogéographique	114
IV.1.4.3	Phylogénie de l'ADNcp	116
IV 2 D'	•	110
	sion	
	ide caryologique	
	Nombre de chromosomes	
	Idiogramme	
-	Symétrie du caryotype	
	ide de la cartographie physique de l'ADNr	
	lle du génome	
IV.2.3.1	Variations intra-cytotype de la quantité d'ADN nucléaire	121
IV.2.3.2	Réduction de l'ADN monoploïde 1Cx chez les polyploïdes	122
IV.2.3.3	Effet de l'altitude sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n	122
IV.2.3.4	Effet de la mise en défens sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n	123
IV.2.3.5	Effet des facteurs écoclimatiques « tm » et « P/ETP » sur les paramètres 1	lСx,
2C et 2 <i>n</i>		125
IV.2.3.6	Effet des facteurs environnementaux sur la distribution spatiale des deux	
cytotypes		127
IV.2.4 Étu	de phylogénétique et phylogéographique	128
CHAPITRE	V	130
V. Discuss	sion générale	131
,		
V.1 Etude	caryologique	131
V.2 Étude	de la cartographie physique de l'ADNr	132
VIZ Etuac	de m eureographie physique de l'Ilbivi	102
V.3 Étude	de la taille du génome	134
V 4 Étudos	phylogénétique et phylogéographique	120
v.4 Etude	pnyrogenetique et pnyrogeograpmque	130
Conclusion e	t perspectives	141
	- F F	
Références b	ibliographiques	144

Annexes	
Annexe 1	174
Annexe 2	175
Annexe 3	178
Annexe 4	184

## Liste des abréviations

C: Degré Celsius

– μg: Microgramme

 $-\mu L$ : Microlitre

– μm: Micromètre

- 1C*x* Taille du génome monoploïde

2C Taille du génome holoploïde

- 2*n* Nombre somatique de chromosomes

- A: Adénine

- ACP: Analyse en composante principale

- ADN: Acide désoxyribonucléique

- ADNcp: ADN chloroplastique

ADNmt: ADN mitochondrial

ADNr: ADN ribosomique

– Alt: Altitude

- ARN: Acide ribonucléique

ARNr: ARN ribosomique

- bp: Paire de bases

- CM: Carré moyen

- C: Cytosine

– cm : Centimètre

CMF: Cytométrie en flux

cp: Chloroplastique

- CV: Coefficient de variation

C-Value: Taille du génome

d.d.l: Degré de liberté

– ETP: Évapotranspiration potentielle

ETS: External Transcribed Spacer

- F: Fisher

FISH: Hybridation in situ fluorescente

FL3: Détecteurs de fluorescence de l'orange et le rouge

FSC: Forward Scatter

- G: Guanine

- *Gst* : Coefficient de différenciation génétique entre populations

- ha: Hectare

HCDS : Haut Commissariat au Développement de la Steppe

- HCl: Acide chlorhydrique

- *Hs*: Diversité génétique moyenne intra-population

- *Ht*: Diversité génétique totale

INRF: Institut National de la Recherche Forestière

- ISSR: Inter Simple Séquences Repeated

ITS: Internal Transcribed Spacer

Ka.B.P: Mille années avant le présent

- kg: Kilogramme

– Lat: Latitude

Longitude

– m: Mètre

Ma: Millions d'années

Ma.B.P: Millions d'années avant le présent

- Max: Maximum

Mbp: Million paires de bases

– mg: Milligramme

– Min: Minimum

– mL : Millilitre

– mm : Millimètre

- mn: Minute

– mW: Milliwatt

- *n* : Nombre gamétique de chromosomes

- ng: Nano gramme

– nm : Nanomètre

NORs : Organisateurs nucléolaires

- *Nst*: Coefficient de différenciation entre populations en prenant en

compte la similarité entre les haplotypes

– P: probabilité

P/ETP: Indice d'aridité

PCR : Polymerase Chain Reaction

– pg: picogarmme

Pop : Population

- q.s.p.: quantité suffisante pour

- RNase: Ribonucléase

S.C.: Somme des carrés

SD: Standard deviation

- s.f sous-famille

- sp: Espèce

SSC: Saline-sodium citrate (citrate sodique de sel)

- ssp: sous-espèces

- T: Thymine

- TAE: Tris/Acétate/EDTA

- Taq: Thermus aquaticus

- tm : Moyenne des températures minimales quotidiennes du mois le

plus froid

- tM: Moyenne des températures maximales quotidiennes du mois le

plus chaud

- U: Uracile

– UF: Unité fourragère

– UV: Ultraviolet

– v: Volume

- var.: Variété

- x: Nombre de base de chromosomes

# Liste des Figures

<b>Figure 1:</b> Quelques espèces représentant la diversité morphologique chez trois sous-familles (s.f) des <i>Asteraceae</i>
Figure 2 : Représentation schématique des principales caractéristiques de la famille des Asteraceae
Figure 3 : Membres représentatifs d'Anthemideae
Figure 4: Quelques espèces représentant la diversité morphologique de la sous-tribu des Artemisiinae
Figure 5 : Feuilles et inflorescences de quatre espèces d'Artemisia
Figure 6 : Diagrammes de la structure de fleurs de chaque sous-genre d'Artemisia18
Figure 7: Evolution du nombre de chromosomes et du niveau de ploïdie dans le genre Artemisia
Figure 8: Touffe d'Artemisia herba-alba
Figure 9 : Distribution géographique d'Artemisia herba-alba dans le bassin méditerranéen 23
Figure 10 : Aire de distribution d'Artemisia herba-alba en Algérie
Figure 11 : Illustration de la morphologie d'Artemisia herba-alba
Figure 12 : Les deux configurations de l'ADNr 18S-5.8S-26S et 5S
Figure 13 : Principe d'hybridation fluorescente <i>in situ</i> et méthodes de marquage des sondes (directe et indirecte)
Figure 14: Principe d'hybridation in situ fluorescente
Figure 15 : Différentes formes de sélection au niveau moléculaire au sein d'une population 42
Figure 16 : Oscillations climatiques dans le Sahara
Figure 17 : Illustration de la correspondance entre les phylogénies des haplotypes et leur distribution géographique
Figure 18: Unité d'ARN ribosomique
Figure 19 : Carte du génome chloroplastique d'Artemisia frigida

Figure 20 : Localisation des stations de prélèvement des échantillons d'Artemisia herba-alba
<b>Figure 21 :</b> Localisation des stations de récoltes des échantillons d' <i>Artemisia herba-alba</i> sur la carte bioclimatique simplifiée de l'Algérie
<b>Figure 22 :</b> Localisation des populations d' <i>Artemisia herba-alba</i> situées dans des aires protégées de mises en défens du <i>Haut Commissariat au Développement de la Steppe</i> (HCDS) et de l' <i>Institut National de la Recherche Forestière</i> (INRF)
<b>Figure 23 :</b> Carte de distribution des populations d' <i>Artemisia herba-alba</i> retenues pour l'étude phylogénétique
<b>Figure 24 :</b> Distribution géographique des deux cytotypes d' <i>Artemisia herba-alba</i> sur la carte géographique de l'Algérie
Figure 25: Métaphases somatiques
Figure 26: Idiogramme du cytotype diploïde (Population P6)
Figure 27: Idiogramme du cytotype tétraploïde (Population P6)
<b>Figure 28 :</b> Plaques métaphasiques d' <i>Artemisia herba-alba</i> après FISH à double cible à l'aide de deux sondes d'ADNr 5S (signaux verts) et 35S (signaux oranges), avec des idiogrammes haploïdes montrant l'emplacement de type-L (lié) de l'ADNr dans un individu diploïde (A) et un individu tétraploïde (B) des populations P17 et P26 respectivement 93
<b>Figure 29 :</b> Séparation des populations étudiées en deux groupes selon les valeurs de leurs quantités d'ADN nucléaire (2C) en pg
<b>Figure 30 :</b> Histogrammes d'intensité de fluorescence utilisant l'iodure de propidium pour les évaluations des tailles du génome par cytométrie en flux de: a) <i>Artemisia herba-alba</i> (individu diploïde de la population P6 (P6d); 2C = 6,87 pg) avec le standard interne <i>Petunia</i> (2C = 2,85 pg); b) <i>Artemisia herba-alba</i> (individu tétraploïde de la population P15; 2C = 13,29 pg) avec le standard interne <i>Pisum</i> (2C = 8,37 pg)
Figure 31 : Graphique de la décroissance des valeurs propres
<b>Figure 32 :</b> Cercle de corrélations entre facteurs écoclimatiques et paramètres cytogénétiques d' <i>Artemisia herba-alba</i> généré d'une ACP; Projection des variables sur F1 et F2 106
<b>Figure 33 :</b> Projection des populations d' <i>Artemisia herba-alba</i> sur F1 et F2 issue d'analyse en composante principale
<b>Figure 34 :</b> Distribution des deux cytotypes d' <i>Artemisia herba-alba</i> sur la carte simplifiée des étages bioclimatiques de l'Algérie

Figure	35	:	Réseau	d'haplotypes	d'Artemisia	herba-alba	illustrant	les	relations
phylogéi	nétiq	ues	entre hap	olotypes				•••••	112
_				spatiale des f	-				
l'inféren	ce ba	ayés	sienne de	ogénétique pou s données des	deux régions o	de l'ADNcp (	séquences o	conca	ténées de

# Liste des Tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre différentes classifications infragénériques d'Artemisia 18
Tableau 2 : Situation géographique des stations de prélèvement des échantillons d'Artemisia herba-alba       64
Tableau 3 : Données climatiques des stations de prélèvement des échantillons d'Artemisia         herba-alba       65
Tableau 4 : Nomenclature de Levan et al. (1964)    70
Tableau 5 : Diagramme de classification des caryotypes selon leurs degrés d'asymétries 72
<b>Tableau 6 :</b> Composition du mélange d'hybridation in situ de l'ADNr       74
Tableau 7 : Régions de l'ADN chloroplastique et de l'ADN nucléaire testées
Tableau 8 : Programme d'amplification par PCR
Tableau 9 : Séquences d'amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage par PCR 82
Tableau 10 : Nombre d'individus analysés par populations pour les deux régions chloroplastiques (rpl32-trnL et trnV-ndhC)       83
Tableau 11 : Récapitulatif des nombres de chromosomes et des conditions stationnelles des populations échantillonnées d'Artemisia herba-alba.       88
Tableau 12 : Etat comparatif des données morphométriques des caryotypes des trois populations d'Artemisia herba-alba analysées
Tableau 13 : Résumé des données de symétrie des caryotypes des trois populations analysées         d'Artemisia herba-alba       92
<b>Tableau 14 :</b> Nombre de <i>loci</i> de l'ADN ribosomique 5S et 35S, détectés par la technique de l'hybridation <i>in situ</i> fluorescente dans les deux cytotypes d' <i>Artemisia herba-alba</i>
Tableau 15 : État descriptif des valeurs moyennes des quantités d'ADN 2C (pg) des deux cytotypes d'Artemisia herba-alba       94
<b>Tableau 16:</b> Quantités d'ADN nucléaire moyenne et nombres de chromosomes correspondants dans les cellules somatiques chez les 28 populations d' <i>Artemisia herba-alba</i>

<b>Tableau 17 :</b> Corrélations (r) entre la quantité d'ADN nucléaire (2C) et le niveau de ploïdie (2n) et la longueur totale du caryotype (LTC) au seuil de signification 95% dans les trois
populations (P6, P17, P26) d'Artemisia herba-alba analysées
<b>Tableau 18 :</b> Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité de la quantité d'ADN nucléaire holoploïde 2C (pg) dans les populations diploïdes d' <i>Artemisia herba-alba</i>
<b>Tableau 19 :</b> Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité de la quantité d'ADN nucléaire holoploïde 2C (pg) dans les populations tétraploïdes d' <i>Artemisia herba-alba</i>
<b>Tableau 20 :</b> Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité des quantité d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx (pg) dans l'ensemble de populations d'Artemisia herba-alba
Tableau 21 : Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité inter-cytotypes des quantités d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx (pg) d'Artemisia herba-alba       100
<b>Tableau 22 :</b> Corrélation entre la quantité d'ADN nucléaire monoploïde (1Cx) et le niveau de ploïdie (2n) au seuil de signification 95% dans l'ensemble de populations d' <i>Artemisia herba-alba</i> étudiées
Tableau 23 : Taux de variation intra-cytotype de la quantité d'ADN nucléaire monoploïde         (1Cx)
<b>Tableau 24 :</b> Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de l'altitude sur la variabilité des paramètres 1Cx, 2C et 2n d'Artemisia herba-alba
<b>Tableau 25 :</b> Corrélations (r) entre l'altitude et les paramètres 1Cx, 2C et 2n, estimées pour l'ensemble de populations d' <i>Artemisia herba-alba</i> (Corrélations significatives marquées à P <0,05)
<b>Tableau 26 :</b> Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de mise en défens sur la variabilité des paramètres 1Cx, 2C et 2n d'Artemisia herba-alba 103
<b>Tableau 27 :</b> Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de mise en défens sur les variations des quantités 2C (pg) dans les populations tétraploïdes d'Artemisia herba-alba.  103
Tableau 28: Matrice de corrélation entre les paramètres cytogénétiques mesurés et les facteurs écoclimatiques       104
Tableau 29 : Valeurs propres et pourcentages de variance des facteurs    105

Tableau 30 : Test d'indépendance de Chi² entre le niveau de ploïdie et les étages bioclimatiques au seuil de signification de 95%       108
Tableau 31 : Positions des sites polymorphes entre individus d'Artemisia herba-alba sur les deux séquences concaténées (rpl32-trnL et trnV-ndhC) d'ADNcp
Tableau 32 : Diversité inter-populations
Tableau 33 : Diversité intra-population
Tableau 34 : Situations géographiques et données climatiques des stations de prélèvement des échantillons d'Artemisia herba-alba       174
<b>Tableau 35 :</b> Données morphométriques et types chromosomiques du cytotype diploïde (2n = 18) de la population P17 d'Artemisia herba-alba
<b>Tableau 36 :</b> Données morphométriques et types chromosomiques du cytotype diploïde (2n = 18) de la population P6 d' <i>Artemisia herba-alba</i>
<b>Tableau 37 :</b> Données morphométriques et types chromosomiques du cytotype tétraploïde $(2n = 36)$ de la population P26 d' <i>Artemisia herba-alba</i>
<b>Tableau 38 :</b> Données morphométriques et types chromosomiques du cytotype tétraploïde $(2n = 36)$ de la population P6 d' <i>Artemisia herba-alba</i>
<b>Tableau 39 :</b> Test de Bonferroni des groupes homogènes dans les populations diploïdes d' <i>Artemisia herba-alba</i> selon les valeurs de la variable $2C$ (pg), ( $\alpha = 0.05$ )
<b>Tableau 40 :</b> Test de Bonferroni des groupes homogènes dans les populations tétraploïdes d' <i>Artemisia herba-alba</i> selon les valeurs de la variable 2C (pg), ( $\alpha = 0.01$ )
<b>Tableau 41 :</b> Test de Bonferroni des groupes homogènes dans l'ensemble des populations d' <i>Artemisia herba-alba</i> selon les valeurs de la variable $1Cx$ (pg), ( $\alpha = 0.01$ )
<b>Tableau 42 :</b> Test de Bonferroni des groupes homogène des niveaux de ploïdie d' <i>Artemisia herba-alba</i> selon les valeurs de la variable $1Cx$ (pg), ( $\alpha = 0.05$ )

#### Résumé

Le projet d'étude porte sur une caractérisation génétique par des approches de cytogénétique classique et moléculaire et de phylogénie et phylogéographie de différentes populations d'*Artemisia herba-alba* couvrant toute l'aire de répartition de ce taxon en Algérie

Au terme de cette étude, deux nombres chromosomiques 2n = 2x = 18 et 2n = 4x = 36 chez l'espèce Artemisia herba-alba de l'Algérie, ont été révélés, avec une coexistence des deux cytotypes dans la même population dans deux populations, occupant une position géographique plus ou moins centrale dans la zone étudiée. Le cytotype diploïde 2n = 2x = 18a été détecté pour la première fois en Algérie. Quatre signaux (2 loci) ont été détectés par le FISH dans les cytotypes diploïdes et huit (4 loci) dans des cytotypes tétraploïdes pour les deux gènes d'ADN ribosomique. Les deux gènes se colocalisent sur le même site chromosomique, et présentent en conséquence, une organisation de type L (liée). La taille du génome reflète bien les deux niveaux de ploïdie, avec une réduction relative de la quantité d'ADN nucléaire dans les cytotypes polyploïdes. La température minimale de janvier «tm» semble être le facteur déterminant dans la distribution spatiale des deux cytotypes. L'étude phylogénétique et phylogéographique par l'utilisation des séquences de l'ADNcp, portée sur 17 populations d'Artemisia herba-alba a montré un faible niveau de diversité génétique. Toutefois, il y a suffisamment de variation sur l'ADNcp pour qu'un signal phylogéographique soit détecté. La région du Centre-Est s'est montré la plus diversifiée. L'origine d'Artemisia herba-alba dans le Hoggar est probablement dérivée des populations situées dans la limite sud de la zone étudiée par le biais de corridors biologiques établis à la fin du Miocène entre les écosystèmes méditerranéens et sahariens centraux. Les montagnes du Sahara Central ont constitué ainsi des refuges biogéographiques cruciaux pour ce taxon.

**Mots-clés**: ADN chloroplastique, *Anthemideae*, *Artemisia herba-alba*, *Asteraceae*, cytogénétique, hybridation *in situ* fluorescente, taille du génome, phylogéographie, polyploïdie.

#### **Summary**

The project concerns a genetic characterization by classical and molecular cytogenetic approaches and phylogeny and phylogeography of different populations of *Artemisia herba-alba* covering the whole range of this taxon in Algeria.

At the end of this study, two chromosome numbers 2n = 2x = 18 and 2n = 4x = 36 in the species Artemisia herba-alba from Algeria were revealed, with a coexistence of two cytotypes in the same population in two populations, occupying a more or less central geographic position in the study area. The diploid cytotype 2n = 2x = 18 was detected for the first time in Algeria. Four signals (2 loci) were detected by FISH in diploid cytotypes and eight (4 loci) in tetraploid cytotypes for both ribosomal DNA genes. Both genes are colocalized on the same chromosomal site, and therefore have an L (linked) organization. The genome size reflects both poidy levels, with a relative reduction of nuclear DNA amount in the polyploid cytotypes. The minimum temperature of January "tm" seems to be the determining factor in the spatial distribution of the two cytotypes. The phylogenetic and phylogeographic studies using cpDNA sequences in 17 populations of Artemisia herba-alba showed a low level of genetic diversity. However, there is enough variation on the cpDNA for a phylogeographic signal to be detected. The Central-East region was the most diverse. The origin of Artemisia herba-alba in Hoggar is probably derived from populations in the southern boundary of the study area through late Miocene biological corridors between Mediterranean and central Saharan ecosystems. The mountains of the Central Sahara have thus become crucial biogeographic refuges for this taxon.

**Keywords:** *Anthemideae*, *Artemisia herba-alba*, *Asteraceae*, chloroplast DNA, cytogenetic, fluorescent *in situ* hybridization, genome size, phylogeny, phylogeography, polyploidy.

## ملخص

يتعلق مشروع البحث بتوصيف وراثي بمقاربات متعددة تشمل الدراسة الخلوية الكلاسيكية والجزيئية و دراسة النشوء والفللوجيو غرافيا لعشائر مختلفة من الشيح الابيض تغطى مناطق تواجد هذا الصنف في الجزائر.

في نهاية هذه الدراسة، تم الكشف عن الثنين من اعداد الكروموسومات 2 v = 2 = 18 و 2 v = 3 في نبات الشيح الابيض في الجزائر مع التعايش بين النمطين في عشيرتين من العشائر المدروسة تحتلان موقعا جغرافيا مركزيا في منطقة الدراسة.الطابع الخلوي ثنائي الصيغة الصبغية v = 2 = 18 تم الكشف عنه لأول مرة في الجزائر. تحاليل تقنية FISH كشفت عن أربعة إشارات (موقعين اثنين) في الكروموسومات ثنائية الصبغة الصبغية وثمانية إشارات (عواقع) في الكروموسومات رباعية الصبغية الصبغية لكل من الجينين من الحمض النووي الريبوزومي. مع تواجد هذين الجينين على نفس الموقع الكروموسومي وبالتالي لديهما نمط مرتبط من نوع L. كمية الحمض النووي تعكس الصبغتين الصبغتين مع انخفاض ملحوظ لهذه الكمية لدى الكروموسومات متعددة الصبغة الصبغية. كما بينت الدراسة ان الحد الأدنى لدرجة الحرارة لشهر يناير « v = 1 » قد يكون هو العامل الحاسم في التوزيع المكاني للنمطين. دراسات النشوء والتطور الفيلوغرافي باستخدام شبكة الاليلات المرتبطة في 17 عشيرة من الشيح الابيض بينت مستوى منخفض من التنوع الجيني. على الرغم من هذا هناك ما يكفي من الاختلاف بين الاليلات المرتبطة لكي تعطي اشارة على وجود تركيبة فيلوجيووغرافية. تعد منطقة الوسط الشرقي الأكثر تنوعا. ومن المحتمل أن أصل نبات الشيح الابيض في منطقة الهقار يعود الى العشائر المتواجدة في الحدود الجنوبية لمنطقة الدراسة من خلال ممرات بيولوجية تكونت بين النظم الإيكولوجية للبحر الأبيض المتوسط والوسط الصحراوي اثناء العصر الميوسيني المتاخر. وهكذا أصبحت جبال الصحراء الوسطى ملجأ بيوجيوغرافي مناسبا لهذا الصنف.

كلمات البحث: Asteraceae, Artemisia herba-alba, Anthemideae، الشيح الابيض، الحمض النووي الريبوزومي، تقنية FISH، كمية الحمض النووي، النشوء، فيلوجيوغرافيا.

## **Avant-propos**

La région méditerranéenne peut être considérée comme un carrefour biogéographique d'espèces d'origines diverses (Blondel *et al.*, 2010). Sa position géographique, fait d'elle le point de rencontre des routes migratoires pour la flore des régions européennes, sahariennes et irano-touraniennes (Quézel, 1985).

L'armoise blanche, *Artemisia herba-alba* Asso, distribuée largement dans cette région, a été qualifiée de complexe d'espèces, avec des taxons étroitement apparentés considérés comme des espèces indépendantes dans la région irano-touranienne, ou comme une seule espèce (Vallès, 1987; Ouyahya et Viano, 1988; Podlech, 2013).

En Algérie, *Artemisia herba-alba*, se rencontre principalement dans les sols sablo-calcaires à texture limono-sableuse des zones steppiques, sahariennes et même subhumides, avec des précipitations annuelles moyennes de 100 à 600 mm (Pouget, 1980; Aidoud, 1988; Aidoud *et al.*, 2006; Nedjraoui, 2006).

L'importance accordée à cette espèce se justifie à divers niveaux. Le rôle écologique de l'armoise blanche pour la préservation de la steppe et la lutte contre la désertification n'est pas à démontrer. Au plan pastoral et économique, les steppes à armoise blanche ont été et sont toujours considérées parmi les meilleurs parcours pastoraux steppiques des hautes plaines d'Algérie (Houmani *et al.*, 2004). Ils sont les mieux appréciés par les animaux domestiques – principalement les moutons – et jouent ainsi un rôle important dans l'économie et le développement des zones rurales. En plus de sa richesse minérale très élevée, l'armoise blanche présente un indice très recherché pour ses propriétés pharmaceutiques (Ayad, 2008).

Selon Djebaili *et al.* (1995), la superficie occupée par *Artemisia herba-alba* en Algérie est estimée à 3 millions d'hectares. Les rapports les plus récents du Haut Commissariat au Développement de la Steppe (HCDS), évaluent cette superficie à seulement 2 millions d'hectares, soit 10% de toute la surface des steppes du pays, mais cela représente une réduction de 30% par rapport à la situation de 1970 (HCDS, 2010). Sa régression est en train d'être remplacée par des taxons peu palatables, comme *Noaea mucronata* (Forssk.) Asch. et Schweinf. et *Anabasis* spp. (HCDS, 2010). Mais, avantageusement, l'armoise blanche est une

espèce qui se régénère facilement par des actions de protections prolongées de mise en défens (HCDS, 2010).

Face aux stress édapho-climatique auquel est confronté cette espèce en Algérie à cause des facteurs écologiques (sècheresse, érosion éolienne, pauvreté des sols, désertification), et la pression anthropique traduite par des actions destructrices des parcours steppiques (surpâturage, défrichement, extension des labours, etc.), la mise en place d'une stratégie de régénération et de valorisation des ressources génétiques de cette espèce est devenue plus que nécessaire pour sa conservation, sa gestion et son repeuplement durable.

De ce fait, la diversité génétique est d'une importance fondamentale dans la survie d'une espèce car elle fournit l'adaptation nécessaire aux conditions environnementales biotiques et abiotiques dominantes, et permet la modification de la composition génétique pour faire face aux changements dans l'environnement.

Les populations végétales ne sont pas des assemblages de génotypes arrangés au hasard mais structurés dans l'espace et le temps (Schaal, 1975; Hamrick et Holden, 1979). Cette structure peut se manifester parmi des populations géographiquement distinctes, au sein d'un groupe local de plantes, ou même dans la descendance des individus (Loveless et Hamrick, 1984)

Des études ont montré qu'il existe une variabilité génétique considérable au sein ou entre les populations naturelles. Cette variabilité fournit une flexibilité génomique qui peut être utilisée comme matière première pour l'adaptation des plantes en tant qu'espèces pionnières (Kimatu et al., 2012). En revanche, une faible variabilité génétique a été associée à l'incapacité de faire face aux stress abiotiques et biotiques (Valen, 1965). De ce fait, il est nécessaire de rechercher une variabilité génétique plus élevée afin d'augmenter la capacité d'un organisme à s'adapter aux conditions environnementales en constante évolution (Ellstrand et Elam, 1993).

Le manque d'informations sur la structure génétique des populations végétales est un problème sérieux, car toute compréhension de la spéciation, de l'adaptation ou du changement génétique doit prendre en compte les modèles génétiques et les processus par lesquels ils sont modifiés (Antonovics, 1976).

C'est dans cette optique que s'inscrit le présent travail de thèse portant sur une caractérisation de la diversité génétique intra et inter-populations d'*Artemisia herba-alba* en Algérie, et sa structuration éco-géographique.

Les approches adoptées dans cette étude sont multiples, caryologiques, cytogénétiques moléculaires, phylogénétiques et phylogéographiques :

- Les données caryologiques et cytogénétiques sont fondamentales pour caractériser l'organisation du génome, ce qui est essentiel pour les approches systématiques, évolutives et de conservation des plantes (Levin, 2002). Le nombre de chromosomes est un trait fondamental et aussi pertinent pour les études systématiques et évolutives des plantes, car il permet de détecter des processus moteurs de l'évolution tels que la polyploïdie et la dysploïdie (Stebbins, 1971; Guerra, 2008; Stuessy, 2009; 2011; Garbari *et al.*, 2012).
- ➤ La taille du génome est également un paramètre cytologique crucial, car elle est liée à beaucoup d'autres paramètres et parfois aussi à des facteurs systématiques, écologiques et autres (Bennett et Leitch, 2005a).
- La cytogénétique moléculaire, et en particulier l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH), offre des outils puissants pour une analyse caryotypique profonde, en fournissant des cartes physiques de certaines régions chromosomiques et en permettant de déduire des mécanismes d'évolution chromosomique (Siljak-Yakovlev *et al.*, 2014).
- La connaissance de la structuration génétique d'une espèce constitue de plus un outil précieux pour la conservation des ressources génétiques d'une espèce. L'utilisation des marqueurs moléculaires dans la phylogénie moléculaire est devenue indispensable pour résoudre les problèmes taxonomiques et évolutifs. Le progrès dans les domaines de la biologie moléculaire et de la technologie génétique, surtout les technologies de séquençage d'ADN, est devenu très utile pour une détermination rapide et précise des relations phylogénétiques (Abdel-Samad, 2016).

Cette approche multidisciplinaire abordée pour la première fois pour cette espèce en Algérie, est réalisée dans le but de valoriser ce taxon et de contribuer à sa conservation en évaluant sa diversité intra et inter populationnelle et sa structure phylogénétique et phylogéographique.

Le travail de thèse s'organise autour de cinq chapitres et une conclusion avec les perspectives. Le **premier chapitre** est une introduction générale dans laquelle nous avons présenté l'espèce *Artemisia herba-alba*, sa taxonomie, sa biologie, sa distribution dans le monde et en Algérie, et son importance écologique et économique, ainsi que quelques concepts clés de cytogénétique classique et moléculaire, de diversité génétique et les techniques d'analyses utilisées.

Dans le **deuxième chapitre** sont élucidés les travaux antécédents effectués sur cette espèce et les objectifs de la thèse. Dans le **troisième chapitre** sont décrits le matériel et les méthodes d'études utilisées. Les résultats et discussions sont exposés dans le **quatrième chapitre**. Une discussion générale récapitulant les résultats obtenus fera l'objet du **cinquième chapitre**. En fin, nous terminons par une conclusion qui souligne les résultats importants de ce travail et ouvre des perspectives en vue d'approfondir nos connaissances sur ce taxon en Algérie et dans le monde.

Des articles scientifiques qui reprennent une partie des résultats de la thèse sont présentés en Annexe 4.

# **CHAPITRE I**

# Introduction Générale

## I. Introduction Générale

## I.1 Synthèse bibliographique sur Artemisia herba-alba Asso

#### I.1.1 Les *Asteraceae* Dumortier (= *Compositae* Giseke)

Les *Asteraceae* Dumortier, également appelée *Compositae* Giseke (ou synanthérées), est la plus importante famille chez les angiospermes (Funk *et al.*, 2005). Le nom "*Asteraceae*" provient du genre *Aster*, signifiant *étoile* en grec, et se réfère à la forme étoile de l'inflorescence. "*Compositae*" est un nom plus ancien mais toujours valable qui se réfère au fait que la famille est l'une des quelques angiospermes à avoir des fleurs composites (https://en.wikipedia.org/wiki/Asteraceae)

Selon Funk *et al.* (2005), 10 % des plantes à fleurs sont des *Asteraceae*. Le nombre de genres et d'espèces de cette famille est variable selon les auteurs (32 913 espèces et 1 911 genres (The Plant List, 2013) ; 23 000 espèces et 1530 genres selon Botineau (2010); de 24 000 à 30 000 espèces et 1600 à 1700 genres selon Funk *et al.* (2005); 23 000 espèces et 1535 genres selon Judd *et al.* (2002)).

En Algérie, Quézel et Santa (1963) ont répertorié 408 espèces réparties en 109 genres.

Les *Asteraceae* peuvent se rencontrer sur toute la surface du globe (Guignard, 1998; Botineau, 2010). Néanmoins, elles sont particulièrement diversifiées dans les régions sèches, comme le Bassin Méditerranéen, l'Afrique australe, le Mexique, le Sud-ouest des États-Unis et les régions arides d'Amérique du Sud (Botineau, 2010). Selon les reconstructions phylogénétiques récentes, la famille a eu son origine dans la partie sud de l'Amérique du Sud il y a environ 50 millions d'années, pour conquérir ultérieurement l'Afrique et se propager vers l'Asie, l'Eurasie et l'Australie (Funk *et al.*, 2005).

Les *Asteraceae* regroupent des espèces annuelles, vivaces ou pérennantes (Figure 1), et aussi quelques espèces ligneuses : lianes, arbustes et même des arbres (Botineau, 2010).



**Figure 1:** Quelques espèces représentant la diversité morphologique chez trois sous-familles (s.f.) des *Asteraceae*: a) *Barnadesia caryophylla* (s.f. *Barnadesioideae*), b) *Chuquiraga jussieui* (s.f. *Barnadesioideae*), c) *Centaurea solstitialis* (s.f. *Cichorioideae*), d) *Carthamus tinctorius* (s.f. *Cichorioideae*), e) *Echinops bannaticus* (s.f. *Cichorioideae*), f) *Mutisia campanulata* (s.f. *Cichorioideae*), g) *Leontopodium nivale* (s.f. *Asteroideae*), h) *Helianthus annuus* (s.f. *Asteroideae*), i) *Zinnia elegans*. (s.f. *Asteroideae*), j) *Aster amellus* (s.f. *Asteroideae*), k) *Senecio aureus* (s.f. *Asteroideae*), l) *Inula salicina* (s.f. *Asteroideae*) (http://www.plantsystematics.org, https://commons.wikimedia.org, http://worldoffloweringplants.com, http://www.florealpes.com).

Les membres de cette famille se distinguent par deux caractères originaux : a) groupement des fleurs en capitules, b) soudure des étamines par leurs anthères, d'où le nom « synanthérées » (Figure 2).

Le fruit chez cette famille est un akène surmonté souvent d'un pappus (Quézel et Santa, 1963; Ozenda, 1991; Botineau, 2010). Ils forment ainsi un groupe facilement reconnaissable et sans aucun doute monophylétique (Judd *et al.*, 2002). Les feuilles chez les *Asteraceae* sont alternes, opposées ou verticillées, simples, parfois profondément découpées. Les marges peuvent être entières, lobées ou dentées, à nervation généralement pennée ou palmée et, dans les pays tropicaux peuvent devenir succulentes ou au contraire se réduire à des écailles (Judd *et al.*, 2002; Botineau, 2010).

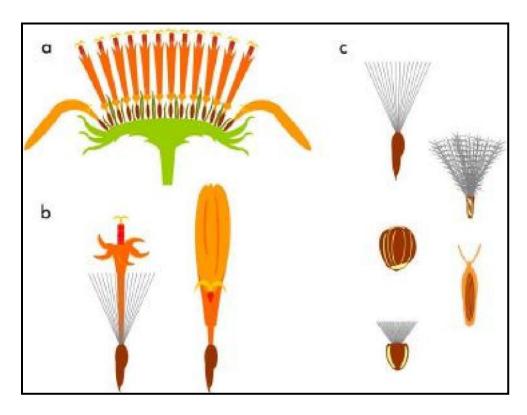
Le capitule peut être *multiflores* (jusqu'à plus de 2000 sur un capitule de tournesol), *paucilflores* (8 à 15 fleurs ou moins) ou *uniflore* (cas de *Xanthium* et *echinops*) (Quézel et Santa, 1963; Botineau 2010). Du point de vue sexuel, les fleurs des Asteraceae peuvent être : hermaphrodites, unisexuées (femelles ou mâles) ou neutres (Quézel et Santa, 1963).

La pollinisation est en général entomophile (certaines *Artemisiinae* et *Ambrosiinae* sont anémophiles). Les akènes de la plupart des *Asteraceae* sont disséminés par le vent.

Les Asteraceae sont pourvues d'un appareil sécréteur ordinairement bien développé composé soit des cellules et canaux sécréteurs, responsables de l'odeur caractéristique de certaines espèces, soit des laticifères. Elles ont ainsi la capacité de produire de métabolites primaires tels que les glucides et les lipides qui confèrent à de nombreuses espèces une valeur économique importante.

Outre, de nombreuses espèces d'Asteraceae accumulent des fructanes, principalement dans la vacuole des cellules parenchymateuses des organes souterrains épaissis, qui remplissent le rôle principal de stockage des glucides (Taiza et al., 2015). D'un point de vue économique, les fructanes de type inuline sont connus comme composés pré-biotiques agissant comme aliment fonctionnel, améliorant ainsi le système immunitaire, l'absorption minérale et prévenant un certain nombre de maladies comme le diabète de type II, le cancer du côlon et les maladies coronariennes (Di Bartolomeo et al., 2013). De nos jours, les racines de chicorée constituent la principale source de l'inuline utilisée dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (Joaquim et al., 2014)

Les *Asteraceae* ont la capacité aussi de produire une grande variété de métabolites secondaires, entre autres les flavonoïdes, les huiles essentielles terpéniques et les lactones sesquiterpéniques (Judd *et al.*, 2002 ; Botineau, 2010).



**Figure 2 :** Représentation schématique des principales caractéristiques de la famille des *Asteraceae*. a) Inflorescence en capitule, b) fleur tubulaire et fleur ligulée, c) fruit caractéristique des *Asteraceae* [Image extraite de Pellicer (2009)].

Les classifications anciennes subdivisent les *Asteraceae*, selon des différents critères biochimiques, anatomiques ou morphologiques, en 2 sous-familles (Guignard, 1998), ou quatre sous-familles (Crété, 1965; Messaili, 1995). La classification de Bremer et Jansen, (1992) partage la famille en 17 tribus regroupées en trois sous-familles; *Barnadesioideae*, *Cichorioideae* (*Lactucoideae*) et *Asteroideae*. Actuellement, les *Asteraceae* sont regroupées en 13 sous-familles selon des analyses de phylogénie moléculaire utilisant des *loci* de l'ADN chloroplastique (Panero et Funk, 2003; Funk *et al.*, 2005; Panero et Funk, 2008; Panero *et al.*, 2014), dont la sous-famille *Asteroideae* représentait plus de 65 % de la diversité des espèces de toute la famille (Funk *et al.*, 2005)

#### I.1.2 Anthemideae Cass.

Anthemideae Cassini est une tribu qui fait partie de la sous-famille d'Asteroideae. Elle comprend environ 1800 espèces et 111 genres (Oberprieler et al., 2009, 2007b), et considérée, par conséquent, parmi les plus grandes tribus de la sous-famille d'Asteroideae (Botineau, 2010). Les membres de la tribu sont largement distribués dans les cinq continents du monde

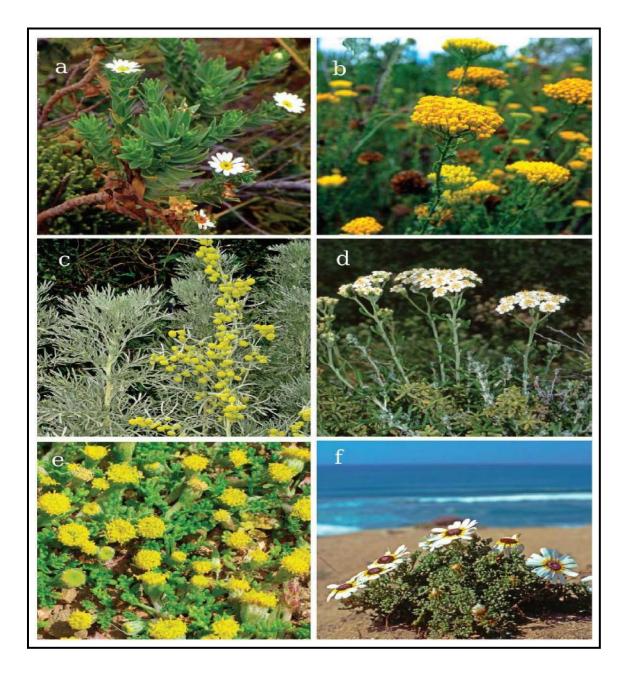
(Figure 3), avec des grandes concentrations en Asie centrale, dans la région méditerranéenne et dans le sud de d'Afrique (Pellicer, 2009).

Les membres de la tribu sont bien connus comme des plantes aromatiques et certains sont utilisés pour leurs valeurs pharmaceutiques et / ou pesticides (Oberprieler *et al.*, 2009), ainsi que pour d'autres usages économiques (fourrages, pâturages, etc...). Les plantes appartenant aux *Anthemideae* sont caractérisées par la présence de trois principaux composés secondaires; les polyacetylènes, les lactones sesquiterpéniques, et les flavonoïdes (Oberprieler *et al.*, 2009).

La nouvelle classification sous-tribale proposée récemment par Oberprieler *et al.* (2007b), basée sur des analyses phylogénétiques moléculaires de l'ADN ribosomique (région ITS) et de l'ADN chloroplastique (région *ndh*F) associées à des analyses morphologiques, anatomiques, cytologiques, embryologiques et phytochimiques, a permis de subdiviser la tribu *Anthemideae* en 14 sous-tribus. Les études de plusieurs régions d'ADN (Funk *et al.*, 2005; Oberprieler *et al.*, 2007, 2009) ont confirmé la monolphylie de cette tribu.

Les espèces de la tribu sont caractérisées par des *feuilles* alternes ou rarement opposées, souvent profondément divisées, fortement odorantes; *involucres* souvent hémisphériques, obconiques, cylindriques ou même urcéolés à bractées disposées en deux à sept rangées imbriquées et possèdent souvent des pointes ou des marges scarieuses; *capitules* soit hétérogames (radiés ou discoïdes), soit homogames discoïdes ; *réceptacle* porte ou non des paillettes; *Anthères* presque toujours obtuses à la base (rarement caudées); *fleurs* hermaphrodites à style dont les branches sont tronquées et ont, en général, une touffe de poils au sommet; *akènes* à aigrette soit nulle, soit coroniforme ou formée de paillettes ou de soies (Quézel et Santa, 1963; Crété, 1965; Oberprieler *et al.*, 2007b, 2009; Botineau, 2010).

Selon Heywood et Humphries (1977) et Bremer et Humphries (1993), le nombre de chromosomes de base le plus commun chez les *Anthemideae* est x = 9. D'autres nombres de base (x = 5-8, x = 10-11, x = 13, x = 17) apparaissent dans quelques genres. Le nombre x = 10, est le plus raisonnable pour l'ancêtre commun de la tribu (Oberprieler *et al.*, 2007a).



**Figure 3 :** Membres représentatifs d'Anthemideae. a) Osmitopsis asteriscoides (P. Bergius) Less., b) Athanasia dentata (L.) L., c) Artemisia arborescens L., d) Achillea cretica L., e) Anthemis rigida Heldr., f) Ismelia carinata (Schousb.) Sch.Bip. (image extraite d'Oberprieler et al., 2009)

#### I.1.3 La sous-tribu Artemisiinae Less.

La sous-tribu *Artemisiinae* Less. comprend 17 genres, dont le genre *Artemisia* L. est le plus important (Oberprieler *et al.*, 2007b; 2009). Cette sous-tribu est distribuée dans le monde entier, avec une grande concentration en Asie centrale (Oberprieler *et al.*, 2007b).

Les espèces de la sous-tribu sont des arbustes, sous-arbustes, plantes vivaces ou annuelles (Figure 4), caractérisées principalement par : *Indument* absent ou à poils basifixes ou médifixes; *Feuilles* en rosette ou alternes, entières, lobées, dentelées à 2-3 pinnatiséquées; *capitules* solitaires, radiés, disciforme ou discoïde en corymbe lâche à dense ou en panicule, rarement en glomérule dense; *involucre* hémisphérique à cylindrique, obconique ou urcéolé; *bractées* en 1-7 rangs, avec des marges scarieuses étroites ou large; *réceptacle* plat à conique, paléacé ou non; *fleurs périphériques* (quand elles sont présentes) femelles ou stériles; *fleurs du disque extérieur* femelles; *fleurs du centre* hermaphrodites ou mâles (rarement neutres); *anthères*, parties basales arrondies, rarement caudées; *akènes* ellipsoïdes à obovoïdes sans ou avec 4-8 (-12) côtés, parfois aplatis; nombre chromosomique de base x = 7, 8, 9, 10, 11, 17 (Oberperlier *et al.*, 2007b; 2009).

Selon les études de phylogénie moléculaires les plus récentes (Torrell et al., 1999; Kornkven et al., 1998, 1999; Watson et al., 2002; Vallès et al., 2003; Sanz et al., 2008; Oberprieler et al., 2007b, 2009), les genres Artemisiella, Hippolytia (sous-tribu Tanacetinae), Leucanthemella et Nipponanthemum (sous-tribu Leucantheminae) appartiennent tous à la sous-tribu Artemisiinae telle que délimitée par Bremer et Humphries (1993). Ces études ont également démontré que le genre Artemisia, au sens de Bremer et Humphries (1993) est hautement paraphylétique et que Crossostephium, Filifolium, Mausolea, Neopallasia, Picrothamnus, Sphaeromeria et Turaniphytum en devraient être intégrés pour arriver à un groupe monophylétique (Oberperlier et al., 2009). Les résultats des travaux de Sanz et al. (2008) basés sur l'étude des variations des séquences d'ADN ribosomique nucléaire des régions ITS et ETS ont affirmé que tous les genres d'Artemisiinae constituent un groupe monophylétique qui lui-même se subdivise en trois groupes monophylétiques : i) le groupe Nipponanthemum / Hippolytia / Brachanthemum ; ii) le groupe Dendranthema; et iii) le groupe Artemisia / Kaschgaria.



**Figure 4 :** Quelques espèces représentant la diversité morphologique de la sous-tribu des *Artemisiinae* : a) *Chrysanthemum indicum* L, b) *Ajania pacifica* Nakai, c) *Neopallasia pectinata*. Pall. d) *Sphaeromeria argentea* Nutt. e) *Filifolium sibiricum* L. f) *Hippolytia dolichophylla* Kitam. (https://commons.wikimedia.org, http://bsi.gov.in, http://www.plantarium.ru, http://eol.org)

#### I.1.4 Le genre Artemisia L.

Le genre *Artemisia* L. est le plus grand de la sous-tribu *Artemisiinae* et de la tribu *Anthemideae*, avec environ 522 espèces (Oberprieler *et al.*, 2009), et l'un des plus grands genres de la famille des *Asteraceae* (Torrell *et al.*, 1999 ; Vallès et McArthur, 2001).

En Algérie, Quézel et Santa (1963) ont répertorié 11 taxons (espèces et sous-espèces) appartenant à ce genre (A. herba-alba, A. absinthium L., A. arborescens L., A. judaica L., A. atlantica Coss. et Dur, A. alba Turra, A. campestris L. ssp. campestris, A. campestris ssp. eucampestris Briq et Cav (synonyme de A. clausonis Pomel, A. odoratissima Desf. (Marouf, 2012)), A. campestris ssp. glutinosa (J. Gay) Batt., A. verlotiorum Lamotte et A. vulgaris L.).

Le nom scientifique d'*Artemisia* vient de la déesse grecque Artémis (Diane pour les Romains), la fille de Zeus et la sœur d'Apollon, considérée comme la protectrice des animaux sauvages et la chasse. Une autre interprétation attribue son origine à Artemisia, sœur et épouse de Mausolus et reine de Caria après la mort de son mari (Vallès *et al.*, 2011).

Le genre *Artemisia* est largement répandu dans l'hémisphère nord et très rare dans l'hémisphère sud (pas plus de 35 taxons) (Torrell *et al.*, 1999; Vallès et McArthur, 2001; Vallès *et al.*, 2011).

Les espèces d'*Artemisia* sont le plus souvent des herbacées, des sous-arbrisseaux et aussi quelques arbustes (Figure 5). Les plantes vivaces prédominent largement sur les annuelles ou bisannuelles, qui sont au nombre d'environ 10 à 20 espèces (Bremer et Humphries, 1993; Vallès et McArthur, 2001).

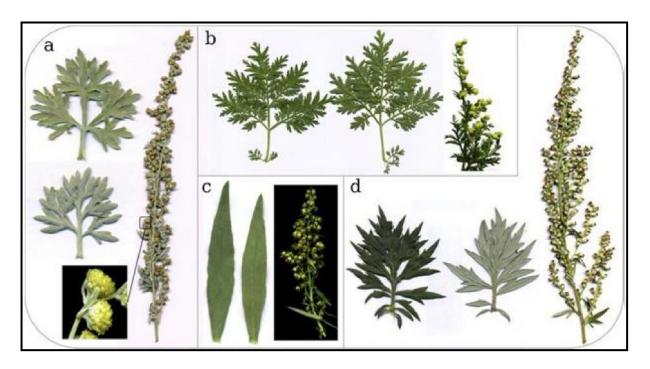
La floraison de la plupart des espèces d'Artemisia est tardive. Elles fleurissent dans la fin de l'été, à l'automne ou même à l'hiver. La pollinisation est presque exclusivement anémophile (Vallès et al., 2011). La reproduction sexuée est prédominante dans le genre Artemisia. Cependant, certaines espèces du genre montrent aussi une multiplication végétative (Oliva et al., 1997; Vallès et al., 2011). La plupart des espèces d'Artemisia poussent en petites populations. Cependant, plusieurs taxons des steppes semi-arides forment de grandes populations dominées par des espèces appartenant aux sous-genres Seriphidium (région méditerranéenne, Asie centrale) ou Tridentatae (Amérique du Nord) (Vallès et McArthur, 2001).

Les espèces d'Artemisia sont caractérisées par une plasticité écologique remarquable, elles sont distribuées dans différents environnements (depuis les zones arides et semi-arides et les steppes de l'hémisphère nord jusqu'aux zones humides) et sur des altitudes variables, allant du niveau de la mer jusqu'à 4000 m (Vallès et McArthur, 2001). Certaines espèces sont cosmopolites, et d'autres sont endémiques avec une aire de distribution assez restreinte (Vallès et al., 2011).

L'Asie centrale constitue le foyer principal de la diversification et de la spéciation d'*Artemisia*, avec des centres secondaires, situés dans l'Irano-Touranienne, dans la Méditerranée et dans l'Ouest de l'Amérique du Nord (Vallès et McArthur, 2001; Vallès et Garnatje, 2005; Pellicer *et al.*, 2010; Garcia *et al.*, 2011; Sanz *et al.*, 2011).

Les recherches sur la première apparition d'*Artemisia*, basées sur des études stratigraphiques de fossiles de pollen et des données paléo-magnétiques suggèrent que le genre est originaire des zones arides à semi-aride du Plateau Tibétain (en Chine) de l'Asie centrale à la fin de l'Eocène (Miao *et al.*, 2011) ou le Mi-Tertiaire (Wang, 2004). Sanz *et al.* (2011), en utilisant des données de séquences (ITS et ETS) d'ADN nucléaire, ont indiqué que l'origine de la sous-tribu *Artemisiinae* en Asie remonte à l'Oligocène tardif, et que la différenciation initiale du genre *Artemisia* et les genres les plus étroitement liés a eu lieu dans le Miocène précoce (19.8 ± 2.3 Ma).

Le genre *Artemisia* se singularise par un certain nombre de traits fortement accusés: *feuilles* alternes ou clairsemées, généralement plus ou moins divisées (exceptionnellement entières), avec des formes et des dimensions extrêmement variables; *capitules* petits ou moyens, 2-4 x 1.5-6mm, réunis en panicule, homogames ou hétérogames, discoïdes, constitués par un nombre de *fleurs* tubuleuses varié entre 4 à 7 fleurs jusqu'à plus de 40 fleurs, les *fleurs du disque* sont hermaphrodites (fertiles ou stériles); celles du rayon femelles ou hermaphrodites; *corolles* blanchâtres, jaunes ou pourpres, et peu visibles; *bractées* de l'involucre imbriquées et à marges scarieuses du reste velues, tomenteuses ou exceptionnellement glabres; *akènes* non surmontés d'un pappus (Quézel et Santa, 1963; Ouyahya, 1995; Vallès et McArthur, 2001; Vallès *et al.*, 2011).



**Figure 5 :** Feuilles et inflorescences de quatre espèces d'*Artemisia*. a) *Artemisia absinthium*. b) *Artemisia annua*. c) *Artemisia dracunculus*. d) *Artemisia vulgaris*. Pour chaque espèce, les feuilles placées dans le côté supérieur ou à gauche montrent la face adaxiale et celles placées dans le côté inférieur ou à droite montrent la face abaxiale (image extraite de Vallès *et al.*, 2011).

La majorité des espèces d'Artemisia se sont avérées avoir une valeur économique élevée dans plusieurs domaines : médicinales ; antihelminthiques (A. santonicum) et antipaludiques (A. annua); alimentaires (A. absinthium et d'autres taxons, tel que A. genipi, utilisé dans la préparation de liqueurs) ; ornementales (A. absinthium, A. caucasica, et beaucoup d'autres); fourragères (A. herba-alba et espèces apparentées dans les steppes arides d'Afrique et d'Asie et A. tridentata et ses alliés dans les zones nord-américaines) ; dans la fixation des terres (A. ludoviciana et A. vulgaris). D'autre part, certains taxons, tel que A. verlotorum, sont des mauvaises herbes envahissantes. Certaines autres peuvent être toxiques (A. absinthium, par exemple) ou causer des allergies induites par le pollen (A. barrelieri; espèce endémique de la Péninsule Ibérique) (Ouyahya, 1995; Vallès et McArthur, 2001; Mahmood et al., 2011; Vallès et al., 2011; Salari et al., 2014).

La taxonomie du genre *Artemisia* a suscité beaucoup de controverses (Tableau 1). Les catégories infragénériques diffèrent selon les auteurs même si les caractères utilisés pour leur délimitation se rapportent généralement aux mêmes organes (Ouyahya, 1995). Depuis la classification de Tournefort (1700), plusieurs tentatives de classifications d'*Artemisia* ont été proposées. Cependant, compte tenu du nombre important des espèces du genre *Artemisia*, Bresser (1829, 1932, 1934, 1935) et De Candolle (1837) ont proposé quatre groupes :

Absinthium, Artemisia, Dracunculus et Seriphidium, classés selon des caractères morphologiques; principalement sur la base de la structure florale. Les caractéristiques florales de chaque sous-genre sont (Figure 6):

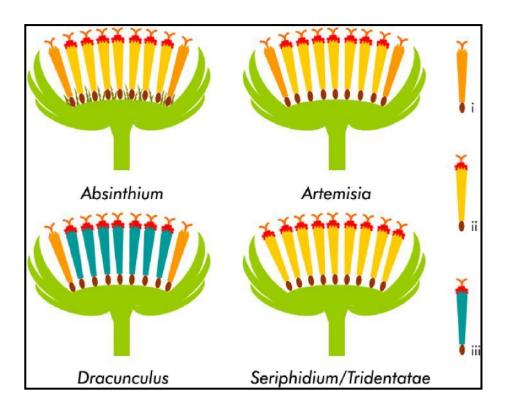
- *Absinthium*: capitule hétérogame avec fleurs extérieures femelles et fleurs centrales hermaphrodites et fertiles. Réceptacle poilu;
- *Artemisia* (= *Abrotanum*) : capitules hétérogames avec des fleurs extérieures femelles et fleurs centrales hermaphrodites et fertiles. Réceptacle glabre;
- *Dracunculus*: capitule hétérogame avec fleurs extérieures femelles et fleurs centrales hermaphrodites mais fonctionnellement mâle. Réceptacle glabre;
- Seriphidium et Tridentatae: capitule homogame avec toutes les fleurs hermaphrodites et fertiles. Réceptacle glabre (Torrell et al., 1999; Vallès et McArthur, 2001; Pellicer et al., 2011; Vallès et al., 2011).

Rydberg (1916) in Vallès et McArthur, (2001), crée une cinquième et nouvelle section Tridentatae Rydb. endémique de l'Amérique du Nord dans le but d'inclure la plus grande partie du Seriphidium originaire d'Amérique comme une section indépendante. McArthur et al. (1981) élèvent le rang de cette section à un sous-genre. Ling (1991) a proposé la séparation de Seriphidium en un grand genre indépendant (près de 150 espèces). Bremer et Humphries (1993) ont accepté cette séparation dans leurs révisions cladistiques de la tribu Anthemideae et de la famille Asteraceae. Les études moléculaires les plus récentes, basées sur le séquençage de l'ADN nucléaire et chloroplastique (Watson et al., 2002; Vallès et al., 2003; Oberprieler et al., 2007b, 2009; Sanz et al., 2008) ont rejeté cette séparation.

Récemment, Hobbs et Baldwin, (2013) ont décrit un nouveau sous-genre *Pacifica* Hobbs & Baldwin, comprenant les endémiques hawaïennes et leur congénère asiatique *Artemisia chinensis* L., anciennement séparé en un genre monotypique indépendant (*Crossostephium chinense* (L.) Makino).

**Tableau 1 :** Comparaison entre différentes classifications infragénériques d'*Artemisia* (Vallès et McArthur, 2001).

Catégorie	Taxon infragénérique					Référence
Genres	Absinthium	Abrotanum	Artemisia			Tournefort (1700)
Genre	Artemisia					Linné (1735)
Genres	Artemisia				Oligosporus	Cassini (1817) ; Lessing (1832)
Sections	Absinthium	Abrotanum	Seriphidium		Dracunculus	Bess. (1829, 1832, 1834, 1835) De Candolle (1837)
Sous-genres	Euartemisia		Seriphidium		Euartemisia	Rouy (1903)
Sous-genres Sections	Absinthium	Abrotanum	Seriphidium Seriphidium	Tridentatae	Dracunculus	Rydberg (1916)
Sous-genres	Artemisia		Seriphidium		Dracunculus	Poljakov (1961)
Sous-genres	Absinthium	Artemisia	Seriphidium		Dracunculus	Persson (1974)
Sections	Artemisia				Dracunculus	Tutin and others (1976)
Sous-genres	Artemisia		Seriphidium	Tridentatae	Dracunculus	McArthur and others (1981)
Sous-genres	Artemisia		Seriphidium		Dracunculus	Podlech (1986)
Genres	Artemisia		Seriphidium		Artemisia	Ling (1991a,b)
Sous-genres	Artemisia		Seriphidium		Dracunculus	



**Figure 6 :** Diagrammes de la structure de fleurs de chaque sous-genre d'*Artemisia*. i) fleurs femelles, ii) fleurs hermaphrodites fertiles, iii) fleurs hermaphrodites mais fonctionnellement mâles (figure extraite de Pellicer *et al.*, 2011).

Les données phylogénétiques moléculaires les plus récentes concordent fondamentalement avec la taxonomie classique infragénérique du genre. Les cinq groupes classiques traités comme des sections ou des sous-genres sur la base des caractères morphologiques, sont actuellement reconnus puisqu'ils s'adaptent à grande échelle aux classifications basées sur l'analyse des séquences d'ADN (avec quelques exceptions dans les sous-genres *Artemisia* et *Absinthium*), (Torrell *et al.*, 1999; Watson *et al.*, 2002; Vallès *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2011; Pellicer *et al.*, 2011; Vallès *et al.*, 2011; Malik *et al.*, 2017). Cependant, certaines questions, liées principalement à sa taxonomie infragénérique, n'ont pas encore été résolues et restent posées.

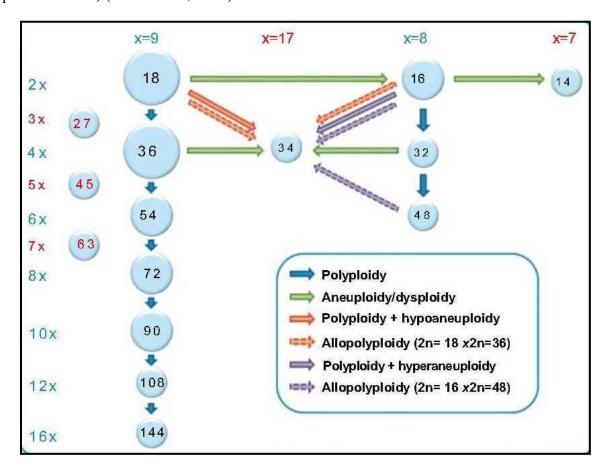
Du point de vue structure du génome et de son évolution dans le contexte systématique et évolutif, le genre Artemisia est suffisamment investigué. Les données numériques des chromosomes sont disponibles pour plus de 350 taxons, soit plus de 50% du nombre de taxons dans le genre (Pellicer  $et\ al.$ , 2007). Le nombre de chromosomes somatiques (2n) dans le genre Artemisia varie de 14 à 144 (Vallès  $et\ al.$ , 2011). Deux nombre chromosomiques de base caractérisant ses membres sont : x = 9, présent dans tous les sous-genres d'Artemisia, et x = 8 limité à certains taxons du sous-genre (Absinthium, Artemisia et Dracunculus) (Pellicer  $et\ al.$ , 2007; Vallès  $et\ al.$ , 2011).

La voie évolutive concernant le nombre de chromosomes chez *Artemisia* est modélisée par les actions successives ou simultanées de la polyploïdie (autopolyploïdie et allopolyploïdie) et de la dysploïdie. En effet, environ 44% des espèces d'*Artemisia* sont seulement diploïdes, environ 30% sont exclusivement polyploïdes, et plus ou moins 26% sont connus par des niveaux diploïdes et polyploïdes (Pellicer *et al.*, 2010b), ce qui signifie que plus de la moitié des taxons du genre ont au moins quelques populations polyploïdes et près d'un tiers, sont tous polyploïdes. Cela indique l'importance de la polyploïdie comme force d'évolution dans le genre.

La fusion centrique (Robertsonienne) de chromosomes, réduisant le nombre de chromosomes de base de x = 9 à x = 8, pourrait être à l'origine de la dysploïdie descendante dans le genre *Artemisia* (Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997).

Les différents nombres sont présentés sur la figure 7, avec indication du sens du processus de dysploïdie. Le nombre de base ancestral et principal (x = 9) a non seulement plus d'espèces mais aussi plus de niveaux de ploïdie. Le nombre x = 8 comprend seulement deux niveaux de ploïdie tétraploïde et hexaploïde. Il existe encore deux nombres de base marginaux (en termes

de nombre de taxons) (x = 7 et x = 17, le dernier d'origine polyploïde, avec un seul niveau de ploïdie chacun) (Vallès *et al.*, 2011).



**Figure 7 :** Evolution du nombre de chromosomes et du niveau de ploïdie dans le genre *Artemisia*. Niveaux de ploïdie disposés verticalement et nombres de chromosomes basiques horizontalement. Les niveaux de la ploïdie impaire / nombre de chromosomes, exceptionnels dans le genre, sont marqués en rouge. Les tailles des cercles représentent l'abondance relative des différents nombres de chromosomes trouvés dans *Artemisia* (Figure extraite de Vallès *et al.*, 2011)

Le genre *Artemisia* a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques, dont beaucoup à des fins purement chimiques ou appliqués à des axes pharmacologiques. Certaines de ces études ont été consacrées aussi, partiellement ou entièrement, à des fins systématiques (Greger, 1977; Bohm et Stuessy, 2001). Les acétylènes, les coumarines, les flavonoïdes et les terpènes sont les principaux métabolites secondaires présents dans le genre. L'espèce la plus connue du point vue chimique est probablement *Artemisia annua*, en raison de son artémisinine antipaludique; autour de 600 produits naturels ont été identifiés dans ce taxon à ce jour (Brown, 2010; Vallès *et al.*, 2011).

#### I.1.5 Artemisia herba-alba Asso

#### I.1.5.1 Présentation et systématique

Artemisia herba-alba (armoise blanche; Chih, الشيح en arabe, Ifsi ou Zezzaré en berbère), est un sous-arbrisseau (Figure 8) qui se trouve habituellement dans les milieux secs et arides (Ouyahya et Viano, 1988), décrite pour la première fois par le botaniste espagnol Ignacio Jordán Claudio de Asso en 1779 (Aidoud, 1988).

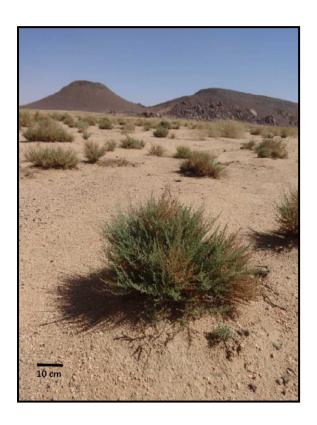


Figure 8: Touffe d'Artemisia herba-alba (Région Tamanrasset; Bougoutaia, 2016)

Sur le plan systématique,  $Artemisia\ herba-alba$  est classée dans le sous-genre Seriphidium Besser. Elle se caractérise par un nombre chromosomique de base x=9 et deux nombre somatiques ; 2n=18 pour le cytotype diploïde, et 2n=36 pour le cytotype tétraploïde (Kawatani et Ohno, 1964; Valdés-Bermejo et Gomez, 1976 ; Ouyahya, 1987 ; Vallès, 1987 ; Ouyahya et Viano 1988 ; Ferchichi, 1997 ; Betina  $et\ al.$ , 2007 ; Bougoutaia  $et\ al.$ , 2014).

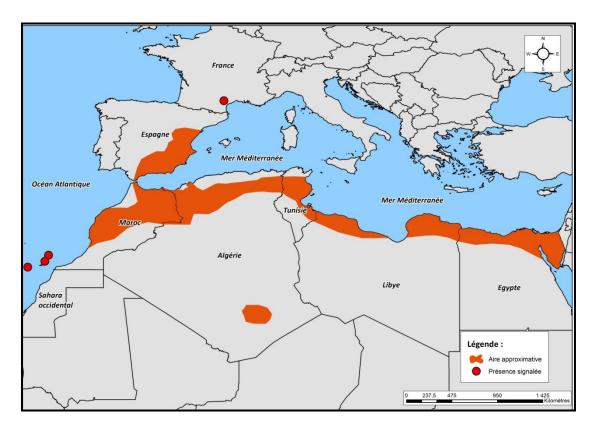
Sur le plan nomenclatural, *Artemisia herba-alba* est le basionyme de *Seriphidium herba-alba* (Asso) Soják (Aidoud *et al.*, 2006 ; Greuter, 2006; Ibn Tattou et Fennane, 2008). Il existe

aussi des synonymes *Artemisia aragonensis* Lam. (Nègre, 1962; Greuter, 2006; Ibn Tattou et Fennane, 2008), *Artemisia inculta* Delile (Le Houerou, 1995).

Plusieurs sous espèces ou variétés ont été décrites en Afrique du nord et en Espagne; *A. herba-alba* var. *oranensis* Deb., rencontrée dans le sud oranais et le nord-est du Maroc (Battandier et Trabut, 1888; Ouyahya, 1987); *A.herba-alba* var. *saharae* Pomel, signalée en Algérie dans les régions de Maia, Metlili, Biskra et Al-Abiod (Battandier et Trabut, 1888; Quézel et Santa, 1963); *A. herba-alba* var. *aurasiaca* Maire, signalée dans la localité de Ghoufi dans les Aurès en Algérie (Maire, 1937 in Ouyahya, 1995); *A. herba-alba* var. *huguetii* Maire au Sud-ouest du Maroc (Ouyahya, 1987; Ibn Tattou et Fennane, 2008); *A. herba-alba* ssp. *valentina* (Lam.) Masclans en Espagne (Vallès, 1987).

### I.1.5.2 Répartition géographique (phytogéographie)

Artemisia herba-alba est une espèce caractéristique des zones arides du bassin méditerranéen (Salido et al., 2004) (Figure 9). Au nord de la Méditerranée elle est relativement abondante dans la Péninsule Ibérique, principalement dans le Centre, l'Est et le Sud-est de l'Espagne (Vallès, 1987) et se raréfie dans le sud de la France (Julve, 2015). En Afrique du Nord, Artemisia herba-alba occupe des immenses étendues dans les zones arides et semi-arides des pays du Maghreb (Algérie, Maroc et Tunisie) et s'étend à l'Est vers la Lybie et l'Égypte (Quézel et Santa, 1963; Ouyahya, 1987; Le Houerou, 1995; Ferchichi, 1997).

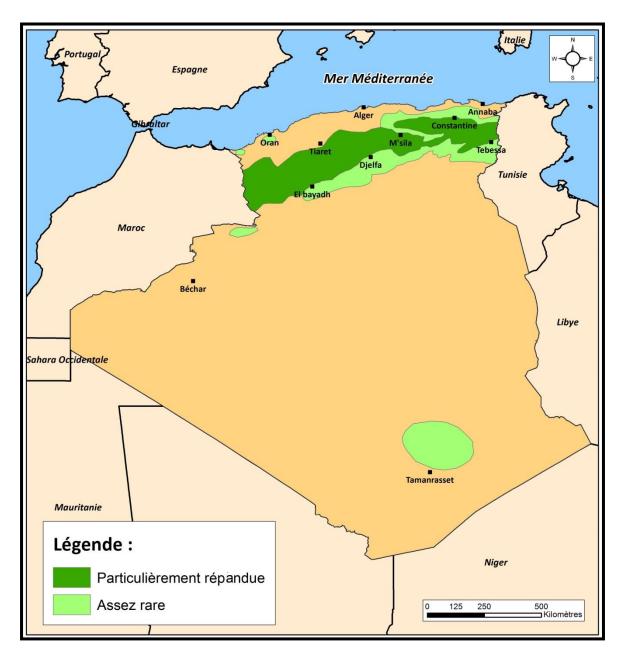


**Figure 9 :** Distribution géographique d'*Artemisia herba-alba* dans le bassin méditerranéen (carte modifiée extraite de Aidoud, 1988)

Cependant, la présence d'Artemisia herba-alba dans les régions du moyen orient (Palestine, Jordanie, Liban, Syrie, Iraq, Péninsule Arabique, Turquie et Iran), l'Asie centrale (Kazakhstan, Ouzbékistan, Kirghizstan, Tadjikistan et Turkménistan) et la Russie a suscité depuis long temps beaucoup de controverses à cause d'une confusion avec d'autres espèce proches, telle Artemisia sieberi Bess. Selon Salari et al. (2014), il existe différents points de vue sur le vrai nom du taxon réparti dans les steppes de l'Asie du Sud-est. Pendant de nombreuses années, les espèces orientales distribuées depuis la Turquie et l'Égypte à l'Ouest jusqu'à en Iran et en Russie à l'Est sont appelées par le même nom (Singh, 2011). L'historique de la systématique de ce taxon dans ces régions montre la complexité de sa taxinomie. Boissier (1875) a regroupé tous les taxons distribués depuis les îles Canaries à l'Ouest jusqu'à l'Afghanistan à l'Est sous le nom Artemisia herba-alba. Il distingua trois variétés pour les steppes irano-touraniennes ; A. herba-alba var. densiflora Boiss., A. herbaalba var. laxiflora Boiss. et A. herba-alba var. tenuiflora Boiss. Il considéra A. sieberi Bess. le synonyme de A. herba-alba var. laxiflora (Rabie et al., 2006; Salari et al., 2014). Poljakov dans la flore de l'URSS (1961) a indiqué que seulement A. sieberi Bess. se trouve d'une manière fiable dans le territoire de l'URSS. Podlech (1986) dans la flore Iranienne a séparé les populations iraniennes (et Sud-Ouest Asiatiques) de *A. herba-alba* et les a nommées *A. sieberi* avec deux sous-espèces: *A. sieberi* ssp. *sieberi* distribuée en Palestine, en Syrie, en Irak, en Afghanistan, au Pakistan, en Asie centrale et en Iran, et *A. sieberi* ssp. *deserticola* Podz. endémique en Afghanistan (Rabie *et al.*, 2006; Salari *et al.*, 2014). Kursat *et al.* (2011), dans une étude de rapprochement entre des taxons récoltés de la Sibérie, du Caucase, de l'Asie centrale et de Kazakhstan et des taxons locaux, ont observé que les spécimens donnés comme *Artemisia herba-alba* dans la flore Turque sont les mêmes que les spécimens des *Artemisia sieberi* ssp. *sieberi*. D'après Podlech (1988) in Ouyahya (1995), les populations d'*Artemisia herba-alba* du Sud de l'Espagne sont différentes de celles de l'Afrique du Nord et de l'Asie mineure. Les plantes de l'Orient appartiennent à *A. sieberi* Bess., celles de l'Afrique du Nord à *Artemisia inculta* Delile, et *Artemisia herba-alba* est circonscrite à la Péninsule Ibérique. De même, Greuter *et al.*, (2009) in Singh (2011), suggèrent que *Artemisia herba-alba* est une espèce endémique de l'Espagne, le Maroc et le Sud de la France dans l'Ouest de la Méditerranée et que l'application du nom *Artemisia herba-alba* aux espèces orientales par certains auteurs est inappropriée.

Pour résoudre un tel problème de synonymie, il serait souhaitable qu'une étude phylogénétique approfondie du complexe *Artemisia herba-alba* basée sur des marqueurs moléculaires soit entreprise dans toute son aire de répartition.

En Algérie, Artemisia herba-alba est distribuée dans les zones steppiques sur une bande longue de 1200 km, allant de la frontière Tunisienne jusqu'à la frontière Marocaine, et constituée des hautes plaines steppiques de l'Ouest et du Centre, de la cuvette du Hodna et des hauts plateaux Constantinois (Figure 10). C'est dans le Sud Oranais où elle est la mieux représentée en formant un paysage végétal très monotone (Djebaili et al., 1995). Ses limites vers le Nord s'étendent jusqu'à la bordure Sud de l'Atlas tellien Orano-Algérois et le secteur de tell Constantinois, et au Sud jusqu'à la région steppique présaharienne (piémonts Sud de l'atlas saharien et plateau saharien Sud). Elle est présente aussi dans le Hoggar à l'extrême Sud Algérien sur des altitudes allant jusqu'à 2000 m. Des stations d'Artemisia herba-alba var. oranensis Deb. ont été signalées par Debeaux dans les sahels littoraux du secteur Oranais (Battandier et Trabaut, 1888; Quézel et Santa, 1963).

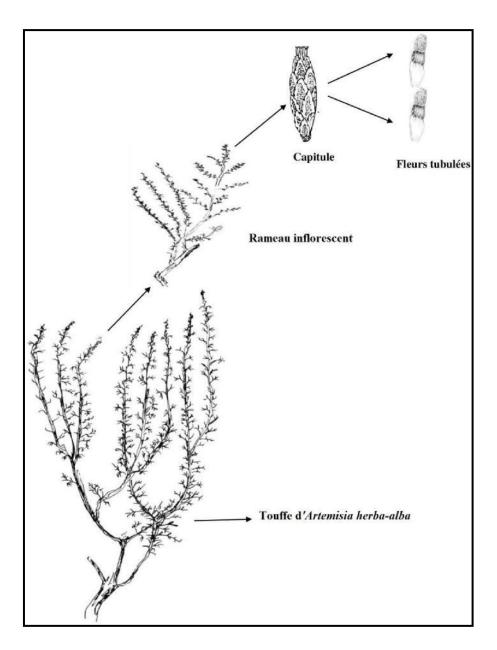


**Figure 10 :** Aire de distribution d'*Artemisia herba-alba* en Algérie (Quézel et Santa, 1963; Aidoud, 1988; Said *et al.*, 2015)

# I.1.5.3 Morphologie

*Artemisia herba-alba* est une chaméphyte herbacée qui se développe en touffes bien individualisées très ramifiée dés la base à tiges ligneuses, pouvant atteindre 80 cm de haut (Figure 11). Les feuilles sont très polymorphes, profondément bipennatiséquées, gris argentées, tomenteuses ; les inférieures sont pétiolées, les caulinaires de plus en plus courtes. Inflorescence en panicule. Capitules petits (3-4 x 1-1,5 mm), ovoïdes, homogames,

pauciflores (2-12 fleurs). Involucre à bractées externes très tomenteuses, petites, orbiculaires, concaves; les internes plus grandes. Fleurs toutes hermaphrodites, à corolle tubuleuse, de couleur jaune ou pourpre, insérées très obliquement sur l'ovaire. Akènes de couleur grisâtre, comprimés, obovales de longueur variable (0,80-1.70 x 0,32- 0,85 mm). (Quézel et Santa, 1963; Botschantzev, 1970; Aidoud, 1988; Ozenda, 1991; Ouyahya, 1995).



**Figure 11 :** Illustration de la morphologie d'*Artemisia herba-alba* (Schéma extrait de Bougoutaia, 2009.)

# I.1.5.4 Écologie

Sur le plan écologique, *Artemisia herba-alba* présente une plasticité relativement grande. Elle se développe dans des bioclimats allant de l'étage semi-aride supérieur à l'étage per - aride (ou saharien) inférieur à pluviométrie moyenne annuelle entre 100 et 600 mm, sur des sols à texture fine, limoneux argileux et limoneux sableux bien drainés. Elle semble indifférente aux altitudes, et supporte le calcaire et des niveaux de salinité modérément élevés (Aidoud, 1988; Ouyahya, 1995). En Algérie, *Artemisia herba-alba* trouve son optimum, en tant qu'espèce dominante, dans l'étage bioclimatique aride et aride frais parfois semi-aride frais avec une pluviosité moyenne de 100 à 300 mm (Djebaili, 1984; Aidoud, 1988). Elle se développe au fond des dayas sur des terres meubles, sablonneuses et limoneuses en association avec l'alfa (*Stipa tenacissima* L.), le sparte (*Lygeum spartum* L.) et *Noaea mucronata* Forssk.

Selon le *Haut Commissariat au Développement de la Steppe* (HCDS), la superficie totale du faciès à armoise blanche en 2001 a été estimée à environ 2 millions d'hectares (soit 10% de la superficie totale des parcours steppiques). Ce faciès a connu une importante régression par rapport à la statistique de 1970 qui enregistrait 3 millions d'hectares (soit une régression de 30%). Le surpâturage, le défrichement et la mise en culture de zones plutôt propices à son développement, accentuent de façon sensible et irrémédiable la régression de son aire de distribution, en provoquant son recul au profil d'autres espèces peu palatables, telles que : *Noaea mucronata*, *Hammada scoparia* Pomel, *Anabasis oropediorium* Maire et *Peganum harmala* L. (Aidoud, 2006; HCDS, 2010).

#### I.1.5.5 Biologie, adaptation et dynamique

L'une des espèces candidates à la reconstitution des écosystèmes pastoraux dégradés en bioclimat méditerranéen est *Artemisia herba-alba*. Ses caractéristiques morphologiques et physiologiques font d'elle une espèce bien adaptée aux conditions climatiques arides (Ferchichi *et al.*, 2004). Les variations phénologiques observées sur l'armoise blanche, montrent une adaptation très poussée de l'espèce vis-à-vis du milieu et en particulier la sècheresse du climat. Le dimorphisme saisonnier de son feuillage lui permet de réduire la surface transpirante et d'éviter ainsi la perte d'eau (Ourcival, 1992 in Ferchichi *et al.*, 2004).

Artemisia herba-alba fleurit en automne, la fructification et la dissémination des graines se poursuivent jusqu'en février. La floraison d'automne constitue également une stratégie d'adaptation permettant aux graines d'échapper à la prédation exercée par divers granivores

durant la période estivale (Aidoud, 1988). Grâce à son système racinaire très dense à la surface, l'armoise blanche est capable de valoriser toute humidité superficielle occasionnée par des petites pluies (Le Floc'h, 1989 in Ferchichi *et al.*, 2004). Elle est également capable d'exploiter l'humidité du sol jusqu'à 50 cm de profondeur (Floret et Pontannier, 1982) et peut profiter des fractures de la croûte, pour atteindre les poches d'humidité, notamment dans les sols à encroûtement calcaire (Ourcival, 1992 in Ferchichi *et al.*, 2004). La division de la touffe en sous individus autonomes pour l'alimentation hydrique, lui permet de supporter la mort d'une partie de la touffe sans que l'individu disparaisse (Ourcival, 1992 in Ferchichi *et al.*, 2004).

Waisel (1972) a démontré que chez cette espèce, le transport de l'eau des racines aux tiges se fait selon un modèle dit d'ascension sectorielle en détour. L'eau prélevée par une racine est véhiculée jusqu'à une tige (et une seule) qui n'est pas forcément au dessus de la racine correspondante. Une autre caractéristique de cette espèce, est son action allélopathique. La plante synthétise du thymol, composé phénolique toxique, pour faire fuir les herbivores (Killian, 1954 in Ayad *et al.*, 2007). Cette action est exercée également, en période de croissance active, par les individus adultes pour empêcher la germination d'autres plantes (Floret et Pontannier, 1982). Sur le plan, phytosociologique et phytodynamique, un grand nombre d'espèces se retrouvent en Algérie steppique en compagnie de l'armoise. Citons parmi elles, *Noaea murconata*, *Poa bulbosa* L. et *Stipa parviflora* Desf. (Aidoud, 1988).

#### I.1.5.6 Intérêt de l'armoise blanche

#### a) Intérêt pastoral des faciès à armoise blanche

En Algérie, les steppes à armoise blanche constituent avec ceux, à alfa, à sparte et à remth (*Arthrophytum scoparium* Pomel), les quatre types de formations végétales dominantes, et sont souvent considérées comme les meilleurs parcours des zones steppiques (Nedjraoui, 2004). Ces steppes tiennent ainsi, une place importante dans l'économie des milieux steppiques, basée principalement sur l'élevage ovin et en moindre degré caprin. L'armoise blanche c'est une espèce parmi les mieux adaptées à la sècheresse et à la pression animale, en particulier ovine. Son feuillage, relativement aqueux, sert de fourrage de base durant toute l'année. D'après Ayad (2008), la production annuelle totale d'une steppe à armoise blanche varie entre 180 et 290 kg/ha, soit une productivité pastorale annuelle entre 120 et 180 UF/ha, avec une valeur énergétique moyenne variable selon le stade phénologique, de 0.30 à 0.63 UF/kg de matière sèche. Selon le même auteur, la composition chimique des feuilles et des

pousses de l'armoise blanche et très riche en protéines (11.46 %), en lipides (16.50 %), et en cellulose (26.73 %).

#### b) Autres utilisations

En plus de sa richesse minérale très élevée, *Artemisia herba-alba* a été utilisée depuis longtemps par les populations de l'Afrique du Nord et du Moyen Orient comme aromatisant du thé et café, et dans la médecine traditionnelle pour traiter les désordres gastriques, ainsi que pour son caractère vermifuge très prisé pour le bétail (Bezza *et al.*, 2010). Ses feuilles sont utilisées en médecine traditionnelle pour leurs activités antispasmodique et emménagogue et pour soigner la bronchite et les abcès (Baba Aissa, 1991; Akrout, 2004). Des études ethnopharmacologiques ont montré l'intérêt de l'armoise blanche contre le diabète, grâce à son activité hypoglycémiante (Jouad *et al.*, 2001; Azzi *et al.*, 2012; Boudjelal *et al.*, 2013). Des études phytochimiques sur les extraits aqueux et les huiles essentielles de l'armoise blanche montrent leurs activités antileishmaniose, antigénotoxique, antidiabétique, antibactérienne, anti fongique, anti-oxydante et antispasmodique (Hatimi *et al.*, 2001; Bakkali *et al.*, 2006; Zouari *et al.*, 2010; Mohamed *et al.*, 2010; Lakehal *et al.*, 2016)

La composition chimique d'Artemisia herba-alba a fait l'objet de plusieurs études phytochimiques dans les pays de l'Afrique du nord et de l'Espagne par intérêt économique, et surtout pour ses huiles essentielles (HE) (Saleh El-Negoumy et Abou-Zaid, 1987; Salido et al., 2004; Dob et Benabdelkader, 2006; Derwich et al., 2009; Haouar et al., 2009; Bezza et al., 2010; Kadri et al., 2011; Janaćković et al., 2015; Dif et al., 2016). Des études similaires ont été faites sur Artemisia herba-alba dans d'autres régions comme la Jordanie (Hudaib et Aburjai, 2006), le Palestine et Sinna (Feuerstein et al., 1986) et l'Iran (Behtari et al., 2012), mais les résultats de ces études doivent être pris sous réserves, car la présence d'Artemisia herba-alba dans ces régions a été mise en doute par certain auteurs comme il a été signalé précédemment.

Trois classes de constituants ont été caractérisées pour *Artemisia herba-alba*: les flavonoïdes (Saleh El-Negoumy et Abou-Zaid, 1987; Jaffer, 2011; Dif et *al*, 2016), les lactones sesquiterpèniques (Baba Aissa, 1991; Messai *et al*, 2008), et les mono- et sesquiterpènes dans les huiles essentielles (Akrout *et al.*, 2004; Salido *et al.*, 2004; Dob et Benabdelkader, 2006; Haouar *et al.*, 2009; Bezza *et al.*, 2010).

La composition chimique des huiles essentielles d'*Artemisia herba-alba* collectée de l'Algérie, le Maroc, la Tunisie, l'Espagne, la Lybie et l'Egypte, présente un polymorphisme chimique élevé (Belhattab *et al.*, 2014). En Algérie, les composés majoritaires identifiés dans *Artemisia herba-alba* sont : le camphre, l'α- et la β-thujones, la chrysanthenone, l'eucalyptol, le trans-pinocarvéol, le 1,8-cinéole, la verbénone, l'acétate de cis-chrysanthényle et des lactones sesquiterpèniques (Dob et Benabdelkader, 2006; Messai *et al.*, 2008; Bezza *et al.*, 2010; Belahattab *et al.*, 2014; Dif *et al.*, 2016; Lakehal *et al.*, 2016).

# I.2 Notions et outils techniques

# I.2.1 Étude du caryotype et cytogénétique classique

# I.2.1.1 Caryotype

Chaque espèce a un complément chromosomique (caryotype) caractéristique, qui représente «l'aspect phénotypique des chromosomes somatiques» (Levitzky, 1931). En effet, le caryotype est le plus haut niveau d'organisation structurelle et fonctionnelle du génome nucléaire. En comparant les chromosomes de différents taxons, on peut en apprendre beaucoup sur les modes et les mécanismes de l'évolution du caryotype et sa signification pour la diversification et la spéciation (Weiss-Schneeweiss et Schneeweiss, 2013).

La constance du caryotype en terme du nombre et de la structure des chromosomes, résulte d'une fiabilité de la réplication chromosomique d'assurer un transfert fidèle du matériel génétique à la génération suivante. Dans d'autre part, la variation du caryotype confère un changement évolutif. Il existe deux grandes catégories de variation du caryotype: numérique (résultant généralement d'un dysfonctionnement méiotique ou mitotique du fuseau) et structurel (résultant généralement d'erreurs de crossing-over). Ces deux grandes classes sont, cependant, interdépendantes et le changement évolutionnaire réel d'un caryotype est généralement complexe, impliquant divers mécanismes (Weiss-Schneeweiss et Schneeweiss, 2013). Les caractéristiques caryotypiques les plus couramment observées sont le nombre de chromosomes, la taille des chromosomes, la longueur des caryotypes haploïdes (ou diploïdes), la symétrie caryotypique et les positions des repères chromosomiques morphologiquement discernables, notamment les constrictions primaires et secondaires. Le caryotype et ses caractéristiques peuvent être représentés schématiquement par un idiogramme ou un caryogramme.

La symétrie est une notion très importante au sein d'un caryotype, elle renseigne sur l'origine du génome (ancestral ou évolué). Levitzky (1931) fut le premier à avoir utilisé la notion d'asymétrie dans la description du caryotype, il considéra que les caryotypes symétriques sont les plus primitifs en comparaison avec les caryotypes asymétriques. Stebbins (1971) adopte et développe le même concept sur un grand nombre d'espèces. Dès lors, ce concept est admis par la littérature, pour l'évolution morphologique des chromosomes chez les plantes. Un caryotype symétrique présente des chromosomes approximativement de la même taille et de type méta ou submétacentrique, ce qui lui donne un aspect homogène. Un caryotype asymétrique possède des

chromosomes de tailles différentes et de type sub-télocentrique, télocentrique ou acrocentrique (Siljak-Yakovlev, 1986).

### I.2.1.2 Cytogénétique classique

La cytogénétique fait le lien entre la cytologie et la génétique. Les premiers travaux chez les végétaux ont débuté au cours de la seconde moitié du 19ème siècle, mais c'est surtout à partir de 1920 que la cytogénétique s'est développée et son importance n'a cessé de croître par la suite (Jahier, 1992).

La technique classique de Feulgen permet de construire un caryotype pour chaque espèce. L'étude des caryotypes se fait généralement en métaphase mitotique où les chromosomes sont bien individualisés et présentent la meilleure morphologie. A ce stade on peut les dénombrer, mesurer leur taille et observer leur morphologie, localiser les constrictions primaires (centromères) ou secondaire (organisateur nucléolaire). Les variations du nombre chromosomique, les chromosomes surnuméraires ou chromosomes B sont ensuite identifiées par l'analyse du caryotype (Abdeddaim, 2010). Un caryotype est souvent représenté par une plaque métaphasique issue d'une prise de vue microscopique, un caryogramme et un idiogramme. Le caryogramme qui consiste, à partir d'une photographie d'une cellule en métaphase, à arranger les chromosomes homologues, par ordre décroissant de longueur. L'idiogramme est la représentation idéale des chromosomes selon un diagramme établi à partir des mesures statistiques d'au moins 5 plaques métaphasiques. Il est le plus souvent haploïde. Dans le cas où il existe une homéologie (non homologie) entre les chromosomes d'une paire, il est souhaitable de présenter un idiogramme diploïde (Goudjil-Benhizia, 2014). Différentes méthodes ont été employées pour localiser le centromère, ce qui a engendré l'apparition de diverses nomenclatures de morphologie chromosomique. Parmi ces nomenclatures, celle de Levan et al. (1964) reste la plus consensuelle.

## I.2.2 Quantité d'ADN nucléaire et cytométrie en flux

### I.2.2.1 Quantité d'ADN nucléaire

La taille du génome d'un organisme est nommée « valeur C ». Cette dernière représente la quantité d'DN nucléaire en picogrammes présente dans le noyau des gamètes à l'état non répliqué, quel que soit le niveau de ploïdie du taxon (Swift, 1950 ; Greilhuber *et al.*, 2005). La valeur C est directement convertible en nombre de paires de bases puisque 1 pg = 978 Mpb

(Doležel *et al.*, 2003). Le terme «taille du génome monoploïde» (1Cx) désigne la teneur en ADN dans un ensemble de chromosomes basiques (x) d'une cellule somatique, alors que le terme « taille du génome holoploïde » désigne la taille du génome entier d'une cellule somatique (2C) quel que soit le degré de polyploïdie générative (Greilhuber *et al.*, 2005). Dans les organismes non polyploïdes, la valeur C et la valeur Cx sont les mêmes alors que chez les polyploïdes, la valeur Cx est calculée en divisant la valeur C de l'holoploïde par le niveau de ploïdie (Leitch et Leitch, 2013).

La première valeur C estimée pour quelques plantes a été faite dans les années 1950 en utilisant des méthodes d'extraction chimique fastidieuses. Le développement ultérieur d'autres techniques, y compris la microdensitométrie de Feulgen, la cytométrie en flux et la cytométrie de l'image de l'ADN, ont permis une estimation de l'ADN à la fois plus facile et plus rapide, de sorte que les données de la valeur C soient désormais disponibles pour plus de 8500 espèces de plantes (Bennett et Leitch, 2012; Abdel-Samad, 2016).

La teneur en ADN nucléaire, est très variable entre les plantes à fleurs, et a été révélée comme un caractère important de la biodiversité (Pellicer *et al.*, 2010b). Des différences de plus de 1200 fois ont été signalées entre des espèces. Les plus faibles valeurs rapportées sont pour *Genlisea margaretae* Hutch. et *Genlisea aurea* A.St-Hil. (2C = 0,128 - 0,130 pg; Greilhuber *et al.*, 2006) ; et les plus grandes pour *Paris japonica* Franch.& Cav (2C = 304,46 pg; Pellicer *et al.*, 2010c). Malgré cette grande variation, la plupart des angiospermes ont « de petites valeurs » de 2C, comprises entre 0,2 et 7 pg suivant la classification établie par Leitch *et al.* (1998). Selon les données actuelles disponibles, seule la teneur en ADN d'environ 4 à 5% des angiospermes est connue (Garcia, 2007), et par conséquent, la plage réelle de variation est incertaine. Heureusement, plusieurs bases de données rassemblent les informations disponibles sur la quantité d'ADN dans les plantes, ce qui facilite les études comparatives (par exemple : Loureiro *et al.*, 2008; Bennett et Leitch, 2012 ; Garcia *et al.*, 2014).

L'étude de la taille du génome a des applications dans de nombreux domaines, à savoir l'écologie, l'évolution et la systématique (Bennett et Leitch 2005a, b). Les relations entre la taille du génome et les caractéristiques écologiques et biologiques ont mis en lumière les effets évolutifs importants des variations de la taille du génome (Pellicer *et al.*, 2010b). En effet, de plus en plus, les données sont utilisées pour les analyses comparatives entre la taille du génome et certains paramètres tels que la forme de la croissance des plantes et de la distribution, la relation entre la taille du génome et les chromosomes B, la taille et la masse des semences, la durée du cycle cellulaire, la taille des cellules, de la feuille et la densité

stomatique, les modèles d'envahissement (Levin *et al.* 2005; Ohri, 2005; Beaulieu *et al.*, 2007; Beaulieu *et al.*, 2008; Francis *et al.*, 2008; Kubešová *et al.* 2010).

#### I.2.2.2 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) a été initialement utilisée dans la recherche biomédicale pour détecter l'aneuploïdie (Kawara et al., 1999), l'apoptose (Vermes et al., 2000) et surveiller la cinétique du cycle cellulaire et ses perturbations (Rabinovitch, 1994). Plus tard, elle est devenue très populaire dans l'estimation de la taille du génome dans les noyaux des cellules, avec différents domaines d'applications telles que l'examen de la ploïdie, la détection de la mixoploïdie et de l'aneuploïdie, l'analyse du cycle cellulaire, l'évaluation du degré de polysomatose et l'estimation de la quantité l'ADN absolue ou la taille du génome (Doležel et Bartoš, 2005). L'estimation de la taille du génome par cytométrie en flux, en combinaison avec le comptage des chromosomes, ont été utilisés dans l'étude des mécanismes évolutifs qui surviennent dans des populations d'une même espèce ou entre plusieurs espèces (Ramirez-Morillo et Brown, 2001; Dart et al., 2004).

Bien que le premier document sur l'analyse des noyaux de plantes en utilisant la CMF a été publié en 1973 (Heller, 1973 *in* Doležel et Bartoš, 2005), la percée dans l'analyse de l'ADN de plantes par CMF est venue à la fin des années 1980, avec le travail de Galbraith *et al.* (1983) qui a marqué le début réel de la cytométrie en flux d'ADN dans les plantes (Doležel et Bartoš, 2005).

Le principe de base de cette technique est de mesurer la fluorescence associée à chaque noyau après extraction et traitement par un fluorochrome se fixant de manière stœchiométrique sur l'ADN. L'intensité de fluorescence est utilisée comme mesure de l'ADN. La mesure en flux associe ce principe à celui du défilement, un par un, des noyaux cellulaires en suspension à la cadence de centaines ou de milliers de particules par seconde devant un système optique. Ce système optique comprend une source lumineuse et des détecteurs de lumière, qui permettent de quantifier la fluorescence émise par les noyaux. Un microprocesseur gère l'ensemble, convertit les signaux électroniques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques. Les résultats sont exprimés sous la forme d'un histogramme de l'ADN nucléaire. L'interprétation s'appuie sur la position des pics de fluorescence par rapport à une référence connue et stable, et la finesse de ces pics est exprimés par son coefficient de variation (CV) (Brown *et al.*, 1991 *in* Blanchet *et al.*, 1992).

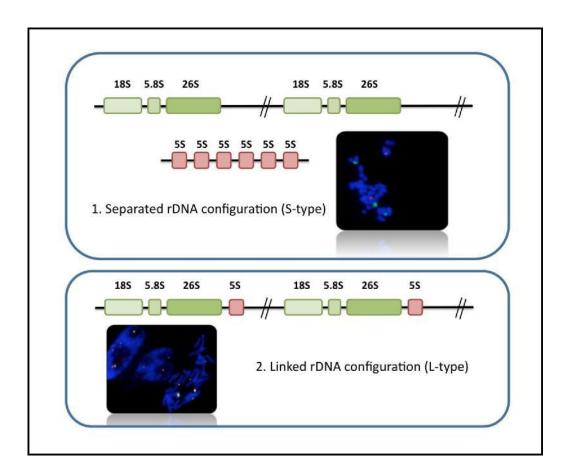
En supposant que la population 2C est homogène en ADN, le CV de ce pic dominant est révélateur de la qualité de la mesure, plus il est faible meilleure est la préparation. La surface des pics, c'est-à-dire le nombre de noyaux, est de peu d'importance pour cette analyse. Des pics mineurs sont évidents sur les figures. Ils correspondent aux noyaux 4C de chaque espèce (Blanchet *et al.*, 1992).

#### I.2.3 Gènes ribosomiques et la technique de l'hybridation in situ fluorescente (FISH)

## I.2.3.1 Gènes ribosomiques

Deux types d'ADNr sont présents chez les eucaryotes, à savoir l'ADNr 35S (chez les plantes, Seitz et Seitz, 1979) et 45S (chez les animaux) codant pour les gènes ARNr 18S-5.8S-26S qui contrôlent la formation des nucléoles, et l'ADNr 5S codant pour l'ARNr 5S dont la fonction n'est bien connue (Goudjil-Benhizia, 2014). Typiquement, ces gènes se présentent sous la forme d'unités répétitives agencées en tandem, dont le nombre de copies varie considérablement d'une espèce à l'autre, de quelques centaines à plusieurs centaines, voire milliers de copie. Chez la plupart des plantes et des animaux, les gènes de l'ARNr 18S-5.8S-26S sont physiquement séparés des gènes de l'ARNr 5S (arrangement séparé ou de type S, Figure 12, 1). Plus rarement, ils sont liés dans la même unité, ce que l'on appelle un arrangement lié ou de type L (Figure 12, 2) (Garcia *et al.*, 2017).

Le nombre, la position et la structure des unités d'ADNr 5S et 18S-5.8S-26S dans les chromosomes peuvent être caractéristiques d'une espèce ou d'un genre donné et utilisés à des fins comparatives, notamment dans la science des plantes, l'amélioration des plantes, la biologie de l'évolution, la systématique, etc (Garcia *et al.*, 2012a).



**Figure 12 :** Les deux configurations de l'ADNr 18S-5.8S-26S et 5S ; **1**) configuration séparée ou de type S et **2**) configuration liée ou de type L (figure extraite de Garcia *et al.*, 2012a).

Le nombre et la localisation des gènes ribosomiques sont détectés par la technique d'hybridation *in situ* (FISH).

# **I.2.3.2** Technique d'hybridation *in situ* fluorescente (FISH)

La cytogénétique moléculaire est une nouvelle approche morphologique qui utilise à la fois les outils de la biologie moléculaire et de la cytogénétique. La principale technique utilisée actuellement est l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH, de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*) qui consiste en l'hybridation de sondes froides d'ADN sur des lames de préparations cytogénétiques de cellules métaphasiques ou interphasiques et sa révélation par fluorescence (Abdelmoula *et al.*, 2000).

Les premières techniques d'hybridation *in situ* sur chromosomes datent de 1969 lorsque Gall et Pardue ont utilisé un ARN ribosomique radioactif pour détecter la présence de gènes d'ADN ribosomique sur des chromosomes d'amphibiens (Gall et Pardue, 1969). Mais le

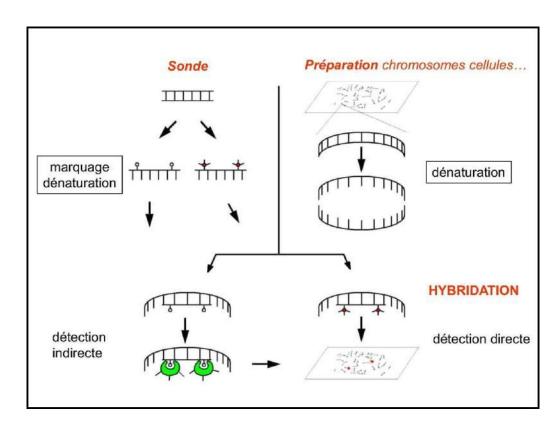
véritable essor de la technique de cytogénétique moléculaire date des années 1986-1988 avec l'utilisation de sondes dites froides non radioactives et le développement de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Pinkel *et al.*, 1986 ; Pinkel *et al.*, 1986).

Les sondes utilisées dans la FISH sont des fragments d'ADN simple brin, marqués par fluorescence. Il existe principalement deux méthodes de marquage ; indirect et direct (Figure 13), selon les quelles deux types de sondes sont utilisées :

Dans le premier cas (marquage indirect), deux molécules sont principalement utilisées: la biotine et la digoxygénine. Dans les deux cas, chacune des molécules sert d'haptène au cours d'une réaction immunochimique, avec utilisation d'anticorps couplés à des fluorochromes révélant la présence de la sonde. Ce système offre, en outre, la possibilité d'amplifier le signal. La détection est dite indirecte, très sensible, elle visualise des séquences de 1 à 5 kb. (Pinkel et al., 1986). Au cours de la détection, les conditions sont optimisées pour réduire l'hybridation aspécifique des anticorps sur la lame entraînant parfois un bruit de fond et donc une interprétation délicate.

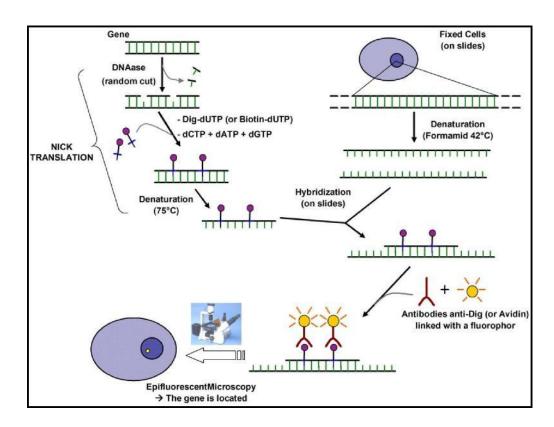
Dans le deuxième cas (marquage direct); méthode utilisée dans ce travail, le procédé consiste à incorporer directement des nucléotides modifiés par des fluorochromes dans la sonde (Wiegant *et al.*, 1992). Une visualisation directe de la sonde est alors possible. Le système ne présente donc aucun bruit de fond lié à l'utilisation d'anticorps. Cependant, ce procédé est limité par une perte de sensibilité. La fluorescence est indétectable en deçà d'un certain seuil. Ceci limite à 50 à 100 kb la taille minimale de la sonde visualisable par ce procédé direct (Sloan-Bena, 1998).

Plusieurs techniques sont utilisées pour la création des sondes, parmi les quelles la Nick Translation (méthode principale), random-priming et la PCR



**Figure 13 :** Principe d'hybridation fluorescente *in situ* et méthodes de marquage des sondes (directe et indirecte) (figure extraite de Lefebvre, 2011)

La technique de l'hybridation *in situ* fluorescente comporte trois étapes (Figure 14). La première consiste en une dénaturation de l'ADN de la cible chromosomique et de l'ADN de la sonde si cette dernière est sous forme double brin. La sonde est ensuite hybridée sur l'ADN cible. La troisième étape correspond à la révélation de l'hybridation qui peut être directe ou indirecte et à la contre-coloration du support, c'est-à-dire les chromosomes ou les noyaux interphasiques. La sonde hybridée avec la cible est révélée par un signal fluorescent (Abdelmoula *et al.*, 2000).



**Figure 14 :** Principe d'hybridation *in situ* fluorescente. Obtention d'une sonde marquée par Nick Translation, hybridation in situ avec l'ADN dénaturé puis traitement avec des anticorps fluorescents pour localiser le gène d'intérêt au microscope à épifluorescence (figure extraite de Garcia *et al.*, 2012a).

Les domaines d'application de la technique de FISH sont multiples. Chez les plantes elle est utilisée pour : l'analyses du caryotype et de ses anomalies, l'analyse de la structure et de l'évolution du génome, l'étude de l'expression des gènes et la localisation des séquences introduites chez les plantes transformées (Abdeddaim, 2010).

# I.2.4 Diversité génétique, phylogénie et phylogéographie

La diversité génétique est la variation qui existe au niveau des gènes d'un individu, d'une population, d'une espèce ou d'une communauté. En d'autres termes, la diversité génétique est définie par le niveau de similarité ou de différence dans la composition génétique des individus, des populations et des espèces. Elle peut donc se mesurer à différents niveaux : de l'individu à la communauté (Duminil, 2006). Plus la diversité est grande dans un groupe d'individus (sous-population, population, espèce), plus il sera facile pour certains individus de s'adapter à de nouvelles conditions environnementales. En plus de la grande adaptabilité qu'elle permet aux individus, elle contribue à une diminution du risque de leur extinction par une réduction de la dépression de consanguinité (Montaigne, 2011).

Au sein d'une espèce, la diversité génétique présente généralement une variation géographique. Les espèces sont souvent subdivisées en populations dont les fréquences alléliques et génotypiques divergent d'une région à l'autre (Duminil, 2006).

# I.2.4.1 Forces influant sur la structure de la diversité génétique

Dans une population donnée, quatre forces évolutives pouvant interagir les unes avec les autres : les mutations et les recombinaisons, la dérive génétique, la migration et la sélection naturelle. Elles sont à l'origine de la structure de la diversité génétique et de son évolution.

#### I.2.4.1.1 Mutations et recombinaisons

Les mutations et les recombinaisons sont les principales sources de variation au sein des populations et des espèces végétales (Judd et al., 2002). Une mutation est une modification accidentelle ou provoquée dans la séquence d'ADN d'un gène. La mutation est particulièrement importante, car c'est la principale source de changement au cours de l'évolution. Elle peut survenir spontanément au cours de la réplication de l'ADN, mais peut aussi être dues à la suite d'une exposition à des radiations ou à des substances chimiques dans l'environnement. Les nouveaux allèles produits par mutations fournissent le matériau de base pour un second niveau de variation, produit par la recombinaison (Griffiths et al., 2010). Cette dernière est le processus qui entraîne un brassage de matériel génétique intra- ou interchromosomique et dont la conséquence est la création de nouvelles combinaisons alléliques, c'est-à-dire d'haplotypes. La diversité génétique générée par les mutations et les recombinaisons peut être de différentes classes. Au niveau chromosomique, elle affecte soit la structure d'un ou de plusieurs chromosomes par délétion, duplication, translocation, inversion, etc., on parle alors de remaniement chromosomique, soit le nombre des chromosomes par aneuploïdie ou polyploïdie, soit à la fois leur structure et leur nombre par fission ou fusion. Au niveau du gène, une mutation dite ponctuelle peut donner lieu à l'apparition de différents types de polymorphismes de séquences d'ADN par les substitutions de bases et les insertions, ou délétions de bases (mutations indel). D'autre part, les mutations affectant les régions noncodantes peuvent aussi avoir un impact évolutif (Wang et al., 1999).

### I.2.4.1.2 La dérive génétique

La limitation de l'effectif d'une population conduit au phénomène de « dérive génétique » (Serre, 2006); ceci est un changement aléatoire des fréquences alléliques au cours des générations dans une population de taille finie, qui peut conduire à l'extinction ou au contraire à la fixation d'un allèle dans la population (Wright, 1931). Contrairement aux mutations, la dérive génétique aura tendance à réduire la diversité génétique de la population et son polymorphisme génétique par la perte, pour certains gènes, de tous les allèles sauf un, celui qui est fixé (Serre, 2006). Des études ont montré que lorsque les niveaux de flux de gènes dans une population sont faibles, la dérive génétique pourrait devenir le facteur prédominant dans la structure génétique de la population. Cela aboutit généralement à une homogénéité intra-populationnelle et entraîne en même temps une différenciation entre les populations (Reisch *et al.*, 2005).

#### I.2.4.1.3 La migration

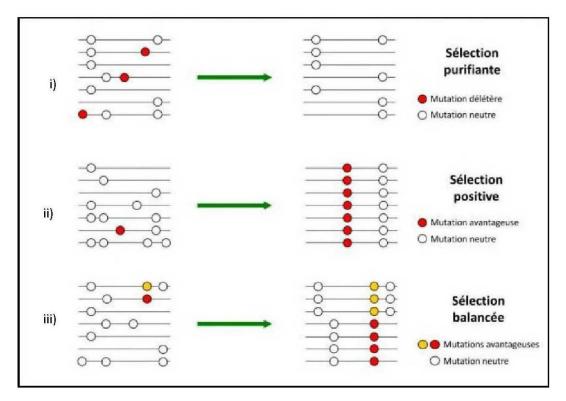
La migration est un échange d'individus et donc de gènes entre populations (Grivet, 2002). Ces échanges sont aussi appelés flux génique. Le système de dispersion du pollen et des graines est bien évidemment directement lié à ce processus (Hamrick *et al.*, 1993). Les flux géniques sont le résultat de la contribution génétique d'une population migrante sur la future génération de la population « puits ». Ils ont pour effet l'augmentation de la richesse allélique pour les populations qui reçoivent ces migrants. A long terme, lorsque les flux de gènes sont réciproques d'une population à une autre, les fréquences alléliques entre populations s'homogénéisent, induisant une réduction de la différenciation génétique entre les populations (Montaigne, 2011).

#### I.2.4.1.4 La sélection naturelle

La sélection naturelle est le processus par lequel un individu (une molécule) bénéficie d'un succès reproductif différentiel dû aux interactions entre les qualités intrinsèques de son génotype (de sa structure) et son environnement (Grivet, 2002). En effet, la fréquence d'un allèle peut croître ou diminuer en raison de la sélection naturelle du génotype ayant une probabilité supérieure de survie et de reproduction (Griffiths *et al.*, 2010). An niveau intrapopulationnel, trois types de sélection naturelle sont définis, qui engendrent différentes

signatures moléculaires (Montaigne, 2011): la sélection purifiante, la sélection positive et la sélection balancée (Figure 15) :

- i) La sélection purifiante (ou négative) élimine les allèles délétères.
- ii) La sélection positive entraine l'augmentation en fréquence des allèles qui confèrent un avantage sélectif.
- iii) La sélection balancée se réfère à un certain nombre de processus sélectifs par lesquels plusieurs allèles sont activement maintenus dans le pool de gènes d'une population à des fréquences plus grandes que prévu de la dérive génétique seule (King *et al.*, 2006).



**Figure 15 :** Différentes formes de sélection au niveau moléculaire au sein d'une population, d'après Audigeos (2010). i) la sélection purifiante (stabilisatrice ou négative) élimine rapidement les mutations défavorables. ii) la sélection positive (ou directionnelle) fixe rapidement les mutations favorable. iii) la sélection balancée maintient plusieurs mutations bénéfiques en fréquence intermédiaire.

Au niveau inter-populationnel, on fait référence à la sélection divergente. Celle-ci se produit lorsque différents environnements favorisent différents phénotypes, ce qui entraîne des différences accrues entre les populations (Bolnick *et al.*, 2017). Il en résulte l'accumulation de fort niveau de différenciation génétique au niveau des *loci* soumis à sélection divergente (Montaigne, 2011).

### I.2.4.2 Facteurs influençant la structure de la diversité

La structure génétique résultant de ces quatre forces évolutives, doit fonctionner dans un contexte historique et biologique de chaque espèce végétale (Loveless et Hamrick, 1984). En effet, tout facteur intervenant sur l'une de ces forces peut affecter la diversité génétique de la population et sa structuration. Plusieurs types de facteurs qu'ils soient d'ordres biologique, historique ou anthropique sont à prendre en considération lorsque l'on s'intéresse à la dynamique de la diversité.

### Les facteurs biologiques et écologiques

Les facteurs biologiques et écologiques affectant la diversité génétique au sein et entre les populations peuvent être résumés en : le système de reproduction (allogame, autogame). Les espèces autofécondées sont susceptibles de présenter un plus faible niveau de diversité génétique intra-population que les espèces à fécondation croisée, et dans une espèce autofécondée, chaque population tend à être plus différenciée des autres (Hamrick et Godt, 1990). Ceci est probablement dû au fait que le flux de gènes via le pollen est plus limité chez les espèces autofécondées que chez les congénères allogames (Maki et al., 1999); la morphologie florale (hermaphrodite, monoïque, dioïque). Les plantes dioïques présentent un niveau de dispersion du pollen plus efficace et par conséquent un flux de gènes plus élevé (Hamrick et Godt, 1996), le mode pollinisation (entomophile, anémophile). La pollinisation anémophile est plus efficace, le système dispersion des gènes par graines et par pollen (espèces anémochores, zoochores, anémophiles, entomophiles (Loveless et Hamrick, 1984; Hamrick et Godt, 1996)). Parmi les facteurs intervenant sur la dispersion des graines et du pollen, nous pouvons citer ceux liés à la structure de l'entité de dispersion et ceux liés au mode de dispersion des propagules (distance de dissémination). En outre, la fragmentation de l'habitat (isolement des habitats, changements topographiques, activité humaine, à long terme, les oscillations climatiques à grande échelle) devraient réduire la diversité génétique et augmenter la divergence génétique inter-populations en limitant le flux génétique entre les populations fragmentées, en augmentant la consanguinité et en augmentant la dérive génétique aléatoire au sein des populations (Aguilar et al., 2008), la longévité ou cycle biologique (annuelle, pérenne...) qui peut avoir un impact sur la diversité. Dans les annuelles, le temps de génération court favorise la dérive génétique par unité de temps (Austerlitz et al., 2000) ; la taille de l'aire de répartition. La diversité génétique devrait diminuer dans les petites populations isolées en raison des goulots d'étranglement, des effets de fond, de la consanguinité et de la dérive génétique (Lammi *et al.*, 1999).

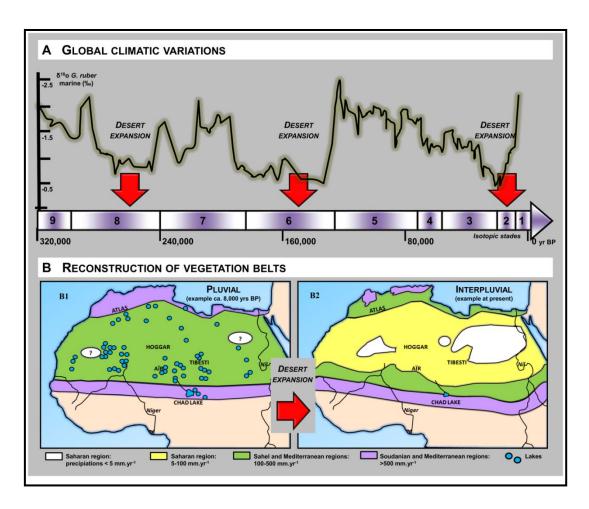
# Les facteurs historiques

Au cours de l'ère Quaternaire, les formations végétales ont été confrontées à des modifications climatiques périodiques de grande amplitude. Au total, plus de 17 alternances de périodes glaciaires et interglaciaires se sont succédées depuis le début du Quaternaire, caractérisées par des variations considérables de température (Kramer, 2000). La dernière glaciation a atteint son apogée il y a 18 000 ans et, à cette époque, le climat des régions non couvertes par les glaciers se caractérisait par des conditions très fraîches et sèches (Birks, 1991 in Kramer, 2000). Au cours des cycles glaciaires, on assiste à un recul des végétaux au fur et à mesure que s'étend la calotte glaciaire, puis une recolonisation des zones libérées des glaces pendant les phases de réchauffement (Lévêque, 2017). Beaucoup d'espèces ont par exemple connu une forte réduction de la taille de leurs aires de distribution et par conséquent de leurs effectifs lors des dernières glaciations du Quaternaire, suivie d'une augmentation au cours de la recolonisation lors des périodes de réchauffement (Hewitt, 1999). Ces variations démographiques ont eu des conséquences sur les flux de gènes historiques de ces populations végétales et pourraient donc avoir une influence persistante sur la structuration génétique. (Duminil, 2006). La diversité actuelle dépend du nombre, de la taille, de la localisation de ces refuges, des chemins de migration suivis, et de la vitesse de migration des populations (Grivet, 2002).

Dans le bassin méditerranéen, certains évènements paléogéographiques importants, tels que la rupture de la plaque tectonique Tyrrhénienne de la Péninsule Ibérique à la fin de l'Oligocène (environ 30 Ma) (Magri *et al.*, 2007), et la crise de salinité Messinienne, induite par la dessiccation de la mer Méditerranée en raison de la fermeture du détroit de Gibraltar entre 5,96 et 5,33 Ma (CIESM, 2008 *in* Migliore, 2012), ainsi que les oscillations climatiques au Quaternaire, ont fortement affecté la diversité génétique et les modèles actuels de la structure génétique des taxons végétaux méditerranéens (Fady et Conord, 2010)

La région du Sahara, qui nous concerne en partie dans cette étude a été confronté à plusieurs évènements géologiques important. Depuis l'apparition des conditions désertiques dans le Sahara au moins 7-10 Ma B.P. à la fin du Pliocène (Swezey, 2009), la région a été soumise à une série de périodes humides et arides fortement contrastées, appelées «pluviales» et «inter pluviales» (Rognon, 1980; Maley, 2010) (Figure 16, A). Pendant les phases humides, le

Sahara était une mosaïque de savanes, de méga lacs et de zones humides regorgeant d'animaux sauvages de toutes sortes (Figure 16, B1). Mais après la période humide Africaine du début de l'Holocène, à partir de 5,5 ka B.P., un processus de désertification a conduit à la disparition du «Sahara vert» et de son dense réseau hydrologique et lacustre (Figure 16, B2) (De Menocal *et al.*, 2000). Les principaux effets de l'évènement de désertification le plus récent au Sahara sont supposés avoir été la grande contraction des aires de répartition des espèces et la fragmentation associée des populations, constituant un grand défi pour la survie et la régénération des espèces (Migliore *et a.*, 2013).



**Figure 16 :** Oscillations climatiques dans le Sahara. Oscillations climatiques globales (A) en relation avec les modèles de distribution des ceintures végétales (B) (figure modifiée extraite de Migliore *et al.*, 2013)

# Facteurs anthropiques, cas de la flore pastorale de l'Afrique du Nord

La distribution de la plupart des espèces a été altérée par les activités humaines de manière directe (perte ou altération de leur habitat), ou indirecte (récents changements climatiques et atmosphériques : augmentation de la concentration en gaz à effet de serre, de la température, des précipitations). Ces diverses activités affectent la physiologie, la distribution et la phénologie des espèces, pouvant mener à l'extension ou à l'extinction de certaines populations, l'invasion de sites où les populations locales sont en déclin, ou encore le découplage d'interactions végétaux/pollinisateurs (Grivet, 2002).

La flore pastorale de l'Afrique du Nord, importante par sa diversité spécifique et infraspécifique, est typiquement méditerranéenne avec un élément Ibéro-maghrébin très développé (Abdelkefi *et al.*, 2004).

L'accélération de la destruction des meilleures terres de parcours, au profit de la céréaliculture et de l'arboriculture fruitière, a conduit à un rétrécissement progressif de ces parcours. L'éradication de nombreuses ligneuses et le surpâturage abusif consécutif à l'abandon de certaines traditions pastorales (rotation des parcours, maintien d'une charge convenable à l'hectare,...), ont généré des transformations profondes dans les potentialités et la physionomie des parcours. Une forte structuration des populations et un faible flux de gènes entre elles sont souvent observés. Ces deux phénomènes témoignent d'une isolation récente des populations (pas souvent liée à leur éloignement géographique) sous l'influence des pressions anthropiques qui ont conduit à la réduction de la taille et du nombre des populations. Une homozygotie, fruit d'une dérive génétique, est également observée. Ce phénomène risque de conduire progressivement à l'extinction des populations si les activités humaines continuent à détruire le milieu (Abdelkefi *et al.*, 2004).

# I.2.4.3 Estimation de la diversité génétique

Au sein d'une espèce, la diversité génétique présente généralement une variation géographique (Duminil, 2006). Les espèces sont souvent subdivisées en populations dont les fréquences alléliques et génotypiques divergent d'une région à l'autre. La structuration génétique au sein d'un ensemble de populations a d'abord été décrite par les statistiques F de Wright (1965) au niveau allélique. Elle a été généralisée au niveau d'un locus puis d'un ensemble de *loci* par Nei (1973 et 1977), en proposant des indices basés sur la fréquence des allèles qui décrivent le niveau et l'organisation de la diversité au sein des populations d'une espèce.

Ces indices décrivent la diversité totale (Ht), la diversité moyenne intra-population (Hs) et la différenciation entre les populations (Gst).

Le coefficient de différenciation génétique entre populations *Gst* est défini de la manière suivante au niveau d'un locus :

$$Gst = (Ht-Hs)/Ht$$

Où *Hs* est la moyenne (sur toutes les populations) des diversités génétiques intra-populations; *Ht* est la diversité génétique sur l'ensemble des populations considérées comme une population unique (diversité totale). Lorsqu'il s'agit de plusieurs *loci*, *Hs* et *Ht* deviennent les moyennes (sur l'ensemble des *loci*) des diversités intra-population et totale.

Ces divers paramètres permettent de caractériser la diversité au sein et entre les populations, mais ne renseignent pas sur son organisation spatiale. En revanche, des méthodes comme le test de Mantel (1967), permettent de tester l'association entre la distance génétique et la distance géographique en randomisant les échantillons. Cependant, le facteur spatial ne suffit pas à lui seul à décrire la diversité des populations. Il permet de décrire la structuration actuelle des populations, mais non les évènements ayant mené à leur mise en place. L'analyse de la composante temporelle est essentielle, car la structuration actuelle des populations résulte d'évènements passés (Grivet, 2002).

#### I.2.4.4 Phylogénie et phylogéographie

## I.2.4.4.1 La phylogénie

Les phylogénies intraspécifiques permettent de lier dans le temps les haplotypes entre eux, et ainsi d'appréhender leur histoire. La combinaison des approches spatiales et temporelles permet d'interpréter de manière plus complète la structuration observée de la diversité. Les progrès récents de la théorie de la génétique des populations, en particulier la théorie de la coalescence, ont généré des outils puissants pour l'analyse des données intraspécifiques (Grivet, 2002). La théorie de la coalescence décrit le processus généalogique de tous les allèles d'un gène donné de tous les individus d'une population, jusqu'à une seule copie ancestrale, appelée ancêtre commun le plus récent (Hudson, 1990).

### I.2.4.4.2 La phylogéographie

La notion de phylogéographie, développée par Avise en 1987, consiste à étudier les relations entre la phylogénie de variants (déterminés à l'aide de marqueurs moléculaires) et leur distribution géographique. Son objectif est l'élucidation des principes et des processus gouvernant la distribution des populations et des espèces (Avise 2000). L'analyse phylogéographique repose sur l'interprétation de modèles de congruence ou de manque de congruence entre la distribution géographique des haplotypes et leurs relations généalogiques (Schaal *et al.*, 1998). Avec l'aide de marqueurs moléculaires et de modèles théoriques, la phylogéographie permet d'obtenir de meilleures descriptions des distributions géographiques d'espèces ou de groupes d'espèces. Elle permet de vérifier si les populations les plus proches géographiquement le sont aussi phylogénétiquement, c'est-à-dire l'existence d'une structuration phylogéographique et non simplement géographique (Grivet, 2002).

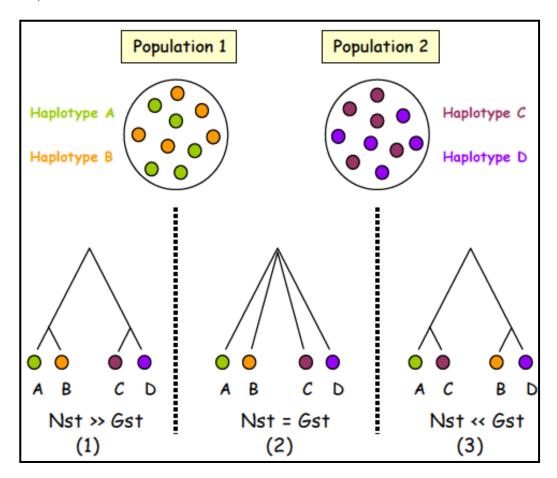
Afin de mettre en évidence l'existence d'une structure phylogéographique, Pons et Petit (1996), à la suite de Hudson *et al.* (1992) et Nei et Li (1979), ont introduit une méthode de mesure de la structure phylogéographique. La méthode consiste à comparer le coefficient de différenciation entre populations (*Gst*) et celui obtenu en prenant en compte la similarité entre les haplotypes *Nst* (Lynch et Crease, 1990), avec :

$$Nst = (Vt-Vs)/Vt$$

Où Vt et Vs sont les analogues de Ht et Hs dans le calcule de Gst.

Lorsque les différents haplotypes rencontrés dans une même population sont en moyenne plus apparentés et phylogénétiquement plus proches qu'ils ne le sont avec les haplotypes d'autres populations, le *Nst* devient supérieur au *Gst* (Figure 17). Ce qui indique une relation entre la phylogénie des haplotypes et leur distribution géographique, et par conséquent, l'existence d'une structure phylogéographique. Dans le cas où les haplotypes les plus divergents se retrouvent préférentiellement dans les mêmes populations. Autrement dit, lorsque les haplotypes les plus fortement reliés ne sont jamais ensemble, mais toujours dans des populations différentes, le *Gst* sera égal ou supérieur au *Nst* (Figure 17). Ceci indiquera l'absence d'une structuration phylogéographique. Une manière de tester une telle organisation phylogéographique est de réaliser une série de permutations de l'identité des haplotypes et de comparer les valeurs de *Nst* obtenues pour ces permutations avec la valeur observée. Après permutation, les valeurs de *Nst* convergent vers le *Gst*. Cependant ce test ne prend pas en

compte les informations sur la répartition spatiale des populations, ce qui réduit sa puissance (Grivet, 2002).



**Figure 17:** Illustration de la correspondance entre les phylogénies des haplotypes et leur distribution géographique, d'après Pons et Petit (1996). (1) Lorsqu'il y a correspondance, la différenciation mesurée en prenant en compte les similarités entre haplotypes (Nst) est supérieure à la différenciation basée uniquement sur la fréquence des haplotypes (Gst). (2) Lorsque les haplotypes sont reliés de manière équivalente, alors Nst = Gst. (3) Enfin, lorsque les haplotypes les plus fortement reliés ne sont jamais ensemble, mais toujours dans des populations différentes, alors Nst < Gst (Grivet, 2002).

# I.2.5 Marqueurs moléculaires

Les végétaux sont caractérisés par trois types de génomes localisés dans des compartiments cellulaires distincts : le génome nucléaire dans le noyau, le génome mitochondrial dans les mitochondries et le génome plastidial dans les chloroplastes.

Les régions du génome utilisées pour la phylogénie moléculaire sont appelées marqueurs moléculaires. Elles doivent remplir les conditions suivantes :

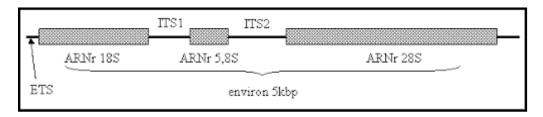
- i). Elles doivent être ubiquistes, c'est-à-dire présentes chez tous les taxons étudiés ;
- ii). Elles doivent contenir une région variable spécifique de chaque espèce et encadrée par deux séquences conservées.

Chez les angiospermes, le génome nucléaire est transmis à la fois par le pollen et les ovules, tandis que le génome cytoplasmique (chloroplastique ou mitochondrial), dans la plupart des cas, il est transmis par voie maternelle, autrement dit par les graines. Cependant il existe de nombreuses exceptions des cas de transmission paternelle ou biparentale chez des angiospermes.

### I.2.5.1 Marqueurs nucléaires

Les marqueurs nucléaires sont à hérédité mendélienne biparentale, et comme les isozymes, ils montrent une faible différenciation entre populations d'une même espèce (Ennos, 1994).

Deux catégories de marqueurs nucléaires peuvent être distinguées : les gènes nucléaires ribosomiques et les gènes nucléaires codant pour des protéines (Avise *et al.*, 1987). Les gènes nucléaires ribosomiques (Figure 18) forment un assemblage multigénique, constitué par des unités de gènes répétées en tandem plusieurs dizaines de fois. Chaque unité comprend une copie d'un gène codant pour l'ARN 18 S (petite sous-unité), d'un gène codant pour l'ARN 28 S (grande sous-unité) et deux espaceurs transcrits internes (ITS1 et ITS2) non codants séparés par l'ARN 5.8S.



**Figure 18 :** Une unité d'ARN ribosomique eucaryote, qui est répétée plusieurs centaines de fois dans un génome (<a href="http://www.edu.upmc.fr">http://www.edu.upmc.fr</a>)

L'une des séquences les plus populaires pour l'inférence phylogénétique au niveau générique et infragénérique chez les plantes est la région de l'espaceur transcrit interne (ITS) du cistron ribosomique nucléaire 18S-5.8S-26S (Alvarez et Wendel, 2003). Selon Feliner et Rosselló, (2007), quatre principales raisons justifient l'utilisation généralisée des régions ITS : (i) La disponibilité de plusieurs ensembles d'amorces de PCR universelles (ou proches) fonctionnant avec une grande diversité de groupes taxonomiques, (ii) La structure multi-copies facilite

l'amplification par PCR même à partir d'échantillons d'herbier, (iii) La taille modérée des séquences ITS (au-dessous de 700 pb) permet généralement l'amplification et le séquençage sans amorces internes, avec des exceptions de séquences ITS remarquablement longues dans plusieurs groupes de gymnospermes, (iv) En raison de leurs niveaux de variation, les ITS fournissent souvent suffisamment de marqueurs moléculaires adaptés aux études évolutives au niveau de l'espèce. Ceux-ci comprennent des sujets tels que l'origine des taxa polyploïdes, l'hybridation, l'introgression et, surtout, l'inférence phylogénétique.

Plusieurs autres facteurs ont apparemment contribué à une augmentation spectaculaire de leur utilisation dans les études phylogénétiques des plantes. Le manque de régions variables alternatives au sein des trois génomes végétaux qui pourraient fournir des marqueurs utiles pour les études à faible niveau taxonomique en était certainement un. D'autres caractéristiques potentiellement avantageuses des séquences ITS sont leur héritage biparental comparé à l'héritage uniparental des ADN organellaires, et l'uniformité intragénomique supposée due à l'homogénéisation active des copies répétées dans et entre les *loci* qui ont lieu dans ces régions multi-copies connues sous le nom d'évolution concertée (Zimmer *et al.*, 1980). D'autre part, chez les hybrides et les introgressants dans lesquels l'évolution concertée n'a pas homogénéisé les copies, les ITS peuvent aider à identifier les progéniteurs ou les lignées impliquées (Sang *et al.*, 1995).

Malgré ces nombreux avantages des séquences ITS et leur rôle dans la compréhension phylogénétique et à la connaissance des relations génomiques, un certain nombre de processus génétiques moléculaires influencent les séquences ITS de manière à induire en erreur l'inférence phylogénétique.

Les principaux processus limitant l'utilisation des séquences ITS pour l'inférence phylogénétique, sont passés en revue ici.

<u>1. Les gènes paralogues</u>: Dans de nombreux génomes végétaux, des variations de séquences importantes, provenant d'évènements de duplication sont signalées. Les séquences dupliquées dans et entre les lignées sont paralogues. Lorsque les gènes paralogues sont inclus, sans le savoir, dans l'analyse phylogénétique à l'exclusion des comparaisons orthologues appropriées, l'arbre génétique résultant confondra les évènements de divergence des organismes avec un suivi de l'histoire de la duplication. Par conséquent, des évaluations erronées de l'orthologie et de la paralogie conduiront à une incongruence phylogénétique (Feliner et Rosselló, 2007).

- 2. Evolution concertée: Les gènes ribosomaux dans les plantes existent dans des centaines à des milliers de copies qui sont répétées en tandem à un ou plusieurs emplacements chromosomiques. Une des propriétés les plus remarquables des gènes de l'ADNr est que les copies individuelles peuvent sembler évoluer plus ou moins à l'unisson. Autrement dit, au lieu que chaque copie de gène acquière une variation de séquence unique en raison de l'accumulation évolutive de mutations, toutes les copies répétées en génome peuvent partager conjointement le même ensemble de mutations. Cette uniformité découle d'un ou de plusieurs processus d'homogénéisation de séquences intergéniques que l'on appelle collectivement «évolution concertée» (Zimmer et al., 1980; Elder et Turner, 1995,). Les mécanismes évolutifs concertés agiraient pour éliminer les séquences paralogues, facilitant ainsi l'inférence d'une véritable homologie entre les taxons et une reconstruction phylogénétique. En l'absence d'homogénéisation complète en raison d'une évolution concertée, de multiples copies d'ADNr divergentes constitueront des orthologues et des paralogues dont la présence complique les efforts de reconstruction de l'histoire phylogénétique (Alvarez et Wendel, 2003)
- <u>3. Les pseudogènes</u>: Lorsque l'évolution concertée ne fonctionne pas complètement, les *loci* ribosomaux dupliqués ne restent pas nécessairement fonctionnels et certaines répétitions de séquences peuvent dégénérer en pseudogènes (Feliner et Rosselló, 2007). Leur existence peut cependant poser de sérieux problèmes pour l'analyse phylogénétique, car l'hypothèse d'une homogénéisation intergénique complète via des processus évolutifs concertés ne peut plus être supposée, et les taxons inclus dans les études phylogénétiques peuvent posséder une multiplicité de types de séquences (Alvarez et Wendel 2003).
- <u>4. Structure secondaire et changements de base compensatoires</u>: Les ITS ribosomaux sont soumis à des contraintes évolutives liées au maintien de structures secondaires spécifiques nécessaires au traitement correct des ARN matures (Mai et Coleman, 1997). Cela pourrait impliquer l'apparition de mutations compensatoires de base dans des positions situées sur des structures de tige qui violent les hypothèses de neutralité et d'indépendance des caractères (Liu et Schardl, 1994).
- <u>5. Difficultés d'alignement</u>: Comme indiqué ci-dessus, les séquences ITS sont soumises à des contraintes évolutives liées à la maintenance de structures secondaires spécifiques (Liu et Schardl, 1994; Mai et Coleman, 1997). Des niveaux élevés de teneur en GC assurent la stabilité des structures secondaires de l'ADN et de l'ARN sont associés à la formation de structures souches et de structures secondaires plus complexes. Cette teneur élevée en GC et

l'accumulation d'indel ont individuellement et collectivement un impact sur le processus d'alignement des séquences ITS. Ainsi, l'assemblage d'un ensemble de données ITS correct et aligné peut être plus difficile qu'avec d'autres séquences telles que des gènes codant pour une protéine nucléaire (Alvarez et Wendel, 2003 ; Feliner et Rosselló, 2007).

<u>6. Risques de contamination</u>: L'universalité est une caractéristique pratique des séquences ribosomiques, ce qui représente l'une des principales raisons pour lesquelles les systématiciens, en particulier sans formation en biologie moléculaire, choisissent les ITS pour les analyses phylogénétiques moléculaires. Il est constaté que la même universalité qui confère aux séquences ITS leur large utilité a également généré des résultats phylogénétiques extrêmement inattendus. Plus précisément, en raison de la quasi-universalité des amorces d'amplification couramment utilisées dans la PCR pour les séquences ITS, toute contamination du cocktail réactionnel avec le tissu d'une plante différente (ou même d'un champignon) pourrait conduire à une amplification préférentielle du contaminant (Alvarez et Wendel, 2003).

<u>7. L'homoplasie</u>: L'une des conséquences des problèmes d'alignement et de séquençage, ainsi que des possibilités de changements de base compensatoires, de paralogie, de pseudogènes et d'absence d'évolution concertée complète, est que l'homoplasie est accrue dans les ensembles de données phylogénétiques des séquences ITS (Alvarez et Wendel, 2003).

#### I.2.5.2 Marqueurs mitochondriaux

Les marqueurs cytoplasmiques, par rapport aux marqueurs nucléaires, montrent généralement une forte structuration géographique, aussi bien chez les plantes que chez les animaux (Petit *et al.*, 1993).

Les génomes mitochondriaux sont généralement à hérédité maternelle, bien que certaines espèces présentent une hérédité paternelle (chez les gymnospermes) ou biparentale (chez des angiospermes) (Birky, 2001).

Parmi les problèmes majeurs limitant l'utilisation des marqueurs mitochondriaux dans la taxonomie des plantes : i) la présence de nombreuses régions répétées et la coexistence de plus d'un type de génome mitochondrial dans une cellule (hétéroplasmie), ce qui conduit à des recombinaisons fréquentes au sein et entre les génomes de l'ADN mitochondrial (ADNmt), et un polymorphisme élevé dans l'arrangement des gènes chez les plantes (Schuster et Brennicke, 1994). En conséquence, la mise au point d'amorces ainsi que la mise en œuvre des

alignements deviennent délicats (Grivet, 2002). ii) contrairement aux animaux, l'ADNmt des plantes évolue très lentement, ce qui traduit par un très faible polymorphisme de l'ADNmt au sein d'une même espèce et même entre des espèces étroitement apparentées. Ceci explique en partie l'utilisation limitée de l'ADNmt dans la phylogéographie et la phylogénie (Barr *et al.*, 2007; Mower *et al.*, 2007; Sloan *et al.*, 2012). Par conséquent, et à l'exception des conifères (gymnospermes), les marqueurs ADNmt sont rarement été utilisés dans les études phylogéographiques des plantes, en raison de la difficulté à trouver des variations génomiques de l'ADN mitochondrial (Duminil, 2014). En effet, peu d'études ont mentionné avoir dépisté le polymorphisme de l'ADNmt et n'avoir rien trouvé (par exemple, Marchelli *et al.*, 2010). Ainsi, la tendance actuelle est de tester autant que possible de *loci* ADNmt en utilisant des amorces universelles disponibles (Duminil, 2014).

## **I.2.5.3** Marqueurs chloroplastiques

Les chloroplastes sont des organites végétaux qui contiennent la machinerie enzymatique nécessaire à la photosynthèse et à d'autres voies biochimiques. La plupart des plantes terrestres ont un génome chloroplastique hautement conservé organisé en un seul chromosome circulaire (Palmer, 1991)

Chez la plupart des angiospermes (environ 80%, Matsushima *et al.*, 2008), l'ADNcp est haploïde, transmis par la mère (fleur femelle) et donc dispersé par la graine (Pharmawati *et al.*, 2004). Il est soumis à la dérive génétique à un degré plus élevé que l'ADN nucléaire (ADNn), causant ainsi une structuration plus rapide entre populations isolées. Ces propriétés font de l'ADNcp le marqueur de prédilection pour la phylogéographie surtout pour les espèces à dispersion de graines limitée en raison de la faible mobilité de l'agent de dispersion (gravité, petits rongeurs...). (Koffi, 2010).

Sauf quelques exceptions, le génome chloroplastique contient deux régions répétées inversées (IR) qui sont des images en miroir les unes des autres en termes de complément de gène. Les deux régions répétées inversées sont séparées les unes des autres par une grande et une petite région de copie unique (LSC et SSC, respectivement) (Figure 19). Des études antérieures ont suggéré que les régions répétées inversées accumulent des mutations ponctuelles plus lentes que les régions à copie unique (Shaw *et al.*, 2007). Perry et Wolfe (2002) ont montré que le taux de substitution des nucléotides est 2,3 fois plus élevé dans les régions à copie unique que dans les séquences répétées inversées. Comme les répétitions inversées évoluent à un rythme

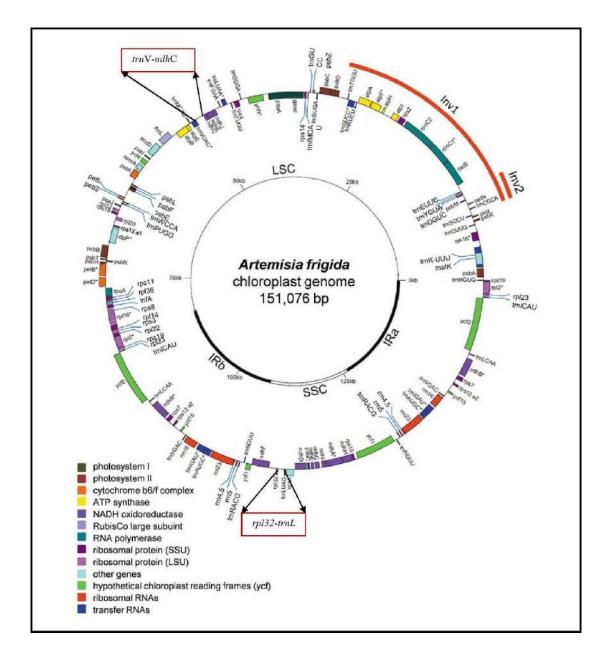
relativement plus lent, la plupart des chercheurs utilisant des outils moléculaires se sont concentrés sur les régions à copie unique (Shaw *et al.*, 2007).

Le génome du chloroplaste peut être divisé en trois catégories fonctionnelles comprenant (1) des gènes codant pour une protéine, (2) des introns et (3) des espaceurs intergéniques; les deux derniers ne codent pas pour des protéines et sont appelés régions non codantes. Selon la carte des chloroplastes de Nicotiana (Wakasugi *et al.*, 1998), environ 43% des LSC et des SSC sont non codants. Quinze introns constituent environ 10,6% de l'ADN chloroplastique à une seule copie, tandis que 92 espaceurs intergéniques représentent 32,3%.

Les séquences non codantes du génome des chloroplastes sont une source primaire de données pour les études moléculaires systématiques, phylogéographiques et génétiques des plantes (Shaw *et al.*, 2007). Les données de séquences de ces régions ont de nombreuses applications importantes en systématique et en biologie évolutionniste telles que l'élucidation de l'origine des espèces domestiquées (Wills et Burke, 2006), le traçage des mouvements biogéographiques (Ickert-Bond et Wen, 2006), et clarifier les relations complexes entre les espèces (Shaw et Small, 2005).

A quelques exceptions près, le taux d'évolution de l'ADNcp est faible entre taxons proches (Koffi, 2010). De plus, plusieurs amorces non spécifiques ont été définies et permettent de comparer plusieurs espèces sur les mêmes locus (Shaw *et al.*, 2005 ; Shaw *et al.*, 2007). Ces propriétés font des gènes chloroplastiques une source d'information importante pour la phylogéographie infra-spécifique (Avise, 2004).

A ce jour, plus de 200 séquences de génome chloroplastique (cp) sont disponibles dans la base de données sur le génome du chloroplaste (http://chloroplast. ocean. washington. edu/cpbase/run) (Liu *et al.*, 2013).



**Figure 19 :** Carte du génome chloroplastique d'*Artemisia frigida*. IR (*inverted repeat*), répétition inversée; LSC (*large single copy region*), grande région de copie unique; SSC (*small single copy region*), petite région de copie unique; Inv1 (*inverted sequence region 1*), région de séquence inversée 1; Inv2 (*inverted sequence region 2*), région de séquence inversée 2. Les gènes contenant des introns sont marqués d'un \* (Liu *et al.*, 2013). *rpl32-trn*L et *trnV-ndh*C sont les deux régions qui ont été séquencées pour cette étude.

## **CHAPITRE II**

# Antécédents et objectifs

## II. Antécédents et objectifs

#### II.1 Antécédents

Malgré le nombre important des études qu'ont été effectuées sur le genre *Artemisia* dans les différents domaines de systématique classique, de phylogénie moléculaire, de biologie ; en particulier dans le domaine de l'organisation et l'évolution du génome, et dans la cytogénétique classique (nombre, taille et morphologie de chromosomes, localisation des constrictions primaires (centromères) ou secondaires (organisateurs nucléolaires), études du caryotype ...etc.) et moléculaire (étude de la structure de l'ADN ribosomique, estimation de la taille du génome, étude de la variabilité génétique par marqueurs moléculaires ......etc.) (Vallès *et al.*, 2011), le complexe *Artemisia herba-alba*, vu son aire de répartition étendue dans le monde, reste peu étudié du point de vue cytogénétique moléculaire approfondie et phylogénie moléculaire.

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 caryomorphologique 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. Les deux nombres chromosomiques ont été signalés ultérieurement par d'autres auteurs dans différentes régions de la Méditerranée; en Espagne (Fernández-Casas *et al.*, 1979; Vallès, 1987), au Maroc (Ouyahya, 1987; Ouyahya et Viano 1988), en Tunisie (Ferchichi, 1997) et en Algérie (Betina *et al.*, 2007; Bougoutaia *et al.*, 2014). Plusieurs noms et statuts taxonomiques ont été proposés pour différentes populations de cette espèce, qui forment un complexe qui peut servir à une étude biosystématique plus détaillée (voir synthèse bibliographique sur l'armoise blanche).

Pour les approches caryologiques et cytogénétiques moléculaires plus poussées, compte tenu la large distribution de l'armoise blanche dans l'Afrique du nord et la Péninsule Ibérique, les études réalisées sur taxon, malgré leur importance, restent limitées en nombre, et dans leur étendue spatiale. Ces études ont porté principalement sur l'estimation de la quantité d'ADN nucléaire (Torrell et Vallès, 2001a), 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) et l'étude des organisateurs nucléolaires (NORs) par la coloration aux nitrate d'argent (Betina *et al.*, 2007). Des marqueurs moléculaires (ISSR) ont été utilisés pour la mise en évidence de la variabilité génétique au sein des populations d'*Artemisia herba-alba* en Algérie (Bougoutaia *et al.*, 2014; Maghni *et al.*, 2016), et en Tunisie (Houari et Ferchichi, 2004; 2008). Il ya lieu de souligner qu' à notre connaissance, aucune étude phylogénétique et phylogéographique n'a été faite sur ce taxon jusqu'à présent que ce soit en Algérie où dans le monde. D'autres travaux se sont intéressés à l'étude anatomique (Vallès, 1987), morphologique (Maghni *et al.*, 2017), et au déroulement du cycle biologique et de l'aptitude à la production fourragère de l'armoise blanche (Ferchichi *et al.*, 2004)

En Algérie, compte tenu de la large distribution de l'armoise blanche dans les régions arides, semi-arides et sahariennes et son importance économique et pastorale, les études génétiques et phylogénétiques, utilisant des approches moléculaires sur cette espèce sont rares. Hormis les travaux de Betina *et al.* (2007), Bougoutaia *et al.* (2014) et Maghni *et al.* (2016), réalisés à petite échelle spatiale, surtout dans les régions du Centre et l'Est Algérien, aucun travail n'est signalé à ce jour.

En revanche, et contrairement aux domaines de cytogénétique classique et moléculaire et phylogénie moléculaire. L'armoise blanche a été bien investiguée dans d'autres domaines ; principalement, dans les domaines: écologiques, ethnobotaniques, pastorales et phytochimiques. Une synthèse non exhaustive de ces travaux en Algérie et dans le Monde a été exposée dans la partie bibliographique sur l'armoise blanche.

## II.2 Objectifs

Le présent travail de thèse a été réalisé dans le cadre du programme PNE financé par le Ministère Algérien de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique. Les travaux sont effectués dans le « Laboratori de Botànica de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona » et à «l'Institut Botànic de Barcelona » (IBB-CSIC-ICUB), avec la collaboration scientifique du « Laboratoire des productions, valorisations végétales et microbiennes (LP2VM) - Université des sciences et de la technologie d'Oran-Mohamed Boudiaf (USTO-MB) ».

L'étude conduite sur un échantillonnage exhaustif réalisé à travers toute l'aire de répartition de l'armoise blanche en Algérie : dans la région steppique et saharienne, par des approches pluridisciplinaires de cytogénétique classique, de cytogénétique moléculaire et de phylogénie et phylogéographie, vise à obtenir des informations sur le nombre et la morphologie des chromosomes, l'organisation et l'évolution écoclimatique du génome, ainsi que la structuration spatiale des populations Algériennes d'*Artemisia herba-alba*.

Les résultats attendus pourraient servir de base pour d'autres études en relation avec la conservation et de gestion de ce taxon.

De façon plus précise, les objectifs de ce travail sont structurés dans les points suivants :

- 1) Dénombrer les chromosomes et caractériser les caryotypes;
- 2) Caractériser les gènes ribosomiques par cartographier physique des gènes d'ARNr dans les chromosomes;
- 3) Estimer de la taille du génome, et évaluer son évolution en fonction des paramètres écoclimatiques de la station;
- 4) Évaluer les différences de la taille du génome et les niveaux de ploïdie entre les populations de différents degrés de conservation;
- 5) Évaluer l'impact des facteurs environnementaux sur l'évolution de la polyploïdie;
- 6) Réaliser la phylogénie inter-populationnelle : analyse moléculaire de la diversité génétique, construction d'un réseau d'haplotypes et arbres phylogénétiques;
- 7) Reconstituer la phylogéographique d'*Artemisia herba-alba* en Algérie : analyse du schéma phylogéographique de la distribution des différentes populations d'*Artemisia*

herba-alba en Algérie, avec un accent particulier sur l'origine de ce taxon dans la région du Hoggar.

## **CHAPITRE III**

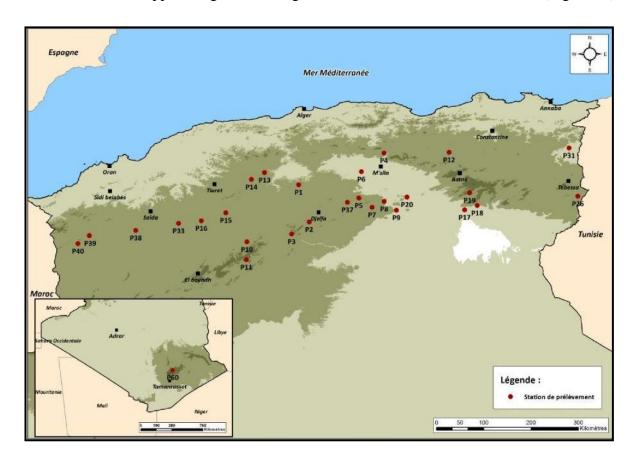
## Matériel et Méthodes

## III. Matériel et Méthodes

## III.1 Matériel

## III.1.1 Données des stations de prélèvement

Compte tenu de la large distribution d'Artemisia herba-alba en Algérie, nous avons tenté d'échantillonner dans toute son aire de distribution. Pour ce faire, vingt huit (28) stations couvrant toute la steppe et le grand sud Algérien ont été retenues dans cette étude (Figure 20).



**Figure 20 :** Localisation des 28 stations de prélèvement des échantillons d'*Artemisia herba-alba* 

Les populations choisies sont situées sur différentes altitudes et réparties sur différents étages bioclimatiques (Tableau 2 et 3, Figure 21).

**Tableau 2:** Situation géographique des stations de prélèvement des échantillons d'*Artemisia herba-alba* 

N° ordre	Station	Code	Données géographiques		
N' orare	Small Cour		Lat. N	Long.	Altitude
1	Ain Oussera (W. Djelfa)	P1	35°20'	02°57'E	780 m
2	Oued Sedar (W. Djelfa),	P2	34°28'	03°16′E	1270 m
3	Ben-Hamed (W. Djelfa)	P3	34°20'	02°53'E	1220 m
4	El-Euch (W. Borj Bou Arréridj)	P4	35°52'	04°34'E	724 m
5	El-Hamel (W. M'sila)	P5	35°05'	04°06'E	. 960 m
6	Zerarka (W. M'sila)	P6	35°35'	04°09'E	550 m
7	Mohamed Boudiaf (W. M'sila)	P7	34°52'	04°21′E	883 m
8	Ben-Srour (W. M'sila)	P8	35°01'	04°35′E	700 m
9	Ouled Slimane (W. M'sila)	P9	34°51'	04°49'E	600 m
10	Gueltet Sidi Saad (W. Laghouat)	P10	34°15'	01°58'E	1210 m
11	Sebgag (W. Laghouat)	P11	34°03'	01°53'E	1380 m
12	Hammam soukhna (W. Sétif)	P12	35° 57'	05°49'E	925 m
13	Bouaiche (W. Médéa)	P13	35°34'	02°18'E	870 m
14	Rechaiga (W. Tiaret)	P14	35°26'	02°03'E	871 m.
15	Ain Dheb (W. Tiaret)	P15	34°48'	01°34'E	1100 m
16	Sidi Abderrahmane (W. Tiaret)	P16	34°39'	01°06'E	1050 m
17	Baniane (W. Biskra)	P17	34°59'	06°02'E	545 m
18	Tifelfel (W. Batna)	P18	35°07'	06°14′E	845 m.
19	Arris (W. Batna)	P19	35°09'	06°14′E	970 m
20	Zerzour (W. Batna)	P20	35°06'	05°01'E	575 m
21	Oum Ali (W. Tébéssa)	P26	35°07'	08°16'E	1017 m
22	Taoura (W. Souk-Ahras)	P31	36°02'	08°06'E	626 m
23	Ain Skhouna (W. Saida)	P33	34°36'	00°40'E	1072 m
24	Slim (W. M'sila)	P37	35°00'	03°53'E	1020 m
25	Marhoum (W. Sidi Bel-Abbès)	P38	34°28'	00°09'W	1202 m
26	Ras El-Maa (W. Sidi Bel-Abbès)	P39	34°22'	01°02'W	1257 m
27	El-Aricha(W. Tlemcen)	P40	34°13'	01°15′W	1265 m
28	Tazrouk (W. Tamanrasset)	P60	23°34'	06°00'E	1800 m

**Tableau 3:** Données climatiques des stations de prélèvement des échantillons d'*Artemisia herba-alba* 

Station	P (mm)	M (°C)	m (°C)	ETP (mm)	P/ETP	Q3	*Climat
P1	224	38,1	1,8	1370	0,16	21,2	ASf
P2	307	33,8	-0,5	1144	0,27	30,6	ASff
Р3	237	34,5	0,5	1201	0,20	23,9	ASf
P4	400	35,6	0,7	1246	0,32	39,3	SAIf
P5	237	37,1	3,7	1400	0,17	24,3	ASt
P6	242	30,8	4,2	1201	0,20	31,2	ASt
P7	210	33,7	1,6	1211	0,17	22,4	ASf
P8	200	33,6	2,2	1229	0,16	21,8	ASf
P9	186	35,3	2,5	1297	0,14	19,5	AIf
P10	276	32,3	0,8	1136	0,24	30,1	ASf
P11	342	33,0	0,0	1133	0,30	35,5	SAIff
P12	407	31,9	1,2	1136	0,36	45,5	SASf
P13	443	35,5	1,3	1263	0,35	44,4	SASf
P14	365	32,5	2,2	1191	0,31	41,3	SAIf
P15	318	30,9	0,9	1091	0,29	36,4	SAIf
P16	362	31,2	1,2	1112	0,33	41,4	SAIf
P17	170	38,8	4,5	1486	0,11	17,0	AIt
P18	240	35,3	1,8	1273	0,19	24,6	ASf
P19	345	32,1	0,8	1129	0,31	37,8	SAIf
P20	196	37,1	3,6	1397	0,14	20,1	AIt
P26	316	35,4	1,2	1256	0,25	31,7	ASf
P31	465	33,9	0,3	1174	0,40	47,5	SASf
P33	292	30,8	1,0	1091	0,27	33,6	SAIf
P37	295	32,0	0,2	1105	0,27	31,8	ASf
P38	306	32,4	1,6	1167	0,26	34,1	SAIf
P39	334	29,9	0,9	1057	0,32	39,5	SAIf
P40	450	35,6	-1,5	1170	0,38	41,6	SAIff
P60	55	33,7	1,4	1205	0,05	5,8	HASf

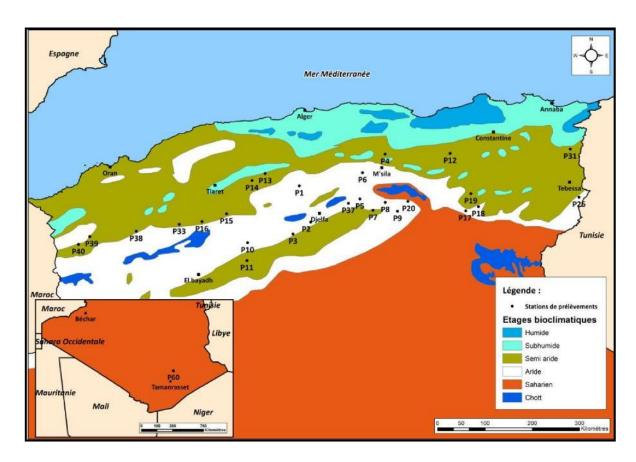
<sup>\*</sup>Climat : Classes des étages bioclimatiques sont définies selon le climagramme d'Emberger (1955).

#### Légende :

(voir détails en Annexe 1, Tableau 34).

a) P = Pluviosité moyenne annuelle en mm, tM = Moyenne des maxima quotidiens du mois le plus chaud, tm = moyenne des minima quotidiens du mois le plus froid, ETP = Évapotranspiration, P/ETP= indice d'aridité ; Q3 = Quotient pluviothermique d'Emberger (1955), modifié par Stewart (1969) pour l'Algérie et le Maroc ; Q3 = 3,43 P/tM-tm, où tM et tm sont exprimés en °C.

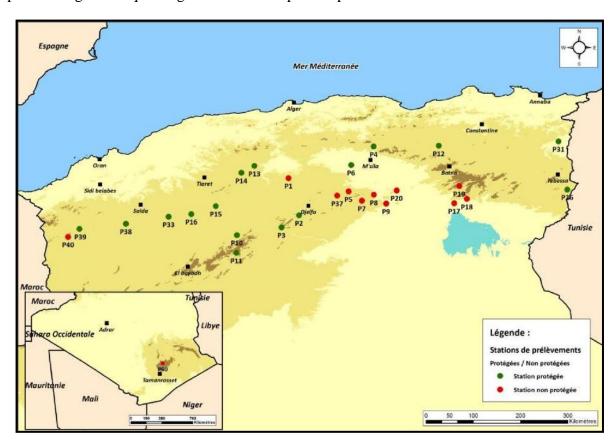
<sup>b) AS = Aride Supérieur, Al = Aride Inférieur, SAS = Semi-aride Supérieur, SAI = Semi-aride Inférieur, HAS = Hyperaride Supérieur (saharien); ff = Hivers froids, f = Hivers frais, t = Hivers tempérés.
a) Sources des données climatiques: Bougoutaia (2009); Le Houérou, (1995), (https://fr.climate-data.org)</sup> 



**Figure 21 :** Localisation des stations de récoltes des échantillons d'*Artemisia herba-alba* sur la carte bioclimatique simplifiée de l'Algérie, extraite de Nedjraoui et Bédrani (2008) avec des légères modifications.

#### III.1.2 Matériel biologique

L'échantillonnage est réalisé sur des individus d'*Artemisia herba-alba* poussant dans des conditions naturelles, et d'autres dans des aires protégées (Figure 22). Les différentes analyses sont réalisées sur des akènes, des feuilles fraîches et/ou des feuilles sèches conservées avec du silica-gel, dans des sacs en plastique à fermeture *Ziplock*. La récolte des échantillons est effectuée pendant la période allant du janvier 2013 jusqu'au mois de juillet 2016, sur des individus suffisamment espacés l'un de l'autre afin d'éviter de récolter le même matériel pour deux individus considérés. Les akènes d'*Artemisia herba-alba* sont récoltés de janvier à février de chaque année, et les feuilles fraîches et sèches, durant la période végétative qui est généralement au printemps et en été.



**Figure 22 :** Localisation des populations d'*Artemisia herba-alba* situées dans des aires protégées de mises en défens du *Haut Commissariat au Développement de la Steppe* (HCDS) et de l'*Institut National de la Recherche Forestière* (INRF).

#### III.2 Méthodes

## III.2.1 Technique de cytogénétique classique

#### III.2.1.1 Coloration, dénombrement des chromosomes et établissement du caryotype

L'étude caryologique consiste à renseigner les mitoses somatiques sur des méristèmes racinaires de jeunes germinations. Différentes méthodes sont décrites pour l'étude des chromosomes, elles mettent en jeu l'application d'agents chimiques pour le prétraitement, la fixation et la coloration des cellules en divisions. Ces méthodes sont largement décrites dans le cahier des « Techniques de cytogénétique végétale » (Jahier *et al.*, 1992).

Le matériel végétal est constitué des akènes germés d'*Artemisia herba-alba* récoltés dans des sacs en papier durant la fin du mois de janvier et le début de février, sur des touffes appartenant à des sites géographiques différents, représentant les différents niveaux de ploïdie détectés lors de l'estimation de la quantité d'ADN par cytométrie en flux.

Après sélection des akènes à l'aide d'une pince fine sous loupe binoculaire « vu leur taille très petite », la réalisation des préparations s'est déroulée à travers les étapes suivantes :

#### • Germination

Les akènes ont été mis à germer à l'obscurité dans des boîtes de Pétri tapissées de papier absorbant et imbibées d'eau distillée à une température ambiante. Les akènes germés laissent apparaître une radicule dont l'extrémité est le siège de divisions intenses. C'est au niveau de cette zone méristématique qu'aura lieu l'étude des mitoses somatiques, lorsque la taille des radicules atteint 1 à 2.5 cm.

#### • Prétraitement

Les extrémités des racines ont été coupées et plongées dans une solution de colchicine à 0,05% pendant 2h 15 - 2h 45minutes à la température ambiante. Cette opération a pour but de bloquer les divisions mitotiques au stade métaphasique.

#### Fixation

Les racines retirées de la colchicine sont ensuite fixées dans de l'éthanol absolu et de l'acide acétique glacial (3v : 1v) à la température ambiante pendant 1-2 h, puis maintenues dans le même fixateur à 4°C pendant 24 heures. Les échantillons ont été transférés par la suite à

l'éthanol 70° à 4 °C afin d'assurer une meilleure conservation du matériel végétal pour une période plus longue.

Les étapes précédentes sont communes pour la technique de dénombrement des chromosomes et celle de l'obtention des protoplastes.

#### Hydrolyse

Cette étape est généralement nécessaire pour obtenir ultérieurement un bon étalement des cellules et des chromosomes entre lame et lamelle. Les extrémités racinaires sont retirées du fixateur et mises dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 1N) à 60 °C pendant 1.5 à 2 minutes. L'hydrolyse permet de dissoudre le ciment pectique de la lamelle moyenne et l'éclaircissage du cytoplasme. En outre, l'acide chlorhydrique libère les groupements aldéhydiques sur les molécules de sucre de l'ADN par destruction des liaisons entre les bases puriques et le désoxyribose. L'hydrolyse permet aussi le ramollissement des tissus du méristème et facilite ainsi leur écrasement.

#### Coloration

Après hydrolyse, le matériel végétal est prélevé de l'acide chlorhydrique puis rincé à l'eau distillée et plongé dans l'acéto-orcéine 2% (Annexe 2) pendant 1h-1h30 minutes. Les groupements aldéhydes libérés lors de l'hydrolyse donnent une couleur rouge aux chromosomes en présence de l'acéto-orcéine 2%.

#### • Ecrasement et observation

Les apex colorés sont placés entre lame et lamelle dans une goutte de mélange d'acide acétique 45% : glycérol (9v : 1v). L'écrasement est effectué en tapant légèrement sur la lamelle à l'aide d'une baguette en bois. L'observation des plaques métaphasiques est faite au microscope Zeiss Axioplan à l'objectif 40, et les meilleures plaques métaphasiques ont été photographiées avec une caméra AxioCam HRm.

#### III.2.1.2 Analyse caryologique

L'observation et le comptage des chromosomes sont effectués uniquement à partir des métaphases somatiques. Le dénombrement chromosomique et les caractérisations morphométriques des chromosomes sont réalisés sur trois à cinq individus par population, et pour chaque individu, trois à six plaques métaphasiques de degré similaire de condensation

chromosomique sont utilisées pour calculer les données du caryotype et élaborer les idiogrammes des deux cytotypes étudiés.

Différents paramètres sont utilisés dans la caractérisation du caryotype, tel que le nombre chromosomique de base, les longueurs moyennes du bras long et bras court de chaque paire de chromosomes, la longueur totale du chromosome, la longueur totale du caryotype, la longueur relative de chaque paire chromosomique, la vérification de la présence de chromosomes satellifères et de structures surnuméraires (chromosomes B).

La formule chromosomique est déterminée selon la nomenclature de Levan *et al.* (1964) qui repose sur la position du centromère et le rapport (r) entre le bras long et le bras court (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Nomenclature de Levan *et al.* (1964)

Position du centromère	d	r	Ic	Type chromosomique
Point médian	0,0	1,0	50,0	Métacentrique s.s. (M)
Région médiane	0,0-2,5	1,0-1,7	50,0 – 37,5	Métacentrique (m)
Région submédiane	2,5-5,0	1,7 - 3,0	37,5 – 25,0	Submétacentrique (sm)
Région subterminale	5,0-7,5	3,0-7,0	25,0 – 12,5	Subtélocentrique (st)
Région terminale	7,5 – 10,0	$7,0-\infty$	12,5-0,0	Acrocentrique (t)
Point terminal	« 10,0 »	« ∞ »	« 0,0 »	Télocentrique (T)

**Légende : d** = différence entre bras long et bras court ;  $\mathbf{r}$  = rapport bras long / bras court;  $\mathbf{Ic}$  = Indice centromérique (bras court/ longueur totale du chromosome x 100) ;  $\mathbf{s.s.}$  :  $\mathbf{sensu\ stricto}$ 

L'asymétrie du caryotype est une bonne expression de la morphologie générale du caryotype chez les plantes. Les modifications des caractères morphologiques du génome ont été fréquemment liées à l'évolution des plantes supérieures (Romero-Zarco, 1986). Les indices d'asymétrie intra-chromosomiques (IAs% d'Arano et Saito (1980), et A1 de Romero-Zarco (1986)) et inter-chromosomique (R de Siljak-Yakovlev (1996) et A2 de Romero-Zarco (1986)) du caryotype, liés respectivement à la morphologie et la taille des chromosomes, sont calculés selon les formules ci-dessous. Ces indices constituent une approche bien adaptée à l'étude de taxons apparentés qui ne présentent que de légères différences dans l'asymétrie du caryotype.

- Indices d'asymétrie intra-chromosomiques
- IAs  $\% = (\sum B1/\sum Lt) \times 100$

- A1= 1 - 
$$\frac{\sum_{i=1}^{n} Bc/Bl}{n}$$

Où:

IAs % : Indice d'asymétrie en pourcentage de la somme des bras longs /la somme des longueurs totales des chromosomes dans le jeu haploïde de l'échantillon

A1 : Indice d'asymétrie intra-chromosomique, allant de zéro à un.

Bl: Longueur moyenne des bras longs dans chaque paire de chromosomes homologues.

Bc : Longueur moyenne des bras courts dans chaque paire de chromosomes homologues. Lt : Longueur totale de chromosome dans le jeu haploïde

n : Nombre de paires de chromosomes homologues.

➤ Indices d'asymétrie inter-chromosomiques

$$-R = \frac{PPL}{PPC}$$

$$-A2 = \frac{Et}{LTC}$$

Où:

R : Rapport entre la plus grande et la plus petite des paires chromosomiques

A2 : Indice d'asymétrie inter-chromosomique correspondant aux variations entre les longueurs totales des chromosomes.

PPL: Paire chromosomique la plus longue

PPC: Paire chromosomique la plus petite

Et: Écart type des moyennes de longueurs des chromosomes de l'échantillon

LTC : somme des longueurs totales des chromosomes du jeu haploïde de l'échantillon.

Les classes des caryotypes de chaque population ont été déterminées selon le diagramme de Stebbins (1971) pour la classification des caryotypes d'après leurs degrés d'asymétries (Tableau 5)

**Tableau 5 :** Diagramme de classification des caryotypes selon leurs degrés d'asymétries (Stebbins, 1971)

Rapport du chromosome le plus long/chromosome le plus court	Proport	s dont le rapport d 1	apport du	
long em omosome le plus court	0,0	0,01 - 0,5	0,51- 0,99	1,0
<2:1	1A	2A	3A	4A
2:1-4:1	1B	2B	3B	4B
>4:1	1C	2C	3C	4C

Les paramètres morphométriques du caryotype sont calculés avec MicroMeasure v3.3 (Colorado State University), et des graphiques des idiogrammes haploïdes ont été réalisés avec PowerPoint (Microsoft Office 2010).

#### III.2.2 Technique de cytogénétique moléculaire

## III.2.2.1 Localisation des gènes d'ADN ribosomiques (ADNr)

Une population pour chaque niveau de ploïdie détecté est étudiée par la technique de l'hybridation *in situ* fluorescente (FISH, de l'anglais *fluorescence in situ hybridization*).

## III.2.2.1.1Obtention des protoplastes

Étant donné que la technique d'hybridation *in situ* (FISH), nécessite de travailler sur des plaques métaphasiques libérées des parois pectocellulosiques et du cytoplasme selon la technique de « protoplast dropping » (Geber et Schweizer, 1988), nous avons tout d'abord isolé les protoplastes. Pour ce faire, les extrémités de racines prétraitées et fixées comme mentionné ci-dessus ont été rincées dans le tampon citrate « 0,01M » à pH 4,6 (Annexe 2) et placées dans un verre de montre contenant une solution enzymatique diluée à 50% dans le tampon citrate et composée de 3% de cellulase Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co. Tokyo, Japon), 30% de pectinase (Sigma) ou 4% de cellulase Onozuka R-10 (Yakult Honsha Co. Tokyo, Japon) et 1% de pectolyase Y-23 (Seishin Co. Tokyo) et hémicellulase (Sigma). L'ensemble est placé dans une boîte de Pétri tapissée de papier filtre imbibé de l'eau distillée à 37 °C pendant 10 à 30 minutes. Cette étape a pour but de digérer les parois cellulaires et libérer les chromosomes. Au bout de 10 minutes nous vérifions si la digestion est réalisée en soulevant à l'aide d'une pince une racine ; si le bout correspondant à l'apex tombe tout seul cela implique que la digestion est réalisée, dans le cas contraire nous augmentons le temps de

digestion. Les méristèmes sont ensuite récupérés sous la loupe binoculaire, rincés à l'eau distillée et placés sur des lames dans une goutte d'acide acétique fraîchement préparé à 45%; la préparation est recouverte d'une lamelle puis légèrement écrasée avec une allumette afin d'étaler les cellules. La vérification de l'état de la préparation est effectuée au microscope à contraste de phase. Les lames intéressantes sont triées et placées au congélateur à -80 °C afin de subir l'hybridation *in situ* après délamellage.

#### III.2.2.1.2Sondes d'ADNr utilisées

Pour localiser les sites d'ADNr 5S et35S (45S; 18S-5.8S-26S), nous avons utilisé deux types de sondes :

- ➤ Sonde d'ADNr 35S : est un plasmide portant un insert de 2,5 kb du gène de l'ARNr 26S isolé à partir de *Solanum lycopersicum* L. marquée avec le fluorochrome Cyanine (orange) (Cy3 : Jena Biosciences) en utilisant la technique de Nick Translation Mix (Roche).
- ➤ Sonde d'ADNr 5S: la sonde utilisée pour la détection et la localisation des régions d'ADN ribosomique 5S est un trimère d'environ 0,7 kb de long des gènes d'ARNr 5S isolés de *Artemisia tridentata* Nutt, marquée avec le fluorochrome Green dUTP (vert) en utilisant la technique de Nick Translation Mix (Abbott Molecular). Cette sonde contenait trois unités du gène de l'ARNr 5S (120 pb) et des espaceurs inter géniques non codants (environ 290 pb).

#### III.2.2.1.3 Réalisation de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH)

L'hybridation *in situ* a été réalisée selon Gouja *et al.* (2015). Dans un premier temps, les préparations sont traitées à la RNase (pour 04 lames : 8 μL de RNase (10 mg/mL) dans 792 μL de 2×SSC (Annexe 2)) ; pour chaque lame, 200 μL de la solution sont déposés sur les lames puis elles sont recouvertes d'une lamelle en plastique, l'ensemble est ensuite placé dans une chambre humide imbibé de tampon 2×SSC (boîtes tapissées de Kleenex et imbibées de 2×SSC) et laissé incuber pendant 1heure dans une étuve à 37 °C. Après incubation, les lamelles en plastique sont enlevées et les lames sont rincées trois fois avec 2×SSC dans un portoir sous agitation pendant 5 minutes chacune à température ambiante, et une (1) fois dans l'HCl 0,01N pendant 2 minutes à température ambiante. Après rinçage, les lames sont traitées avec 100 μL de pepsine 1% (Annexe 2), recouvertes d'une lamelle en plastique et incubées dans l'étuve (boîtes tapissées de kleenex et imbibées de 2×SSC) pendant 15 minutes à 37 °C.

La pepsine permet de digérer les protéines accrochées aux chromosomes. Ensuite, les lames sont lavées dans un portoir avec de l'eau bi-distillée sous agitation lente pendant deux minutes à température ambiante. Pendant ce lavage, les lamelles en plastiques sont laissées se décoller seules sur les lames puis retirer à l'aide d'une paire de pince. Les lames sont ensuite lavées dans un portoir avec du 2×SSC sous agitation lente pendant 5 minutes à la température ambiante. Cette étape est répétée deux fois. Après, les lames sont déshydratées dans une série de bains d'éthanol conservés au froid (- 20 °C) à concentrations croissantes : 50%, 70%, et 100% dans un portoir à agitation lente pendant 2 minutes chacun, puis mises à sécher dans un portoir à température ambiante pendant 1h30 minutes.

Pendant ce temps, nous préparons la mixture de sonde de l'hybridation dont la composition est reportée dans le Tableau 6. Le mélange contenant la sonde est préparé et dénaturé pendant 10 minutes à 75 °C, puis mis immédiatement dans la glace pendant au moins 15 minutes.

**Tableau 6 :** Composition du mélange d'hybridation in situ de l'ADNr

Produit	Quantité pour 1 lame (μL)	Quantité pour 4 lames (µL)	Observation
Formamide pur	15 μL	60 μL	Améliore la dénaturation
Dextran sulfate 50%	6 μL	24 μL	Forme un réseau autour de la sonde
20XSSC	3 μL	12 μL	Solution saline
H <sub>2</sub> O pure	q.s.p*		Le volume ajouté dépend du volume de sonde ajouté
ADN 35S	50-100ng/lame		Sonde marquée avec la technique Nick-Translation Mix
ADN5S	50-100ng/lame		Sonde marquée avec la technique Nick-Translation Mix
Volume final	30 μL	120 μL	-

<sup>\* :</sup> q.s.p = Quantité Suffisante Pour ; à déterminer à partir de la concentration de la solution des sondes

L'hybridation est réalisée en déposant 30 µL de mélange sur les lames et en les recouvrant de lamelles en plastique. Les lames sont placées (4 par 4) dans une boîte en plastique dont le

fond est lavé à l'alcool à 95%. Pour éviter l'entrée de l'humidité, il est possible de scotcher l'ouverture de la boîte. Le tout est placé dans un bain marie à 75 °C pendant 10 minutes afin de dénaturer les chromosomes sur les lames, puis transféré dans un bain-marie à 55 °C pendant 5 minutes. Les lames sont ensuite retirées doucement et mises sur un portoir dans une boîte tapissée de Kleenex imbibée de 2×SSC préalablement chauffée à 37 °C, et laissées incuber toute la nuit à 37 °C. Après le temps d'hybridation, une série de lavages de stringence sous agitation douce à 42 °C est alors réalisée. Cette étape permet de débarrasser les lames de l'excès de la sonde non hybridé spécifiquement. Une température de lavage plus élevée augmente la spécificité d'hybridation, mais diminue l'intensité du signal fluorescent.

Les lavages, dont la composition des solutions est donnée en Annexe 2, sont réalisés dans un bain marie réglé à faible vitesse d'agitation linéaire selon les étapes suivantes :

- $-2 \times 5$ minutes dans du  $2 \times SSC$  à 42 °C;
- $-2 \times 5$  minutes dans du 0,1×SSC à 42 °C;
- 10 minutes dans du formamide 50% à 42 °C;
- $-2 \times 5$  minutes dans du  $2 \times SSC$  à 42 °C;
- 5 minutes dans du 2×SSC à la température ambiante;
- 7 minutes dans 4×SSCT à la température ambiante.

Après le dernier lavage, les lames sont rincées doucement avec une solution tampon 1×PBS (Sigma – Aldrich Quimica, Madrid, Espagne) et laissées sécher quelques instants à température ambiante sans les assécher en les protégeant de la lumière. Les échantillons sont contre-colorés à la température ambiante et à l'obscurité pendant 10 minutes, dans le Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA); un milieu de montage contenant 500 ng / μL de 4', 6-diamidino-2-phénylindole (DAPI). Les lames sont observées le lendemain. En attendant, elles peuvent être laissées dans le réfrigérateur à 4 °C et à l'abri de la lumière pour une période plus longue. Les observations sont effectuées sur un microscope à épifluorescence Zeiss Axiophot équipé d'un coulisseau portant les filtres d'excitation et d'émission adaptés aux fluorochromes utilisés. Filtre 01 : (excitation 365 nm, émission > 397 nm) pour le DAPI ; filtre 09 (excitation 490 nm, émission 525 nm) pour les marquages 35S (dig-oxygénine) ; filtre 15 (excitation 540 nm, émission 580 nm) pour les marquages 5S (Cy3). Les signaux de fluorescence sont analysés et photographiés au moyen d'une caméra numérique (AxioCam HRm, Zeiss) couplée au microscope. Les

images sont analysées avec Axiovision HR Rev3, version 4.8 (Zeiss) et traitées pour l'uniformité des couleurs, du contraste et de la luminosité dans Adobe Photoshop. Les données sont soumises à la base de données d'ADNr des plantes ; une base regroupant des informations sur le nombre, la position et l'organisation du signal d'ADNr (Garcia *et al.*, 2012a).

#### III.2.3 Estimation de la quantité d'ADN nucléaire par cytométrie en flux

La quantité d'ADN nucléaire est estimée par cytométrie en flux aux Centres Científics i Tecnològics (Universitat de Barcelona). Les analyses sont effectuées sur l'ensemble des populations étudiées, soit 28 populations. Chaque population est analysée en moyenne cinq individus, et pour chaque individu, deux mesures indépendantes sont répétées. Les analyses pour une population donnée sont toutes effectuées le même jour. Les espèces Petunia hybrida Vilm. 'PxPc6' et Pisum sativum L. 'Express long' ayant les quantités 2C respectivement 2,85 et 8,37 pg (Marie et Brown, 1993) sont utilisées comme standards internes. Les semences des standards ont été fournies par l'Institut des Sciences du Végétal (CNRS, Gif-sur-Yvette, France). Des fragments d'environ 1 cm<sup>2</sup> des feuilles fraîches obtenus directement sur le terrain ou à partir d'akènes germés d'Artemisia herba-alba, et de standard interne sont placés dans une boîte de Pétri et coupés finement à l'aide d'une lame de rasoir dans 1200 µL de tampon LB01 (Doležel et al., 1989), et complété avec 100 µg /mL de ribonucléase A (RNase A, Boehringer), afin de libérer les noyaux. Le liquide résultant est filtré à travers une maille de nylon (taille de pores 48 µm), afin d'éliminer les fragments et les grands débris tissulaires. La suspension de noyaux est colorée avec 36 µL d'iodure de propidium (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Espagne; 60 µg / mL) et maintenue sur de la glace pendant 5-20 minutes. Les mesures sont effectuées avec un cytomètre Epics XL (Coulter Corporation, Hialeah, Florida, USA), avec la configuration suivante de l'instrument: L'excitation de l'échantillon est effectuée en utilisant un laser à ion d'argon à 488 nm refroidi à l'air à 15 mW; des signaux du faisceau incident de la diffusion frontale (forward scatter, FSC), de la diffusion latérale (side scatter, SSC) et de la fluorescence rouge (620 nm) (FL3) pour l'iodure de propidium sont obtenus. Le FSC est conventionnellement utilisé pour détecter toutes les cellules. Les cellules colorées sont identifiées en utilisant le détecteur FL3. L'utilisation de ce dernier comme paramètre de détection, permet de jeter toutes les particules qui ne correspondent pas aux noyaux. Afin d'éliminer l'arrière-plan des noyaux, une stratégie consécutive de passage de FCS vs FL3log et SSC vs FL3log a été utilisée. Enfin, l'histogramme linéaire FL3 a été utilisé pour évaluer la teneur en ADN des échantillons. Une mesure par préparation est effectuée, dans laquelle 8000 particules sont analysées, soit un minimum de 2000-3000 pour chaque pic de fluorescence (*Artemisia* et standard). La quantité totale 2C d'ADN est calculée en utilisant la relation linéaire entre échantillon et standard selon la formule ci-dessous (Doležel et Bartos, 2005), en supposant une corrélation linéaire entre les signaux fluorescents des noyaux colorés de l'échantillon inconnu, le standard interne connu et la quantité d'ADN (Doležel, 1991).

- Quantité d'ADN 2C de l'échantillon (pg) =

Moyenne du pic de G1 de l'échntillon (pg)× Quantité d'ADN 2C du standard (pg)

Moyenne du pic de G1 du standard

- Quantité d'ADN 1C de l'échantillon (Mbp) =

valeur 2C de l'ADN échantillon (pg) × 978 Mbp/pg

2

C : correspond à la quantité d'ADN nucléaire haploïde, c'est-à-dire la taille du génome du lot haploïde de chromosomes, avec facteur de conversion : 1 pg = 978 Mbp (Doležel *et al.*, 2003).

A partir de la valeur 2C polyploïde estimée comme décrit ci-dessus, nous avons calculé la valeur monoploïde 1Cx en divisant cette dernière par le niveau de ploïdie (Greilhuber *et al.*, 2005).

## > Analyses statistiques

Des analyses statistiques de corrélations et de la variance à un seul facteur (ANOVA) sont utilisées pour analyser les différents paramètres caryomorphologiques et cytogénétiques (LTC, 1Cx, 2C, 2n) mesurées. Des tests de Bonferroni pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des groupes sont également effectués.

Une analyse en composante principale (ACP) a été appliquée aux données cytogénétiques (1Cx, 2C, 2n) et écoclimatiques (tm, P/ETP) recueillies. Toutes les données ont fait l'objet d'une matrice de corrélations.

Les analyses statistiques ont été réalisées avec XLSTAT-Pro, v.7.5.2 (Addinsoft) et le logiciel STATISTICA v6.

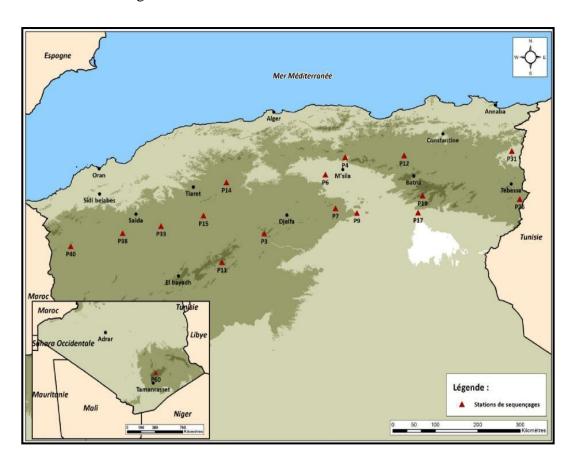
## III.2.4 Étude phylogénétique et phylogéographique

#### III.2.4.1 Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est effectuée selon la méthode de Doyle (1991) avec des modifications selon Soltis et al. (1991) et Cullins (1992). L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des feuilles d'Artemisia herba-alba issues de 17 populations représentatives de l'ensemble des populations étudiées (Figure 23), récoltées à l'état frais et conservées dans le silica-gel. Une moyenne de cinq individus par population sont analysés. Pour chaque individu, 10 à 20 mg sont broyés dans un tube Eppendorf, en utilisant un dispositif de broyage mécanique (Retsch GmbH). 500 µL du tampon CTAB (Annexe 2) sont ajoutés à chaque tube. Les tubes sont ensuite incubés dans un bain marie à 55 °C pendant une heure avec une agitation manuelle des tubes chaque 15 minutes. Les échantillons sont ensuite refroidis dans un bac de glace pendant 1 minute. Un mélange de 500 µL de chloroforme : alcool iso-amylique (24 : 1) est ajouté à chaque tube et centrifugés à 13 300 tpm pendant 5 minutes. Ceci produit deux phases, une phase aqueuse supérieure qui contient l'ADN, et une phase chloroforme inférieure qui contient certaines protéines dégradées, des lipides et de nombreux composés secondaires. L'interface entre ces deux phases contient la plupart des débris cellulaires, de nombreuses protéines dégradées, etc. Le surnageant est récupéré est transféré dans un nouveau tube d'Eppendorf. Cette étape est répétée pour une deuxième fois en ajoutant 500 µL de chloroforme : alcool isoamylique (24 : 1), et à nouveau centrifugée pendant 5 minutes à 13 300 tpm. Encore une fois, le surnageant est récupéré et transféré dans un nouveau tube d'Eppendorf. Pour précipiter l'ADN, on a ajouté dans chaque tube, de l'acétate d'ammonium 7,5M (0,08 volume de l'acétate d'ammonium 7,5M pour 1 volume de surnageant ; 0,08v : 1v) et de l'isopropanol froid (0,54 volume de l'isopropanol pour 1 volume de surnageant ; 0,54v : 1v). Les tubes sont agités doucement et placés pendant une nuit dans le congélateur à - 20 °C. Le lendemain, les échantillons sont centrifugés à 13 300 tpm pendant 3 minutes, et le surnageant est retiré avec une pipette Pasteur avec soin afin de ne pas perdre l'ADN précipité. Deux lavages avec l'éthanol sont effectués. Dans le premier lavage, 700 µL de l'éthanol 70% sont ajoutés à chaque tube. Les tubes bien fermés sont agités fortement en les tapotant sur la paillasse en

position verticale afin de faire remonter l'ADN précipité. Une centrifugation à 13 300 tpm pendant 3 minutes est effectuée, et l'éthanol est retiré des tubes avec une pipette Pasteur. Le deuxième lavage a été effectué de la même manière avec de l'éthanol 96%. Les échantillons sont ensuite séchés sous vide pendant 40 à 60 minutes. L'ADN est remis en suspension par addition de 50 μL du tampon TE (Annexe 2) pour chaque tube, et laissé incubés dans un bain marié à 50 °C pendant 30 à minutes, avec une agitation manuelle des tubes chaque 8 minutes, en tapotant doucement le bout du tube par le doigt, afin de mélanger le contenu du tube. Après cette étape, 05 μL de RNAase sont ajoutés pour chaque tube, et les échantillons sont incubés à 37 °C pendant 30 à 40 minutes.

La concentration et la qualité de l'ADN sont déterminées avec un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Les valeurs de concentrations varient de 51,5 ng/µL à 2880 ng/µL, ce qui nécessiterait de faire des dilutions lors de l'amplification. Après extraction, les échantillons de l'ADN génomique sont conservés dans le réfrigérateur.



**Figure 23 :** Carte de distribution des populations d'*Artemisia herba-alba* retenues pour l'étude phylogénétique

## III.2.4.2 Amplification par PCR

Afin de déterminer les régions d'ADN les plus polymorphes à analyser, des réactions test par PCR (**P**olymerase Chaine **R**eaction) et de séquençages de vingt régions de l'ADN chloroplastique (ADNcp) et de l'ADN nucléaire (Tableau 7) sont effectuées sur quatre populations (P14, P17, P26 et P40) représentatives géographiquement des populations étudiées, à raison de deux individus par population. A la fin de ces réactions test, deux régions chloroplastiques sont montrées polymorphes, et par conséquent, ont été retenues pour l'étude phylogénétique. Il s'agit des régions *rpl32-trn*L et *trnV-ndh*C.

**Tableau 7 :** Régions de l'ADN chloroplastique et de l'ADN nucléaire testées

Régions chloroplastiques	Régions nucléaires
- rpL32-trnL	- 26sF-5slF
- ndhC-ndhcINT3R	- Agt1F-Agt1R
- petN1-psbMR	- ArobF-ArobR
– psbA-trnH	- Chr(1a)F-Chr(1a)R
- psbeF-petlR	- ETSS18-EFSF1
- ndhF-rpl32R	- ITS1-ITS4
- rpS15-ycF1	
- rps16F-rps16R	
- rps2F2-trnK	
- trnC-trncR	
- trns2F-trns4R	
- trnS-trncR	
- trnV- ndhC	
– trnV-ndhc2F	

Les réactions d'amplification par PCR des deux régions *rpl32-trn*L et *trnV-ndh*C sont effectuées dans un volume réactionnel total de 25 μL contenant: 2,5 μL de MgCl2 (25 mM), 2,5 μL du tampon PCR (Life Technologies, USA), 2,5 μL de dNTP (1mM), 14,3 μL d'eau bidistillée, 0,2 μL de Taq polymérase (Sigma), 1μL d'ADN génomique dilué à une concentration de 25 ng/μL et 1 μL (5 μm) de chacune des deux amorces correspondantes à la région à amplifier. L'amplification est réalisée en utilisant différents thermocycleur [S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA), PTC-200 (MJ Research Inc., Massachusetts, USA), FlexCycler (Analytik Jena, Germany), G-Storm (GRI Labcare, Essex, Royaume Unit].

Les différents cycles de température pour la réaction de PCR sont réalisés selon le programme de Shaw *et al.*(2007), dont les étapes sont résumées comme suit: i) dénaturation initiale de l'ADN à 80 °C pendant 5 minutes, suivie de, ii) 30 cycles d'amplification ; chaque cycle comprend une dénaturation à 95 °C pendant 1 minute, une hybridation à 50 °C pendant 1 minute, et une élongation à 65 °C pendant 3 minutes, iii) une élongation finale à 65 °C pendant 5 minutes a été appliquée. Le Tableau 8 résume les différentes étapes du programme adopté de la PCR

**Tableau 8 :** Programme d'amplification par PCR

Temps	Température	Phase	
5 minutes	80 °C	Dénaturation initiale	
1 minute	95 °C	Dénaturation	
1 minute	50 °C	Hybridation 30 cycles	
3 minutes	Grimpe 0,3°C/sec. Jusqu'à 65 °C	Elongation	
5 minutes	65 °C	Elongation	finale

Les solutions (produit de l'amplification) des différents échantillons sont conservées à 4 °C jusqu'à leur utilisation dans les étapes qui suivent.

## III.2.4.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse à travers le gel d'agarose est une méthode utilisée de façon standard pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN. La position de l'ADN dans le gel peut être déterminée en utilisant un agent intercalant ou fluorescent, ce dernier lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent. L'électrophorèse sur gel d'agarose est nécessaire avant de passer au séquençage, car elle nous permettra, de vérifier le succès de l'amplification de l'ADN par PCR. Après chaque amplification par PCR, un échantillon de produit d'amplification (amplifiat) pour chaque individu est analysé par électrophorèse sur des gels d'agarose 1,2% (Annexe 2). L'ADN est révélé grâce au SYBR Safe DNA Gel Stain (ThermoFisher Scientific) à concentration 10 000× dans DMSO, qu'est un agent fluorescent couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique lors de la réalisation de la PCR quantitative.

Dans chaque puits du gel, on dépose un volume total de 6  $\mu$ L composé de : 3  $\mu$ L du produit d'amplification, 2  $\mu$ L d'eau distillée et 01  $\mu$ L de bleu de méthylène ; un colorant dont la charge permettra un bon enfoncement du dépôt dans le puits du gel et la bonne visualisation

de l'avancement de l'électrophorèse. La migration des composants de l'électrophorèse est effectuée dans une unité d'électrophorèse remplie du Tampon 1×TBE (Annexe 2), sous une tension de 100 Volts pendant 25 minutes. Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur à UV couplé avec un appareil photo afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes et d'effectuer une prise de vue.

## III.2.4.4 Séquençage de l'ADN

Après l'amplification de l'ADN par PCR, un séquençage des deux régions chloroplastiques retenues (*rpl*32-*trn*L et *trn*V-*ndh*C) est effectué pour chaque individu (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Séquences d'amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage par PCR (Shaw *et al.*, 2007)

Région	Amorce	Séquence (5' - 3')
rpl32-trnL	rpL32-F trnL <sup>(UAG)</sup>	CAG TTC CAA AAA AAC GTA CTT C CTG CTT CCT AAG AGC AGC GT
trnV-ndhC trnV (UAC)x2 ndhC		GTC TAC GGT TCG ART CCG TA  TAT TAT TAG AAA TGY CCA RAA AAT ATC ATA TTC

Les réactions de séquençage sont effectuées dans un volume réactionnel total de 20 μL composé de : 1 μL de l'ADN amplifié, 3μL du tampon de séquençage qui comprend aussi la *Taq* polymérase (kit AmpliTaq DNA polymerase avec Tampon II de Life Technologies, USA), 1 μL de l'amorce correspondante, 1 μL du mix (kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 de Life Technologies, USA) et 14 μL de l'eau bi-distillée, en utilisant les mêmes thermocycleurs utilisés dans l'amplification. Un programme de réactions de séquençage couramment utilisé dans le laboratoire de l'Institut Botanique de Barcelone a été utilisé. Ce programme comprend une dénaturation initiale à 96 °C pendant 1 minute, suivie de 25 cycles. Chaque cycle comprend: i) Dénaturation à 96 °C pendant 10 secondes, ii) Hybridation à 50 °C pendant 5 secondes et iii) Elongation à 60 °C pendant 4 minutes. A la fin des réactions, et en attendant de les faire passer au séquenceur, les échantillons sont conservés pour une courte durée (1-2 jours) dans le congélateur. Le séquençage des nucléotides est réalisé au niveau du centre Científics i Tecnològics (Universitat de Barcelona) sur un analyseur d'ADN ABI PRISM 3700 (PE Biosystems, Foster City, CA, USA).

## III.2.4.5 Analyses des données phylogénétiques et phylogéographiques

Le nombre total des individus analysés pour l'ensemble des populations étudiées est de 84 ; ce nombre varie, selon la disponibilité du matériel végétal et la réussite inégale de l'extraction d'ADN, entre 4 et 7 individus par population (Tableau 10). Les séquences nucléotidiques sont éditées en utilisant le programme Chromas Lite v2.1.1.0 (Technelysium Pty Ltd), et alignées manuellement avec le programme BioEdit v7.2.3. (Hall, 1999). Les haplotypes de l'ADN chloroplastique sont déterminés en utilisant le nombre et la position des substitutions nucléotidiques. De plus, en utilisant le programme FastGap v1.2 (Borchsenius, 2009), les insertions / délétions plus longues qu'une paire de bases sont recodées en tant que mutations de paires de bases simples et donc les gaps de séquences sont traitées comme un état de cinquième caractère.

**Tableau 10 :** Nombre d'individus analysés par population pour les deux régions chloroplastiques (*rpl32-trn*L et *trnV-ndh*C)

Population	Nombre individus	Population	Nombre individus
Р3	5	P17	5
P4	5	P19	5
P6	5	P26	5
P7	5	P31	5
P9	4	P33	5
P11	5	P38	5
P12	5	P40	4
P14	4	P60	7
P15	5	/	/
Total	43	1	41

Un réseau d'haplotypes basé sur la parcimonie statistique a été construit en utilisant le programme TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000). La diversité génétique est analysée en utilisant le programme DnaSP v5 (Librado et Rozas, 2009); des indices de diversité intra-population (le nombre de sites polymorphes (S), et d'haplotypes (h), la diversité haplotypique (Hd), le nombre moyen de différences nucléotidiques entre paires de séquences (K) et la diversité nucléotidique avec correction de Jukes et Cantor ( $\pi$ )) ont été calculés pour chaque population.

Afin de tester la présence de la structure phylogéographique dans les ensembles de données des populations étudiées, nous avons mesuré et comparé les paramètres *Gst* et *Nst* selon les méthodes décrites par Pons et Petit (1995, 1996) en utilisant le programme Permut et CpSRR v1.2.1 (Pons et Petit 1996). Le paramètre *Gst* repose uniquement sur les fréquences d'haplotypes, alors que *Nst* prend également en compte la relation génétique entre les haplotypes. Le pattern de distribution des haplotypes au sein des populations examinées est inféré par le programme Arlequin v3.5. Un *Nst* > *Gst* indique généralement la présence d'une structure phylogéographique (Pons et Petit, 1996; Petit *et al.*, 2005), c'est-à-dire que les haplotypes étroitement liés du point de vu évolutif sont plus souvent trouvés dans la même zone que les haplotypes moins proches.

Une inférence bayésienne a été réalisée à l'aide MrBayes v 3.1.2 (Ronquist et Huelsenbeck, 2003). Le meilleur modèle évolutif de substitutions nucléotidiques sélectionné avec jModeltest v2.1.2 (Posada, 2008, Guindon et Gascuel, 2003) en utilisant les informations du critère Akaike (AIC) a été F8I+G. Pour chaque analyse, quatre chaînes de Markov ont été exécutées simultanément pour  $10x10^6$  générations, et celles-ci ont été échantillonnées toutes les 100 générations. Les données des 10 000 premières générations ont été rejetées comme étant la période de *burn-in* dans chaque analyse, et les échantillons groupés restants ont été utilisés pour construire les règles de la majorité des arbres de consensus 50% et de calculer la probabilité a posteriori (PP) de nœuds. L'arbre phylogénétique a été généré à l'aide du logiciel FigTree v1.4.0 (Rambaut, 2012) et édité avec le programme Inkscape v0.91 (https://inkscape.org/).

## **Chapitre IV**

# Résultats et Discussions

#### IV. Résultats et discussions

#### IV.1 Résultats

## IV.1.1 Étude caryologique

Les résultats de l'estimation de la taille du génome par cytométrie en flux que nous allons voir en détails dans le chapitre III, ont montré l'existence de deux groupes d'individus selon les valeurs de leurs quantités d'ADN nucléaire « 2C », le premier groupe renferme des individus ayant des quantités d'ADN nucléaire « 2C » comprise entre 5,39 pg et 7,18 pg et le deuxième groupe des individus contenant approximativement le double des quantités précédentes avec des valeurs moyennes comprises entre 11,62 pg et 13,84 pg.

Le dénombrement chromosomique, l'établissement des caryotypes et des idiogrammes sont effectués sur trois populations représentatives des deux groupes détectés par cytométrie en flux : i) Population P17 du premier groupe (2C = 6,84 pg), poussant dans la région de Biskra sur une altitude de 545 m à climat aride inférieur à hiver tempéré ; ii) Population P26 du deuxième groupe (2C = 11,70 pg), poussant dans la région de Tébessa sur une altitude de 1017 m à climat aride supérieur à hiver frais ; iii) Population P6 de la région de Zeraraka, située sur une altitude de 550 m à climat aride supérieur à hiver tempéré, dont certains individus appartenant au premier cytotype (2C = 6,87 pg) et d'autres individus au deuxième cytotype (2C = 12,60 pg).

#### IV.1.1.1 Nombre de chromosomes

La coloration des apex racinaires à l'orcéine 2% a montré l'existence de deux nombres chromosomiques somatiques (2n) significativement différents chez *Artemisia herba-alba*; 2n = 18 chromosomes confirmé chez la population P17, et 2n = 36 chromosomes chez la population P26. Alors que chez la population P6, deux nombres chromosomes; 2n = 18 et 2n = 36 ont été observés.

Considérant les deux nombres x = 9 et x = 8 comme nombres chromosomiques de base chez le genre *Artemisia*, avec des niveaux de ploïdie allant de diploïde à dodécaploïde pour x = 9 et de diploïde à hexaploïde pour x = 8 (Vallès et McArthur, 2001; Vallès *et al.*, 2005; Pellicer *et al.*, 2007; Vallès *et al.*, 2011), et d'après les résultats de l'estimation de la quantité d'ADN nucléaire et le dénombrement chromosomique, nous pouvons déduire que le nombre de base chez les populations échantillonnées est x = 9, et que les individus du premier groupe sont les

diploïdes (2n = 2x = 18), et ceux du deuxième groupe, sont les tétraploïdes (2n = 4x = 36). Ceci nous permettra de répertorier les 28 populations étudiées en deux cytotypes selon le nombre de chromosomes avec deux niveaux de ploïdies différents.

- Cytotype diploïde (2n = 2x = 18) comprend 6 populations
- Cytotype tétraploïde (2n = 4x = 36) comprend 20 populations.

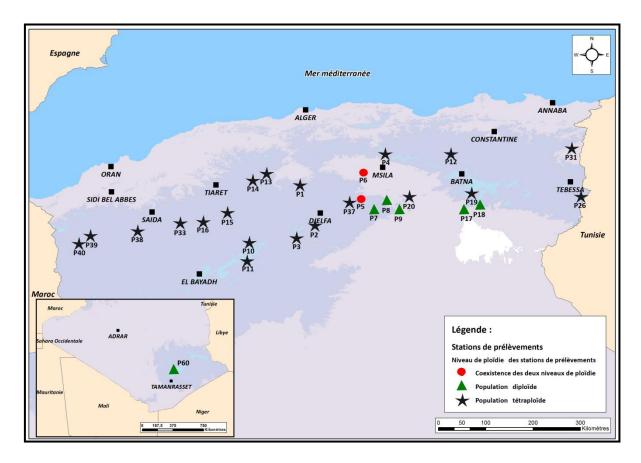
Les populations P5 et P6 sont caractérisées par la coexistence des deux cytotypes ; diploïde (individus P5d, P6d) et tétraploïde (individus P5t, P6t).

Les détails des nombres chromosomiques de l'ensemble des populations échantillonnées sont récapitulés dans le Tableau 11, et leur distribution géographique est illustrée dans la Figure 24.

**Tableau 11:** Récapitulatif des nombres de chromosomes et des conditions stationnelles des populations échantillonnées d'*Artemisia herba-alba* 

		Nombre de	Condition	ns stationnelles
Pop.	Localisation	chromosomes (2n)	Altitude	Climat*
P1	Ain Oussera (W. Djelfa)	36	780 m	ASf
P2	Oued Sedar (W.Djelfa)	36	1270 m	ASff
Р3	Ben-Hamed (W.Djelfa)	36	1220 m	ASf
P4	El-Euch (W. B. Bou Arreridj)	36	724 m	SAIf
P5	El-Hamel (W. M'sila)	18 - 36	960 m	ASt
P6	Zerarka (W. M'sila)	18 - 36	550 m	ASt
P7	Mohamed Boudiaf (W.M'sila)	18	883 m	ASf
P8	Ben-Srour (W. M'sila)	18	700 m	ASf
P9	Ouled Slimane (W. M'sila)	18	600 m	AIf
P10	Gueltet Sidi Saad (W. Laghouat)	36	1210 m	ASf
P11	Sebgag (W. Laghouat)	36	1380 m	SAIff
P12	Hammam soukhna (W. Sétif)	36	925 m	SAIf
P13	Bouaiche (W. Médéa)	36	870 m	SAIf
P14	Rechaiga (W. Tiaret)	36	871 m.	SAIf
P15	Ain Dheb (W. Tiaret)	36	1100 m	SAIf
P16	Sidi Abderrahmane (W. Tiaret)	36	1050 m	SAIf
P17	Baniane (W. Biskra)	18	545 m	AIt
P18	Tifelfal (W. Batna)	18	845 m.	ASf
P19	Arris (W. Batna)	36	970 m	SAIf
P20	Zerzour (W. Batna)	36	575 m	AIt
P26	Oum Ali (W. Tébéssa)	36	1017 m	ASf
P31	Taoura (W. Souk-Ahras)	36	626 m	SASf
P33	Ain Skhouna (W. Saida)	36	1072 m	SAIf
P37	Slim (W. M'sila)	36	1020 m	ASf
P38	Ras El-Maa (W. S. B. Abbès)	36	1202 m	SAIf
P39	Tarziza (W. S. B. Abbès)	36	1257 m	SAIf
P40	Laaricha(W. Tlemcen)	36	1265 m	SAIff
P60	Tazrouk (W. Tamanrasset)	18	1800 m	HASt

<sup>\*</sup> signification des symboles des étages bioclimatiques : voir matériel et méthodes



**Figure 24 :** Distribution géographique des deux cytotypes d'*Artemisia herba-alba* (2n = 2x = 18 et 2n = 4x = 36) sur la carte géographique de l'Algérie

# IV.1.1.2 Étude du caryotype

Les détails des données morphométriques et les types chromosomiques des quatre caryotypes issus des trois populations analysées (P6, P17 et P26) sont récapitulées dans les tableaux 35, 36, 37 et 38 en Annexe 3.

Un résume des résultats des données morphométriques des caryotypes de ces trois populations est consigné dans le Tableau 12. L'examen de ces résultats montre que :

Le caryotype du cytotype diploïde est constitué de 9 paires chromosomiques ; 8 paires métacentriques et une (1) paire submétacentrique pour la population P17 (chromosome  $n^{\circ}$  5), et 6 paires métacentriques et 3 paires submétacentrique pour les individus diploïdes de la population P6 (P6d) (chromosomes  $n^{\circ}$ 4, 8 et 9). La longueur totale du caryotype varié entre 34,85 µm (P17) et 40,69 µm (P6d), avec une longueur totale des chromosomes comprise entre 3,30 µm et 4,79 µm.

Le caryotype du cytotype tétraploïde (2n = 4x = 36) représenté par la population P26 et les individus tétraploïdes de la population P6 (P6t) est constitué de 18 paires chromosomiques ; 12 paires métacentriques et 6 paires submétacentriques, mais avec une différence dans l'ordre d'emplacement des chromosomes submétacentrique entre les deux caryotypes (P26 : paires n° 3, 8, 9, 13, 14, 18 ; P6t : paires n° 6, 10, 11, 15, 16, 18). La longueur totale du caryotype varié entre 51,56  $\mu$ m (P26) et 76,08  $\mu$ m (P6t), avec une longueur totale des chromosomes comprise entre 2,44  $\mu$ m et 4,68  $\mu$ m.

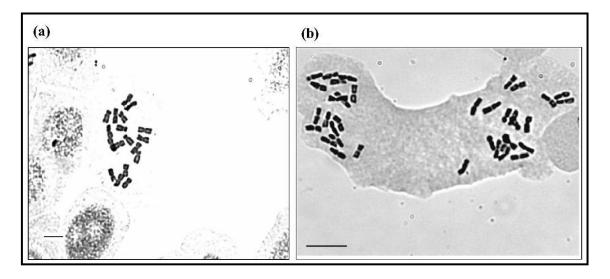
Les caryotypes des deux cytotypes sont dépourvus de chromosomes B, et leurs chromosomes ne présentent pas d'extrémités satéllifères.

**Tableau 12:** État comparatif des données morphométriques des caryotypes des trois populations d'*Artemisia herba-alba* analysées

Pop.	2 <i>n</i>	Niveau de ploïdie	LMC (µm)	Intervalle des longueurs chromosomiques (µm)	LTC (µm)	Type chromosomique
P6	18	2 <i>x</i>	4,52	4,29 – 4,79	40,69	6m + 3sm
P6	36	4 <i>x</i>	4,23	3,74 - 4,68	76,08	12m + 6sm
P17	18	2x	3,87	3,30-4,28	34,85	8m + 1sm
P26	36	4 <i>x</i>	2,86	2,44 - 321	51,56	12m + 6sm

**Légende : Pop** = Population ; 2n = Nombre de chromosomes dans les cellules somatiques ; LMC = Longueurs moyennes des chromosomes ; LTC = Longueur totale du caryotype ; m = métacentrique ; sm = submétacentrique.

Le calcul des données numériques des caryotypes ont permis d'élaborer les idiogrammes haploïdes selon la longueur décroissante des chromosomes des deux cytotypes de la population P6 (Figures 25, 26 et 27).



**Figure 25:** Métaphases somatiques : **a)** individu diploïde, **b)** individu tétraploïde (les deux individus issus de la population P6)

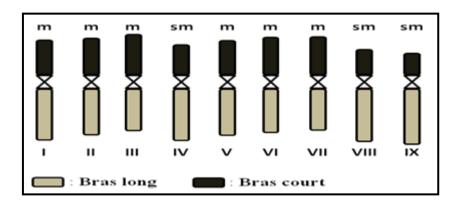
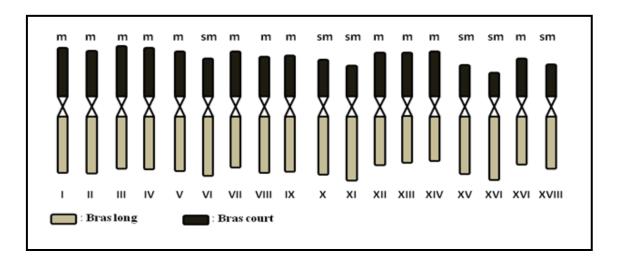


Figure 26: Idiogramme du cytotype diploïde (Population P6)



**Figure 27 :** Idiogramme du cytotype tétraploïde (Population P6)

# IV.1.1.3 Étude de l'asymétrie du caryotype

Les résultats de l'étude d'asymétrie des caryotypes sont présentés dans le Tableau 13. L'asymétrie intra-chromosomique est évaluée par les deux indices d'asymétrie intra-chromosomique « IAs » et « A1 ». Les valeurs des deux indices (IAs = 57,19% - 59,10%, A1 = 0,24-0,29) calculées pour les quatre caryotypes, sont relativement faibles et indiquent, en conséquence une structure symétrique des chromosomes. Les indices d'asymétrie inter-chromosomiques (R et A2) présentent aussi de faibles valeurs (A2 = 0,03- 0,07, R = 1,11 – 1,31), et indiquant en conséquence, des caryotypes symétriques. Les résultats de la classification des caryotypes selon leurs degrés d'asymétrie de Stebbins (1971), et qui tient compte les deux types d'asymétrie à la fois (intra et inter-chromosomique), placent tous les caryotypes dans la classe 2A symétrique.

**Tableau 13 :** Résumé des données de symétrie des caryotypes des trois populations analysées d'*Artemisia herba-alba* 

Population	2 <i>n</i>	Niveau de ploïdie	Formule chromosomique <sup>1</sup>	IAs%	R	A1	A2	Classe Stebbins <sup>2</sup>
P6	18	2x	6m+3sm	59,10	1,11	0,29	0,03	2A
P6	36	4 <i>x</i>	12m+6sm	57,58	1,29	0,25	0,06	2A
P17	18	2x	8m+1sm	57,19	1,25	0,24	0,07	2A
P26	36	4 <i>x</i>	12m+6sm	57,50	1,31	0,25	0,07	2A

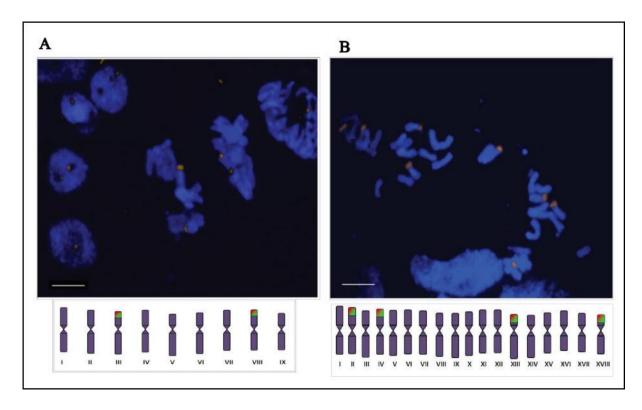
**Légende:** <sup>1</sup>Formule chromosomique selon Levan *et al.* (1964); **m**: métacentrique; **sm**: submétacentrique; **IAs** % =  $(\sum BL/\sum LTC)$  x 100 (Arano et Saito, 1980), **A1** = Indice d'asymétrie intra-chromosomique (Romero-Zarco, 1986); **A2** = Indice d'asymétrie inter chromosomique (Romero-Zarco, 1986); **R** = Rapport entre la plus grande et la plus petite des paires chromosomiques (Siljak-Yakovlev, 1996); <sup>2</sup>Classe de symétrie selon Stebbins (1971).

# IV.1.2 Étude de la cartographie physique de l'ADNr

Les analyses de FISH (Tableau 14, Figure 28), ayant pour but la caractérisation des nombres des gènes ribosomiques 5S et 35S ainsi que leur localisation sur les chromosomes, réalisées pour la première fois sur des matériaux Algériens d'*Artemisia herba-alba*, ont permis de détecter 4 signaux (2 *loci*) dans le cytotype diploïde et 8 signaux (4 *loci*) dans le cytotype tétraploïde. L'utilisation simultanée des sondes d'ADNr 5S et 35S a mis en évidence une colocalisation de type-L (lié) sur les mêmes sites chromosomiques des deux *loci* d'ADNr 5S et 35S.

**Tableau 14 :** Nombre de *loci* de l'ADN ribosomiques 5S et 35S, détectés par la technique de l'hybridation *in situ* fluorescente dans les deux cytotypes d'*Artemisia herba-alba* 

Population	2 <i>n</i>	Niveau de ploïdie	Formule chromosomique	ADNr
P17	18	2 <i>x</i>	8m+1sm	2
P26	36	4x	12m+6sm	4



**Figure 28 :** Plaques métaphasiques d'*Artemisia herba-alba* après FISH à double cible à l'aide de deux sondes d'ADNr 5S (signaux verts) et 35S (signaux oranges), avec des idiogrammes haploïdes montrant l'emplacement de type-L (lié) de l'ADNr dans un individu diploïde (A) et un individu tétraploïde (B) des populations P17 et P26 respectivement.

# IV.1.3 Estimation de la taille du génome

L'estimation de la taille du génome par cytométrie en flux évaluée pour la première fois chez 28 populations algérienne d'Artemisia herba-alba, a permis de distinguer deux groupes (cytotypes) d'individus selon les valeurs de leurs quantités d'ADN nucléaire (2C) dans les noyaux non répliqués des cellules somatiques. Le premier groupe présent dans 8 populations, et marqué par des valeurs moyennes extrêmes comprises entre 5,39 et 7,18 pg, et le deuxième groupe présent dans 22 populations dont la taille moyenne du génome 2C représente approximativement le double des valeurs précédentes (1,99 fois), avec des valeurs moyennes extrêmes comprises entre 11,62 et 13,84 pg (Tableau 15). Cette estimation a montré aussi que deux populations (P5 et P6) parmi cet ensemble, contiennent à la fois des individus appartenant au premier groupe (P5d, P6d) et d'autres au deuxième groupe (P5t, P6t). Le dénombrement des chromosomes (chapitre I) effectué pour trois populations représentatives (P6, P17, P26) nous a permis de conclure que les individus du premier groupe représentent le cytotype diploïde (2n = 2x = 18) et ceux du deuxième groupe représentent le cytotype tétraploïde (2n = 4x = 36). Dans le Tableau 16, sont récapitulées les données relatives aux quantités moyennes de l'ADN nucléaire et aux nombres de chromosomes correspondants dans les cellules somatiques chez les 28 populations d'Artemisia herba-alba étudiées. La Figure 29 illustre la séparation des deux cytotypes selon leurs quantités d'ADN nucléaire holoploïde (2C).

**Tableau 15 :** État descriptif des valeurs moyennes des quantités d'ADN 2C (pg) des deux cytotypes d'*Artemisia herba-alba* 

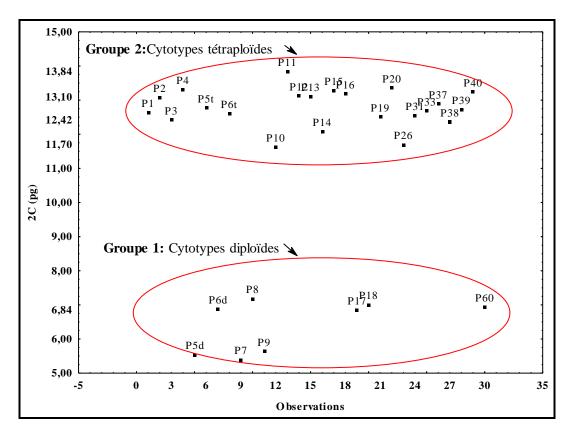
Cytotype	Nombre de cytotypes	Moyenne	Minimum	Maximum	Écart-type
Diploïde	8	6,42	5,39	7,18	0,76
Tétraploïde	22	12,77	11,62	13,84	0,54

**Tableau 16 :** Quantités d'ADN nucléaire moyenne et nombres de chromosomes correspondants dans les cellules somatiques chez les 28 populations d'*Artemisia herba-alba* étudiées

Code	$2n^2$	2C <sup>3</sup> ±SD (pg)	1C <sup>4</sup> (Mbp)	1Cx <sup>5</sup> (pg)	HPCV <sup>6</sup>	HPCV <sup>6</sup>
P1	36	$12,63\pm0,70$	6177,93	3,16	2,89±0,35	2,68±1,38
P2	36	$13,07\pm0,37$	6391,03	3,27	$1,22\pm0,99$	$0,98\pm1,08$
Р3	36	$12,42\pm0,12$	6071,62	3,10	$4,\!04\pm0,\!60$	$3,10\pm1,40$
P4	36	$13,31\pm0,28$	6509,05	3,33	$1,\!26\pm0,\!97$	$0,72\pm0,62$
P5	18	$5,54\pm0,13$	2707,46	2,77	$3,89\pm0,47$	3,01±0,87
	36	12,76±0,36	6240,95	3,19	$0,69\pm0,64$	$5,14\pm0,67$
P6	18	$6,87\pm0,21$	3359,48	3,43	$2,16\pm1,08$	$5,67\pm1,89$
	36	$12,60\pm0,35$	6162,70	3,15	$0,65\pm0,55$	$7,31\pm1,69$
P7	18	$5,39\pm0,07$	2636,78	1,35	2,80±0,29	2,71±0,37
P8	18	$7,18\pm0,25$	3509,93	1,79	$3,32\pm1,00$	$4,20\pm2,92$
P9	18	$5,64\pm0,79$	2755,62	1,41	$3,32\pm1,00$	$4,20\pm2,92$
P10	36	$11,62\pm0,26$	5684,45	2,91	3,06±0,63	$3,37\pm2,29$
P11	36	$13,84\pm0,85$	6767,95	3,46	$1,59\pm1,32$	$1,15\pm1,09$
P12	36	$13,12\pm0,46$	6415,62	3,28	$0,55 \pm 0,64$	4,51±1,70
P13	36	$13,10\pm0,24$	6404,85	3,27	$2,69\pm0,81$	$2,39\pm0,69$
P14	36	$12,07\pm0,39$	5903,78	3,02	$3,28\pm0,53$	$1,43\pm0,99$
P15	36	$13,29\pm0,47$	6498,83	3,32	$3,25\pm0,57$	4,01±2,15
P16	36	$13,18\pm0,88$	6445,06	3,30	$1,24\pm1,03$	$1,24\pm1,25$
P17	18	$6,84\pm0,09$	3346,53	1,71	3,01±0,42	$2,89\pm0,52$
P18	18	$7,01\pm0,24$	3427,19	1,75	$3,36\pm0,58$	$2,87\pm0,75$
P19	36	$12,51\pm0,54$	6116,22	3,13	2,30±0,98	$1,59\pm1,03$
P20	36	$13,35\pm0,26$	6526,52	3,34	$2,82\pm0,85$	$2,96\pm0,70$
P26	36	$11,70\pm0,31$	5719,04	2,92	$2,45\pm1,08$	$3,62\pm0,62$
P31	36	$12,54\pm0,56$	6131,58	3,13	2,59±0,66	1,96±1,16
P33	36	$12,68\pm0,84$	6198,10	3,17	1,13±1,01	$4,55\pm0,64$
P37	36	$12,88\pm0,25$	6300,29	3,22	1,97±1,09	$3,45\pm0,82$
P38	36	12,36±0,40	6042,61	3,09	$0,37\pm0,43$	$5,03\pm0,56$
P39	36	$12,72\pm0,23$	6220,04	3,18	$0,96\pm0,31$	$5,28\pm1,14$
P40	36	$13,24\pm0,64$	6473,81	3,31	$0,18\pm0,15$	$4,25\pm2,50$
P60	18	6,93±0,21	3390,99	1,73	1,91±0,45	3,75±0,92

**Notes:** <sup>1</sup>Les nombres des populations sont les mêmes que sur la Figure 20, <sup>2</sup>Nombre de chromosomes dans les cellules somatiques, <sup>3</sup>La teneur en ADN nucléaire holoploïde en pg (valeur 2C ± écart type), <sup>4</sup>Teneur en ADN nucléaire en Mbp; 1pg = 978 Mbp (Doležel *et al.*, 2003), <sup>5</sup>Taille du génome monoploïde, <sup>6</sup>Coefficient de variation du demi-pic (HPCV)

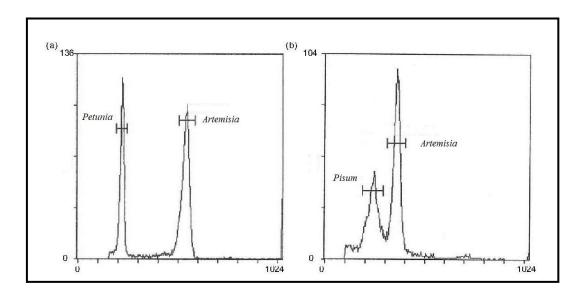
pour les évaluations cytométriques en flux, réalisé avec *Pisum* comme standard (voir Matériel et méthodes pour plus de détails)



**Figure 29 :** Séparation des populations étudiées en deux groupes selon les valeurs de leurs quantités d'ADN nucléaire (2C) en pg.

Les valeurs extrêmes moyennes des quantités d'ADN nucléaire par génome monoploïde « 1Cx » dans l'ensemble des populations (28 populations) varient entre 2,70 et 3,59 pg. Ces valeurs ont été calculées chez les deux populations diploïdes P7 et P8 respectivement.

L'allure symétrique des histogrammes d'intensités de fluorescence (Figure 30) illustre une analyse équitable, traduisant une qualité de suspension nucléaire propre. Les valeurs moyennes des coefficients de variation de demi-pic (HPCV) pour la plante *Artemisia herba-alba* (CV = 2,16 %) et le standard (*Pisum sativum*) (CV = 3,33 %) sont bien en-dessous du seuil de 5% de Doležel et Bartos (2005) pour que les résultats soient acceptables.



**Figure 30 :** Histogrammes d'intensité de fluorescence utilisant l'iodure de propidium pour les évaluations des tailles du génome par cytométrie en flux de: a) *Artemisia herba-alba* (individu diploïde de la population P6 (P6d); 2C = 6,87 pg) avec le standard interne *Petunia* (2C = 2,85 pg); b) *Artemisia herba-alba* (individu tétraploïde de la population P15; 2C = 13,29 pg) avec le standard interne *Pisum* (2C = 8,37 pg).

# IV.1.3.1 Relation entre le niveau de ploïdie, la longueur totale du caryotype et la taille du génome

Afin d'explorer les relations entre la quantité d'ADN nucléaire (2C) et les paramètres morphométriques des caryotypes, une analyse de corrélation a été effectuée entre les valeurs de « 2C » et les deux paramètres : niveaux de ploïdie (2n) et longueurs totales des caryotypes (LTC) des trois populations analysées (Tableau 17) (voir données des populations dans le Tableau 12). Les résultats montrent une très bonne corrélation significative (r = 0.98, P = 0.007) entre les valeurs de 2C et le niveau de ploïdie (2n). De même, une corrélation positive (r = 0.89) mais statistiquement non significative (P = 0.11) a été observée entre 2C et la longueur totale du caryotype (LTC)

**Tableau 17:** Corrélations (r) entre la quantité d'ADN nucléaire (2C) et le niveau de ploïdie (2n) et la longueur totale du caryotype (LTC) au seuil de signification 95% dans les trois populations (P6, P17, P26) d'*Artemisia herba-alba* analysées

Taille du génome	2n	LTC
2C	r = 0,98	r = 0,89
20	P = 0.007	P = 0.11

# IV.1.3.2 Effets des facteurs du milieu physique sur les variations des paramètres cytogénétiques 2C et 1Cx et le niveau de ploïdie (2n)

Deux facteurs relatifs au milieu physique sont retenus dans cette étude : i) Le facteur station qui désigne la distribution spatiale des populations étudiées, et ii) l'altitude de chaque station de prélèvement.

# IV.1.3.2.1 Effet du facteur station sur les paramètres 2C et 1Cx et 2n

L'effet du facteur station sur les variations intra-cytotype de la quantité d'ADN nucléaire holoploïde (2C), et les variations inter-populations et inter-cytotypes de la quantité d'ADN nucléaire monoploïde (1Cx) a été estimé par le test d'ANOVA à un seul facteur. Les analyses statistiques de la variance et de corrélation ont été effectuées sur le nombre global des individus passés au cytométre, soit 160 individus dont, 111 tétraploïdes et 49 diploïdes représentants les 28 populations étudiées.

# IV.1.3.2.1.1 Effet du facteur station sur la valeur 2C

Les variations inter-populations de la quantité d'ADN nucléaire holoploïdes « 2C » ont été abordées dans la section précédente de "résultats de la taille du génome" ; dans laquelle, deux groupes de populations diploïdes et tétraploïdes clairement différenciés ont été observées.

A l'intérieur du groupe de populations diploïdes (cytotype diploïde), les valeurs des quantités d'ADN holoploïde (2C) sont extrêmement variables (F = 24,91; P < 0,000; Tableau 18).

Le test des groupes homogènes de Bonferroni (Annexe 3, Tableau 39) révèle deux groupes clairement différenciés ; le premier groupe comprenant les populations P8, P17, P18, P60 et les individus diploïdes de la population P6 (P6d), et le second comprenant les populations P7, P9 et les individus diploïdes de la population P5 (P5d).

**Tableau 18 :** Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité de la quantité d'ADN nucléaire holoploïde 2C (pg) dans les populations diploïdes d'*Artemisia herba-alba* 

Source de variabilité	SC	DDL	MC	F	P
Intra-cytotype diploïde	18,45	7	2,63	24,91	0,000000

Au niveau tétraploïde, les différences observées sont également importantes (F = 6,19; P <0,000; Tableau 19).

Le test de Bonferroni, calculé pour une erreur de 0,01%, révèle trois groupes homogènes mais non totalement différenciés (Annexe 3, Tableau 40); dans ces groupes, la quantité d'ADN nucléaire 2C de la population P11 (2C = 13,84pg) provenant de la région de Sebgag (Aflou) diffère significativement (P <0,0001) des populations P10 (2C = 11,60 pg) et P26 (2C = 11,68 pg) provenant respectivement des régions de Gueltet Sidi Saad (Aflou) et Oum Ali (Tébessa).

**Tableau 19 :** Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité de la quantité d'ADN nucléaire holoploïde 2C (pg) dans les populations tétraploïdes d'*Artemisia herba-alba* 

Source de variabilité	SC	DDL	MC	F	P
Intra-cytotype tétraploïde	30,68	21	1,46	6,19	0,000000

# IV.1.3.2.1.2 Effet du facteur station sur la valeur 1Cx

Les résultats du test ANOVA de l'effet du facteur station sur les variations inter-populations et intra-cytotypes des quantités d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx sont consignés dans les Tableaux 20 et 21.

A l'échelle inter-populations (ensemble de populations), une variabilité élevée de la quantité 1Cx (F = 12,69 ; P<0,00) a été dévoilée par le test ANOVA.

Le test des groupes homogènes au seuil de sécurité 99% ( $\alpha = 0.01$ ), subdivise l'ensemble des populations en 9 groupes selon les valeurs de 1Cx, mais non clairement différencies (Annexe 3, Tableau 41).

Entre les deux cytotypes, une différence significative dans les valeurs de 1Cx a été également observée (F = 4,59; P<0,034). Le test de Bonferroni fait état de deux groupes homogènes (Annexe 3, Tableau 42); le premier groupe concerne les populations tétraploïdes avec une valeur 1Cx moyenne de 3,20 pg et le deuxième groupe, des populations diploïdes avec une moyenne de 1Cx égale à 3,29 pg.

En outre, étant donné de la relation numérique entre les valeurs 1Cx et 2C, les résultats du test ANOVA intra-cytotype diploïde et tétraploïde des valeurs 1Cx sont approximativement les mêmes que ceux obtenus précédemment pour les valeurs 2C (Tableaux 18 et 19).

**Tableau 20 :** Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité des quantités d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx (pg) dans l'ensemble de populations d'*Artemisia herba-alba* 

Source de variabilité	SC	DDL	MC	F	P
Inter- populations	6,78	29	0,23	12,69	0,00

**Tableau 21 :** Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de station sur la variabilité inter-cytotypes des quantités d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx (pg) d'Artemisia herba-alba

Source de variabilité	SC	DDL	MC	F	P
Inter-cytotypes	0,25	1	0,25	4,59	0,034

## IV.1.3.2.2 Relation entre 1Cx et le niveau de ploïdie (2n)

Une corrélation significative négative (r = -0.17; P = 0.034) a été mise en évidence (Tableau 22), entre la quantité d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx et le niveau de ploïdie (2n). La quantité moyenne d'ADN 1Cx, calculée pour les populations diploïdes (49 individus) est de 3,29 pg, alors que celle calculée pour les populations tétraploïdes (111 individus) est de 3,20 pg (Tableau 23), soit une réduction de 2,8%.

**Tableau 22:** Corrélation entre la quantité d'ADN nucléaire monoploïde (1Cx) et le niveau de ploïdie (2n) au seuil de signification 95% dans l'ensemble de populations d'*Artemisia herba-alba* étudiées.

Corrélation	1Cx	P
2 <i>n</i>	- 0,17	0,034

# IV.1.3.2.3 Variations relatives intra-cytotype de la quantité d'ADN nucléaire

Les variations relatives intra-cytotype de la quantité d'ADN nucléaire monoploïde moyenne (1Cx), estimées par le calcul du taux de variation (Tableau 23), sont relativement élevées aussi bien pour les cytotypes diploïdes (33 %) que pour les cytotypes tétraploïdes (19 %). Étant donnée la relation numérique entre les deux paramètres 1Cx et 2C, ces taux sont respectivement les mêmes pour les quantités d'ADN nucléaire holoploïde (2C).

**Tableau 23 :** Taux de variation intra-cytotype de la quantité d'ADN nucléaire monoploïde (1Cx)

Cytotype	Nombre de cytotypes	Minimum	Maximum	Taux de variation	
Diploïde	8	2,70	3,59	33 %	
Tétraploïde	22	2,91	3,46	19 %	

<sup>\*</sup> $\overline{\text{Taux variation}} = [(Max-Min)/Min.] \times 100$ 

### IV.1.3.3 Effet de l'altitude sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n

Les altitudes à partir des quelles ont été récoltées les échantillons, varient entre 545m et 1800m. L'ampleur d'élévation a été subdivisées en 5 classes : A < 600 m ; B : 600-900 m ; C : 900-1200 m ; D : 1200-1500 m ; E : 1500-1800 m.

Les résultats de l'analyse de la variance de l'effet de l'altitude sur les variations des paramètres 1Cx, 2C et 2n, sont consignés dans le Tableau 24.

Des variations significatives importantes selon les variations des élévations, ont été observées dans les quantités d'ADN monoploïde 1Cx (F = 6,33 ; P <0,000), d'ADN holoploïde 2C (F = 25,52 ; P <0,000) et du nombre de chromosomes 2n (F = 33,06 ; P <0,00).

**Tableau 24 :** Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de l'altitude sur la variabilité des paramètres 1Cx, 2C et 2n d'Artemisia herba-alba

			P
9 4	0,322	6,330	0,000
9 4	138,205	25,527	0,000
) 4	1267,840	33,069	0,000
9	9 4	9 4 138,205	9 4 138,205 25,527

Pareillement, des corrélations significatives positives (Tableau 25) ont été observées entre l'altitude et les deux paramètres : 2C (r = 0.41; P < 0.000) et 2n (r = 0.43; P < 0.000)

**Tableau 25:** Corrélations (r) entre l'altitude et les paramètres 1Cx, 2C et 2n, estimées pour l'ensemble de populations d'*Artemisia herba-alba* (Corrélations significatives marquées à P < 0.05)

Corrélation	1Cx	2C	2 <i>n</i>
Altitude	r = -0.13	r = 0,41	r=0,43
Signification	P = 0.11	P = 0,000	P=0,000

# IV.1.3.4 Effet de la mise en défens sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n

Les résultats du test ANOVA de l'effet de la mise en défens sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n sont consignés dans le Tableau 26.

L'état de conservation de la plante semble avoir un effet significatif sur les deux paramètres 2C (F = 20,73, P < 0,000) et 2n (F = 21,09, P < 0,000) qui sont bien corrélés l'un de l'autre comme il a été exposé en dessus. Par contre, en ce qui concerne la quantité d'ADN nucléaire monoploïde (1Cx), le test ANOVA ne montre pas de variations significatives pour ce paramètre en fonction de l'état de conservation de la plante (F = 0,07, P = 0,79)

**Tableau 26 :** Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de mise en défens sur la variabilité des paramètres 1Cx, 2C et 2n d'Artemisia herba-alba

Effet	SC	DDL	MC	F	P
Mise en défens-1Cx	0,004	1	0,004	0,070	0,790
Mise en défens -2C	161,470	1	161,470	20,730	0,000
Mise en défens -2n	1297,300	1	1297,300	21,096	0,000

A l'intérieur des populations tétraploïdes, le test ANOVA n'a pas révélé de différences significatives dans la taille du génome 2C entre les populations protégées et les populations non protégées (F = 1,22; P = 0,27; Tableau 27).

**Tableau 27 :** Analyse de la variance à un seul facteur au seuil de sécurité 95% de l'effet de mise en défens sur les variations des quantités 2C (pg) dans les populations tétraploïdes d'*Artemisia herba-alba* 

Effet	SC	DDL	MC	F	P
Mise en défens	0,57	1,00	0,57	1,22	0,27

# IV.1.3.5 Analyses de l'effet des facteurs environnementaux sur les valeurs de 2C et 1Cx et 2n

Les variations dans les quantités d'ADN nucléaire holoploïde (2C), les quantités d'ADN monoploïde (1Cx) et le nombre de chromosomes (2n) observées entre les différentes provenances, nous ont conduites à rechercher leurs origines écologiques et les facteurs qu'y sont responsables. Deux facteurs écoclimatiques ont été retenus dans cette analyse : le quotient pluvio-évapotranspiratoire (P/ETP) traduisant le stress hydrique, et la moyenne des températures minimales journalières du mois le plus froids (tm) traduisant le stress thermique hivernal (voir matériel et méthodes, Tableau 3). Le choix de ces deux facteurs se justifie par leurs importances comme indices majeurs de classifications écoclimatiques des zones arides et des steppes (Le Houérou, 1995).

Une analyse en composante principale (ACP) de type Pearson (n) a été utilisée afin d'explorer les corrélations qui peuvent exister entre les paramètres cytogénétiques étudiés et les facteurs écoclimatiques précités.

#### IV.1.3.5.1 Matrice de corrélation

Le premier résultat intéressant à analyser est la matrice de corrélation (Tableau 28). Dans cette matrice, on remarque que : i) La quantité d'ADN nucléaire (2C) et le niveau de ploïdie qui est traduit par le nombre de chromosomes somatique (2n) sont bien corrélés (r = 0.97; P <0,05). Ceci apparait logique du fait que les populations tétraploïdes (2n = 36) ont des quantités d'ADN nucléaire nettement supérieur aux populations diploïdes (2n = 18). ii) La quantité d'ADN nucléaire (2C) est corrélée significativement négative (r = -0.64; P < 0.05)avec la moyenne des températures minimales journalières du mois le plus froid «tm» et significativement positive (r = 0.64; P < 0.05) avec le quotient pluvio-évapotranspiratoire (P/ETP) qui traduit le stress hydrique ou le degré d'aridité. Il est à noter que les valeurs de P/ETP dans les steppes et les zones arides varieraient entre 0,45 pour les zones semi-arides à 0,03 dans les zones hyper arides ou sahariennes (Le Houérou, 1995). iii) Des corrélations faibles; positive (r =0,24; P < 0,05) et négative (r = -0,17; P < 0,05), mais statistiquement significatives ont été enregistrées entre la quantité d'ADN nucléaire monoploïde (1Cx) et les paramètres tm et 2n respectivement. iv) Le niveau de ploïdie exprimé par le nombre de chromosomes (2n) est corrélé significativement positive (r = 0.63; P < 0.05) avec le paramètre P/ETP et significativement négativement (r = -0.68; P < 0.05) avec le paramètre «tm».

**Tableau 28 :** Matrice de corrélation entre les paramètres cytogénétiques mesurés et les facteurs écoclimatiques (corrélations significatives en surbrillance marquées à P < 0.05)

Corrélation	2C	1Cx	2n	P/ETP	tm
2C	1,00	0,05	0,97	0,64	-0,64
1Cx	0,05	1,00	-0,17	-0,04	0,24
2n	0,97	-0,17	1,00	0,63	-0,68
P/ETP	0,64	-0,04	0,63	1,00	-0,74
tm	-0,64	0,24	-0,68	-0,74	1,00

# IV.1.3.5.2 Choix du nombre de facteurs (axes) à retenir

Pour le choix du nombre des facteurs (composantes principales) à retenir dans l'analyse des données, nous avons utilisé le critère de Kaiser (1960), qui stipule de ne retenir que les facteurs ayant une valeur propre supérieure à 1. L'examen du Tableau 29 et le graphique de la décroissance des valeurs propres (Figure 31) montrent que seulement les deux premières composantes (Facteurs) principales (F1 et F2) ont des valeurs propres qui répondent à ce critère. Les deux composantes principales expliquent 84,43% de la variabilité totale. Ce taux s'avère suffisant pour décrire les principales relations possibles entre les paramètres étudiés.

**Tableau 29 :** Valeurs propres et pourcentages de variance des facteurs

Valeur	Valeur propre	% variance	% Cumulés
1	3,17	63,49	63,49
2	1,05	20,95	84,43
3	0,54	10,82	95,25
4	0,23	4,69	99,95
5	0,00	0,05	100,00

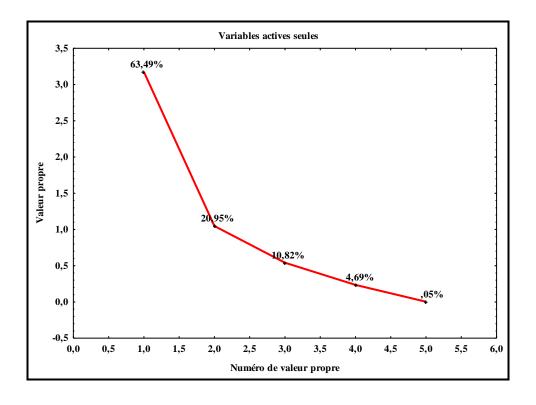
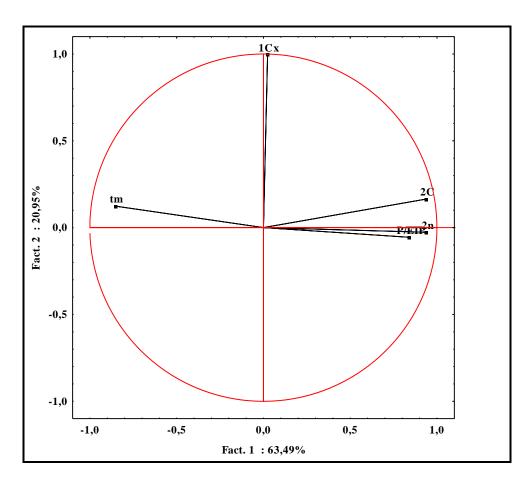


Figure 31 : Graphique de la décroissance des valeurs propres

# IV.1.3.5.3 Représentation graphique des paramètres cytogénétiques et écoclimatiques

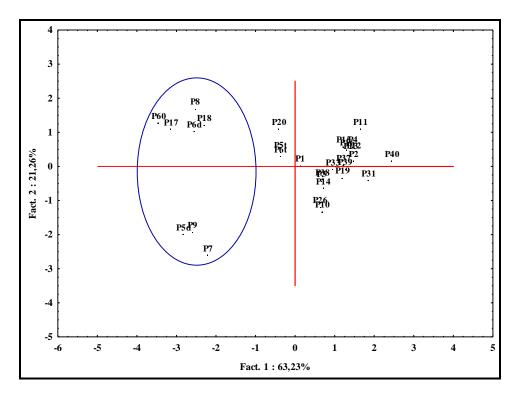
La projection des variables actives sur le plan à deux dimensions constitué par les deux premières composantes principales (F1 et F2), (Figure 32), nous permettra de dégager les conclusions suivantes : i) Les variables actives étudiées sont toutes loin du centre du graphique et proches du cercle de corrélation, cela signifié une bonne représentation des variables sur le plan factoriel ; ii) Le premier axe F1 (première composante principale) est clairement lié aux paramètres climatiques (tm, P/ETP) et à la quantité d'ADN nucléaire holoploïde « 2C » et au niveau de ploïdie « 2n », alors que le deuxième axe F2 (deuxième composante principale) est lié à la quantité d'ADN nucléaire monoploïde « 1Cx »; iii) La quantité d'ADN nucléaire holoploïde « 2C » et le niveau de ploïdie « 2n » sont significativement négativement corrélés avec « tm », et significativement positivement corrélés avec « P/ETP ».



**Figure 32 :** Cercle de corrélations entre facteurs écoclimatiques et paramètres cytogénétiques d'*Artemisia herba-alba* généré d'une ACP; Projection des variables sur F1 et F2

# IV.1.3.5.4 Projection des populations sur les deux axes factoriels F1 et F2

L'examen de la projection des individus (populations) sur le plan factoriel sur la base des données cytogénétiques (2C, 1Cx et 2n) et écoclimatiques (P/ETP et tm) (Figure 33), nous permettra de dégager les conclusions suivantes : i) Les populations diploïdes sont bien séparées des populations tétraploïdes sur le premier axe F1 qu'est lié aux paramètres 2C, 2n, tm et P/ETP, cela signifie que la polyploïdie qu'est exprimée par les deux variables « 2C » et « 2n » est dépendante de la température minimale du mois le plus froids et de l'aridité du climat, ii) Les deux populations P7 et P9, et les individus diploïdes de la populations P5 (P5d) sont séparés des autres populations diploïdes sur le deuxième axe F2 qui est lié à la valeur « 1Cx ». En se référant aux données de ces populations (Tableau 16), nous constatons que les trois populations citées sont caractérisées par les plus faibles quantités d'ADN monoploïde « 1Cx » par rapport aux autres populations, iii) La population P20, bien qu'elle est tétraploïde, mais elle se trouve dans les mêmes conditions écoclimatiques des populations diploïdes.



**Figure 33 :** Projection des populations d'*Artemisia herba-alba* sur F1 et F2 issue d'analyse en composante principale (populations diploïdes à l'intérieur de l'ellipse)

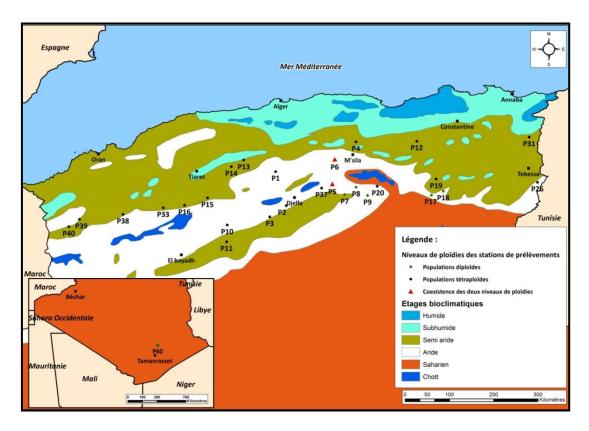
#### IV.1.3.6 Relation climat et niveau de ploïdie

D'après Le Houérou (1995), les zones arides et steppiques sont classées en 28 zones écoclimatiques; selon des combinaisons des valeurs-seuils discriminantes des deux indices (critères) majeurs « tm » et « P/ETP ». Dans l'analyse en composante principale précédente, nous avons vu l'effet de ces deux indices séparément sur les différents paramètres cytogénétique mesurés (2C, 1Cx, et 2n). Dans cette analyse, et afin de mieux cerner l'effet du climat dans sa globalité sur la variation de ploïdie, nous avons fait recours au test d'indépendance de  $Chi^2$ . L'analyse consiste à examiner s'il y a une influence significative des 9 sous-zones écoclimatiques (étages bioclimatiques) définies dans notre zone d'étude (voir matériel et méthodes, Tableau 3) sur la variation du niveau de ploïdie. Les résultats de ce test (Tableau 30) présentent une dépendance significative (P = 0.043) entre le niveau de ploïdie et le climat. Le taux de dépendance selon le « V » de Cramer est estimé à 65 %.

**Tableau 30 :** Test d'indépendance de *Chi*<sup>2</sup> entre le niveau de ploïdie et les étages bioclimatiques au seuil de signification de 95%

	Chi²	ddl	P
Chi² de Pearson	12,74	8	P = 0.043
V de Cramer	0,65	-	-

Les cytotypes diploïdes se situent principalement entre le saharien et l'aride supérieur frais (ASf) (Figure 34). Ces zones sont marquées par des bioclimats plus arides (P/ETP= 0.04-0.20; P = 49-242 mm), avec des températures minimales du mois le plus froid relativement élevées (tm = 1.6-4.5 °C). En revanche, l'aire de distribution des cytotypes tétraploïdes est plus large par rapport aux cytotypes diploïdes. Leurs individus présentent une meilleure adaptation aux contrastes écoclimatiques de la région, traduite par une plasticité d'occupation d'espaces plus élevée. Ils sont distribués depuis l'aride inférieur tempéré (AIt) (P/ETP= 0.14; P = 196 mm; P20) jusqu'au le semi-aride supérieur (SAS) (P/ETP= 0.40; P = 465 mm; P31) et supportant en conséquence des variations thermiques, depuis les hivers les plus froids (tm = -1.50 °C; P2) jusqu'à l'hiver tempéré (tm = 4.2 °C; P6t).



**Figure 34 :** Distribution des deux cytotypes d'*Artemisia herba-alba* sur la carte simplifiée des étages bioclimatiques de l'Algérie (Nedjraoui et Bédrani, 2008) avec de légères modifications

# IV.1.4 Étude phylogénétique et phylogéographique

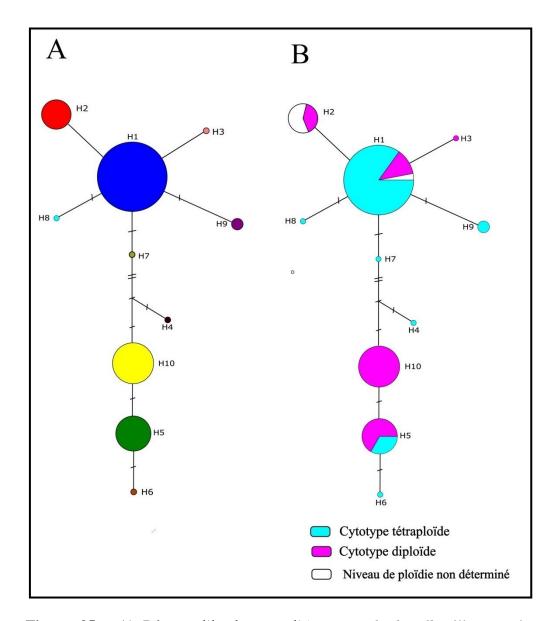
Deux régions chloroplastiques (*rpl32-trn*L et *trnV-ndh*C) ont été séquencées avec succès sur 84 individus issus de 17 populations. Les deux régions concaténées donnent une longueur de séquence de 1575 pb. L'alignement global des séquences a généré 10 sites polymorphes, 4 gaps et une zone spécifique très variable, d'une longueur de 10 bases située dans la région chloroplastique « *rpl32-trn*L » (zone 318-327). L'alignement manuel de cette zone riche en adénine (A), en thymine (T) et en gaps a produit 6 configurations différentes, dont l'homologie des sites était impossible de déterminer. Par conséquent, cette zone avec des poly-A et poly-T a été marquée comme indéterminée. Finalement, la matrice de séquences a été analysée sans gaps et avec gaps codés, afin d'évaluer si ces dernières donneront plus d'information. L'analyse avec gaps codés a produit un réseau haplotypique moins résolu et difficile à interpréter. Pour cette raison, les gaps ont été exclus, et toutes les analyses ont été effectuées avec les séquences sans gaps.

Les résultats obtenus en utilisant des séquences sans gaps font apparaître 10 sites polymorphes combinant en 10 haplotypes (Tableau 31, Figure 35). L'haplotype H1 représente 70% du jeu des données; il est le plus majoritaire avec 59 individus issus de 15 populations et regroupant les deux niveaux de ploïdie. Il constitue ainsi le réservoir de propagation à partir duquel sont dérivés les autres haplotypes. Le second haplotype bien représenté est H10 (8,33%), celui-ci représente tous les individus de la population P60 située dans la région du Hoggar dans l'extrême sud algérien. Il est divergeant du H1 par trois pas mutationnels avec un seul haplotype intermédiaire (H7). Tout le reste des haplotypes sont proches phylogénétiquement soit au haplotype H1 (H2, H3, H8, H9) soit au H10 (H5, H7), excepté pour les haplotypes H4 et H6 qui sont représentés chacun par un individu des populations P11 et P26, et se trouvent proches phylogénétiquement des haplotypes H7 et H5 respectivement.

**Tableau 31:** Positions des sites polymorphes entre individus d'*Artemisia herba-alba* sur les deux séquences concaténées (*rpl32-trn*L et *trnV-ndh*C) d'ADNcp. Les haplotypes sont notés de H1 à H10.

	Positions des sites polymorphes sur les séquences concaténées										
		314	404	466	495	546	735	769	1087	1477	1569
		S	ites pol	ymorph	es sur r	pl32-trn	L	Sites pol	lymorphes	sur <i>trn</i> V	-ndhC
Haplotype	Fréquences	314	404	466	495	546	735	165	315	705	797
H1	59	T	A	T	T	A	G	С	A	A	T
Н2	5	T	A	T	T	A	G	G	A	A	T
Н3	1	T	A	T	G	A	G	C	A	A	T
H4	1	T	C	T	T	G	G	C	G	T	T
Н5	6	T	C	C	T	G	A	C	A	T	T
Н6	1	T	C	C	T	G	A	C	A	A	T
Н7	1	T	A	T	T	A	G	C	A	T	T
Н8	1	T	A	T	T	A	G	C	A	A	Α
Н9	2	G	A	T	T	A	G	C	A	A	T
H10	7	T	C	C	T	G	G	C	A	T	T

La répartition des deux niveaux de ploïdie au travers des haplotypes (Figure 35, B), fait apparaître 5 haplotypes pour le cytotype tétraploïde (H3, H4, H6, H7, H8, H9), un seul haplotype (H10) pour le cytotype diploïde et 2 haplotypes (H1 et H5) représentant les deux niveaux de ploïdie à la fois. Cependant, en raison de la non détermination du niveau de ploïdie des individus de la population P6 (caractérisée par la coexistence des niveaux de ploïdie) utilisés dans le séquençage et qui sont représentés en partie dans les haplotypes H1 et H2, leur fréquence n'a pas été prise en considération dans le calcul des fréquences de ploïdie par haplotype.

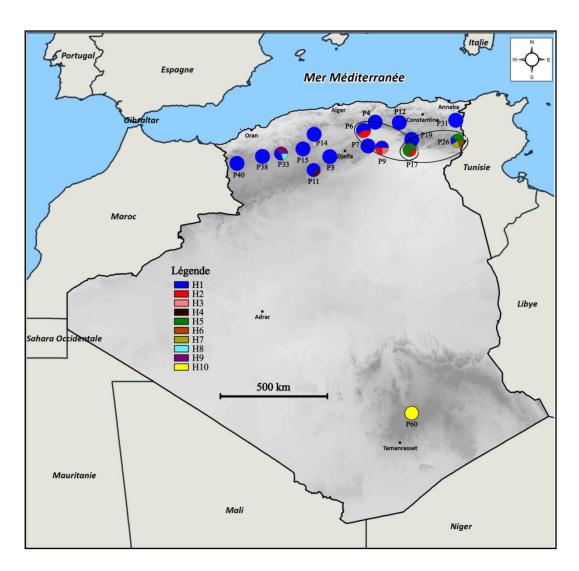


**Figure 35 : A)** Réseau d'haplotypes d'*Artemisia herba-alba* illustrant les relations phylogénétiques entre haplotypes. La taille des cercles est proportionnelle à la fréquence des haplotypes, excepté pour l'haplotype H1, pour lequel la fréquence a été divisée par 5 pour des raisons de clarté d'illustration; **B)** Fréquences des cytotypes pour chaque haplotype.

# IV.1.4.1 Distribution spatiale des haplotypes

Sur la carte de la Figure 36, les fréquences d'haplotypes rencontrés dans chaque population d'*Artemisia herba-alba* sont représentées sous forme de diagramme circulaire. L'emplacement des diagrammes correspond aux positions géographiques des populations. Cette représentation permet de voir comment se répartissent les haplotypes dans l'espace. L'haplotype H1 (bleu) est présent dans toutes les populations analysées, excepte pour les deux

populations diploïdes P17 et P60 marquées par son absence. L'haplotype H2 (rouge) se trouve partagé entre trois populations relativement proches l'une de l'autre (P6, P9 et P17) dans le Centre et le Centre-Est de la steppe. Alors que l'haplotype H5 (vert) composé des deux populations P17 et P26, se trouve confiné dans le Centre-Est et l'Est Algérien. L'extrême sud Algérien se caractérise par la présence exclusive de l'haplotype H10 (jaune). Les autres haplotypes rares sont distribués entre le Centre (H3, H4), l'Est (H6, H7) et l'Ouest Algérien (H8, H9).



**Figure 36 :** Distribution spatiale des fréquences haplotypiques par population d'*Artemisia herba-alba*.

# IV.1.4.2 Structure génétique et phylogéographique

## IV.1.4.2.1 Diversité et structure génétiques spatiales

Dans le Tableau 32, sont présentés les résultats de la diversité génétique inter-populations mesurée sur les 17 populations d'*Artemisia herba-alba*. Les paramètres de diversité indiquant des différenciations génétiques élevées entre populations (Gst = 0,518), et entre population en prenant en compte les similarités entre haplotypes (Nst = 0,615). Le test de permutation montre que Nst est significativement plus élevée que Gst (P <0,05), indiquant une structure phylogéographique pour les haplotypes inférés de l'ADN chloroplastique.

**Tableau 32:** Diversité inter-population; S: Nombre de sites polymorphes; h: Nombre d'haplotypes; Gst: différenciation génétique basée sur l'identité des haplotypes (Nei, 1973); Nst: différenciation génétique basée sur la distance entre haplotypes (Nei, 1982; Lynch et Crease, 1990). Gst vs Nst: Test de permutation des distances entre haplotypes avec l'hypothèse nulle que NST = GST, (P < 0.05)

Nombre de populations	Nombre d'individus	S	h	Gst	Nst	Gst vs Nst
17	84	10	10	0,518	0,615	*

<sup>\*:</sup> test significatif

### IV.1.4.2.2 Diversité génétique intra-population

La diversité haplotypique totale est de Hd=0,495 et le nombre moyen de différences nucléotidiques entre séquences est de K=1,558. Sur les 17 populations, 11 sont monomorphes (Hd=K=0), et 6 présentent des niveaux de diversifications variables. Les populations monomorphes sont les plus abondantes en termes de nombre (65%) et de la surface occupée; elles sont distribuées dans toute l'aire échantillonnée. Cependant, les populations les plus diversifiées sont localisées dans l'Est (P26), le Centre (P9) et le Centre-Ouest (P33). Il y a lieu de souligner que, malgré le nombre réduit des populations diploïdes par rapport au nombre total des populations séquencées (25%), les populations diploïdes représentent 40 % des populations diversifiées (Tableau 33).

**Tableau 33:** Diversité intra-population. N: taille de la population; S: Nombre de sites polymorphes; h: Nombre d'haplotypes; Hd: Diversité haplotypique; K: Nombre moyen de différences nucléotidiques entre séquences;  $\pi$ : Diversité nucléotidique avec correction de Jukes et Cantor

Population	N	S	h	Hd	K	π
Р3	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P4	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P6**	5	1	2	0,6	0,6	0,00040
P7*	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P9*	4	2	3	0,833	1,0	0,00060
P11	5	4	2	0,4	1,0	0,00106
P12	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P14	4	0	1	0,0	0,0	0,0
P15	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P17*	5	6	2	0,4	2,4	0,00159
P19	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P26	5	5	4	0,9	3,0	0,00199
P31	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P33	5	2	3	0,8	1,0	0,00066
P38	5	0	1	0,0	0,0	0,0
P40	4	0	1	0,0	0,0	0,0
P60*	7	0	1	0,0	0,0	0,0
				0,49570	1,55823	0,00103

<sup>\*</sup>Populations diploïdes (2n = 2x)

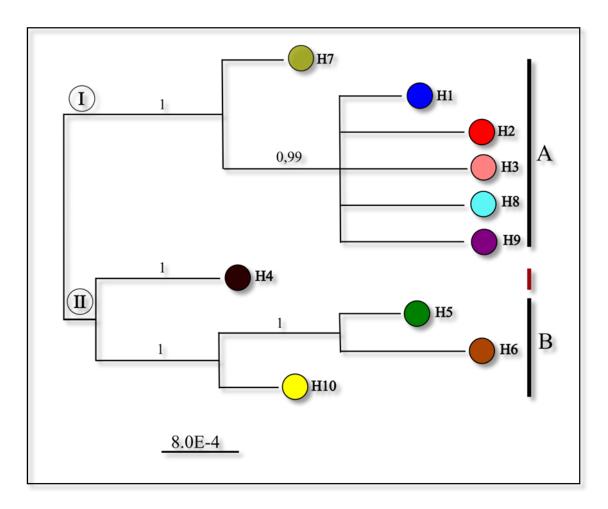
<sup>\*\*</sup>Population marquée par la coexistence des deux niveaux de ploïdie, dont le niveau de ploïdie des individus séquencés n'a pas été déterminé.

# IV.1.4.3 Phylogénie de l'ADNcp

Pour un total de 84 individus issus de 17 populations Algériennes d'*Artemisia herba-alba*, 10 haplotypes ont été définis par le séquençage de deux régions d'ADN chloroplastique (*rpl*32-trnL et trnV-ndhC), concaténées pour chaque individu. L'arbre phylogénétique construit de l'analyse bayésienne se montre subdivisé en deux clusters I et II (Figure 37). En fonction de degrés de divergence entre séquences, 2 groupes (Clades) d'haplotypes (A, B) et un haplotype non groupé (H4) ont été définis. Sur le cluster I, sont rassemblés les haplotypes du clade A, tandis que sur le cluster II, on trouve les haplotypes du clade B et l'haplotype non groupé H4.

Le clade A comprenait 6 haplotypes (H1, H2, H3, H7, H8 et H9). Il est le plus majoritaire avec 82% de l'effectif échantillonné. Les individus de ce groupe représentent les deux cytotypes; diploïdes et tétraploïdes, et sont distribués dans toute la steppe Algérienne. On observe dans ce groupe que l'haplotype H7, représenté par un seul individu de la population P26, située dans l'Est Algérien, se trouve séparé des autres haplotypes.

Le clade B comprenait 3 haplotypes (H5, H6 et H10). Les haplotypes H5 et H6 sont étroitement liés. L'haplotype H5 est constitué des individus des populations P17 (diploïde) et P26 (tétraploïdes). Les deux populations sont situées dans le Centre Est et l'extrême Est Algérien respectivement. L'haplotype H6 est constitué d'un seul individu de la population P17. Dans le même groupe, on observe que l'haplotype H10, qui est constitué exclusivement des individus de la population P60 (diploïde) ; situé dans l'extrême sud Algérien, se trouve phylogénétiquement séparé des autres haplotypes. L'haplotype H4 non groupé est représenté par un seul individu de la population P11 ; située en milieu des populations analysées.



**Figure 37 :** Arbre phylogénétique pour 10 haplotypes d'*Artemisia herba-alba* obtenu de l'inférence bayésienne des données des deux régions de l'ADNcp (séquences concaténées de *rpl32-trn*L et *trnV-ndh*C). I et II désignant les deux clusters; Barres verticales noires désignent les groupes d'haplotypes A et B ; Barre verticale rouge désigne l'haplotype non groupé (H4). Les nombres sur les branches sont les probabilités postérieures.

### **IV.2 Discussion**

# IV.2.1 Étude caryologique

#### IV.2.1.1 Nombre de chromosomes

largement prédominant et x = 8 moins étendu. Le nombre x = 9 s'étendant à la tribu Anthemideae et à toute la famille des Asteraceae (Solbrig, 1977; Schweizer et Ehrendorfer, 1983). Ce nombre est le plus productif du genre, non seulement en termes de nombre de taxons, mais aussi en termes de niveau de ploïdie. Il est présent dans tous les sous-genres d'Artemisia, et c'est le seul qui se rencontre dans les genres étroitement apparentés qui forment la sous-tribu Artemisiinae. Le deuxième nombre de base dans le genre x = 8 est limité à quelques taxons des sous-genres Absinthium, Artemisia et Dracunculus (Vallès et al., 2011). Les résultats du comptage chromosomique d'Artemisia herba-alba confirment l'existence du nombre de base x = 9 dans le genre Artemisia, et sont en accord avec les travaux précédents effectués sur ce taxon, et qui ont déjà révélé l'existence de deux niveaux de ploïdie chez l'espèce Artemisia herba-alba (Kawatani et Ohno, 1964; Valdés-Bermejo et Gómez, 1976; Fernández et al., 1979; Vallès, 1987; Ouyahya et Viano, 1988; Ferchichi, 1997). Selon la base de données des nombres de chromosomes chez les Asteraceae (Watanabe, 2015), notre étude fournit le premier nombre chromosomique diploïde (2n = 2x = 18) pour Artemisia herba-alba de l'Algérie. Cependant, le nombre chromosomique tétraploïde (2n = 4x = 36) a été enregistré auparavant en Algérie dans des travaux de cytogénétique réalisés sur des populations poussant dans l'Est et le Centre de l'Algérie (Betina et al., 2007; Bougoutaia et al., 2014). Au Maroc, seul le niveau diploïde a été signalé (Ouyahya et Viano, 1988), alors que chez les populations Tunisiennes, les deux cytotypes ; diploïdes et tétraploïdes ont été signalés (Kawatani et Ohno, 1964; Ferchichi, 1997). Une situation similaire a été décrite pour la partie nord du bassin méditerranéen, dans la Péninsule Ibérique, où coexistent également les deux cytotypes (Valdés-Bermejo et Gómez, 1976; Fernández et al., 1979; Vallès, 1987; Torrell et al., 2003).

Le genre Artemisia est marqué par deux principaux nombres chromosomiques de base : x = 9

#### IV.2.1.2 Idiogramme

Les résultats de la présente étude caryomorphologique des deux cytotypes issus des trois populations Algériennes d'*Artemisia herba-alba* confirment et complètent des études similaires effectuées sur d'autres populations de la même espèce poussant dans l'Est et le

Centre Algérien (Betina et al., 2007), en Tunisie présaharienne (Ferchichi, 1997) et dans la Péninsule Ibérique (Vallès, 1987; Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell et al., 2003). Les longueurs des chromosomes calculées dans les deux cytotypes sont en accord avec les données bibliographiques sur le genre Artemisia et qui varient entre 2 et 10 µm (Vallès et al., 2011). Les longueurs totales des caryotypes (LTC) et, à l'exception de la population P6 (tétraploïde) qui se distingue par une LTC notablement élevée (76,08 µm), sont en accord avec les résultats de Vallès et Siljak-Yakovlev (1997), Torrell et al. (2003) et Betina et al.(2007). En revanche, de nouveaux nombres de chromosomes submétacentriques ont été enregistrés dans les deux cytotypes analysés. En se référant aux études précitées, ayant rapport une (1) seule paire sub-métacenbtrique pour le cytotype diploïde (Vallès, 1987; Vallès et Siljak-Yakovlev,1997; Torrell et al., 2003), et entre 1 et 5 paires pour le cytotype tétraploïde (Vallès, 1987; Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell et al., 2003; Betina et al., 2007), nos résultats présentent 3 paires de chromosomes submétacentriques pour le cytotype diploïde (P6) et 6 paires de chromosomes submétacentriques pour le cytotype tétraploïde (P6 et P26). De même, et contrairement aux études précédentes ayant signalé la présence de chromosomes satellifères dans les caryotypes du cytotype tétraploïde (Torrell et al., 2003; Betina et al., 2007), et de chromosomes satellifères et surnuméraires (chromosomes B) dans les caryotypes du cytotype diploïde (Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Ferchichi, 1997; Torrell et al., 2003), nos résultats n'ont pas révélé l'existence de telles structures.

### IV.2.1.3 Symétrie du caryotype

Les indices d'asymétrie intra-chromosomiques (IAs, A1) et inter-chromosomiques (R, A2), ainsi que les valeurs du degré d'asymétrie de Stebbins (1971) permettent de mieux caractériser l'asymétrie des caryotypes.

Les résultats des indices IAs (57,19% - 59,10%); et A1 (0,24 – 0,29) indiquent une forme symétrique des chromosomes caractérisant les deux cytotypes. Cette forme de symétrie intrachromosomique a été observée chez des populations Algériennes d'*Artemisia herba-alba* par Betina *et al.* (2007) (IAs = 57,63% - 59,33%) pour le cytotypes tétraploïdes, et par Torrell *et al.* (2003) pour les deux cytotypes de la même espèce (A1 = 0,28). Des résultats similaires pour « A1 » compris entre 0,09 et 0,31 ont été constatés pour d'autres espèces du genre *Artemisia* (Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell *et al.*, 2003; Pellicer *et al.*, 2008; Tabur *et al.*, 2012). Encore, les faibles valeurs des indices d'asymétrie inter-chromosomique (R = 1,11 – 1,31; A2 = 0,03 – 0,07) expliquent de faibles variations entre les tailles des chromosomes, et

par conséquent, des caryotypes plus homogènes. La valeur de A2 obtenue dans cette étude corrobore avec d'autres données sur l'espèce *Artemisia herba-alba* (A2 = 0,10 – 0,11) (Torrell *et al.*, 2003), et d'autres espèces du genre *Artemisia* (A2 = 0,07 – 0,21) (Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell *et al.*, 2003; Pellicer *et al.*, 2008; Tabur *et al.*, 2012). La classification de Stebbins (1971), place tous les caryotypes dans la classe 2A symétrique, ceci est en accord avec les travaux de Vallès (1987), Vallès et Siljak-Yakovlev (1997) et Torrell *et al.* (2003) pour des populations d'*Artemisia herba-alba* et d'autres espèce du genre *Artemisia* (Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell *et al.*, 2003; Pellicer *et al.*, 2008; Tabur *et al.*, 2012), et corrobore avec le modèle symétrique le plus courant dans le genre *Artemisia* (Vallès *et al.*, 2011).

# IV.2.2 Étude de la cartographie physique de l'ADNr

L'analyse par la technique du FISH effectuée pour la première fois sur des échantillons nordafricains appartenant à ce taxon, ont révélé 2 loci dans le cytotype diploïde et 4 loci dans le cytotype tétraploïde pour les deux gènes de l'ADN ribosomique 5S et 35S. Ces résultats sont en accord avec les seules données précédentes réalisées sur des populations Ibériques de cette espèce: 4 signaux (2 loci) ont été détectés dans des taxons diploïdes étudiés pour l'ADNr 5S et 35S et 8 signaux (4 loci) dans des taxons tétraploïdes pour uniquement de l'ADNr 35S (Torrell et al., 2003). La colocalisation sur les mêmes loci des gènes de l'ADNr 5S et 35S révélée par l'hybridation des deux sondes d'ADNr 5S et 35S dans le même emplacement chromosomique, est en accord avec les premiers résultats de Torrell et al. (2001) effectués sur trois espèces appartenant au genre Artemisia. Cette disposition liée a été confirmée par la suite par Torrell et al. (2003) dans une étude réalisée sur sept espèces d'Artemisia y compris l'espèce Artemisia herba-alba, et par Garcia et al. (2007, 2009b) dans des travaux réalisés sur d'autres espèces appartenant à ce genre. D'autre part, l'hybridation in situ en fluorescence est considérée comme une technique semi-quantitative dans laquelle l'intensité des signaux peut fournir une indication sur le nombre de copies du gène ciblé (Maluszynska et Heslop-Harrison, 1993). En fait, les loci d'ADNr situés dans les positions d'ADNr télomériques et subtélomériques, tels qu'observés ici, pourraient faciliter l'association inter-chromosomique des gènes, augmentant ainsi les chances d'échanges inégaux conduisant à des augmentations / diminutions du nombre de copies des gènes ribosomiques (Liu et Davis, 2011). Il est donc possible qu'un tel processus soit responsable des faibles intensités du signal observées chez l'espèce Artemisia herba-alba de l'Algérie.

# IV.2.3 Taille du génome

La présente étude fournit une première estimation des quantités d'ADN nucléaire de l'espèce *Artemisia herba-alba* de l'Algérie. Les résultats des valeurs moyennes de la quantité d'ADN nucléaire (2C) obtenues dans cette étude pour des populations diploïdes (2C = 6,42 pg) et tétraploïdes (2C = 12,77 pg) d'*Artemisia herba-alba* d'Algérie sont semblables à ceux obtenus chez les populations Ibériques d'*Artemisia herba-alba* (Torrell et Vallès, 2001a), où des valeurs 2C de 6,57 pg (*Artemisia herba-alba* ssp. *valentina*) et 12,48 pg (*Artemisia herba-alba* ssp. *herba-alba*) ont été obtenues respectivement pour les populations diploïdes et tétraploïdes. Ces résultats sont en accord avec les données sur le genre *Artemisia* dont la taille du génome holoploïde (valeurs 2C) varie de 3,5 (*Artemisia annua* L., Torrell et Vallès, 2001a) à 31,51 pg (*Artemisia copa* Philippi, Pellicer *et al.*, 2010a), avec une moyenne dans le genre selon Garnatje *et al.*, (2010) in Vallès *et al.*, (2011) de 11,42 pg.

Les valeurs des quantités d'ADN chez les cytotypes diploïdes d'*Artemisia herba-alba* représentent quasiment la moitié de la quantité d'ADN de leurs cytotypes tétraploïdes correspondants, ceci expliquerait la corrélation positive entre la quantité d'ADN nucléaire (2C) et les deux paramètres caryotypiques ; la longueur totale du caryotype (LTC) et le nombre de chromosomes (2n). Ce résultat a été obtenu aussi chez *Artemisia campestris* (Torrell *et al.*, 2001) ; une espèce qui se rencontre dans les mêmes conditions écoclimatiques que *Artemisia herba-alba*. Cette valeur n'est pas toujours rencontrée. A titre d'exemple, dans *Artemisia vulgaris*. Le cytotype tétraploïde, qui est en outre hyper-aneuploïde avec 2n = 34, n'a que 33% d'ADN nucléaire de plus que le cytotype diploïde (2n = 16) (Torrell et Vallès, 2001a).

### IV.2.3.1 Variations intra-cytotype de la quantité d'ADN nucléaire

Les différences significatives intra-cytotype des valeurs 1Cx et 2C, détectées par le test ANOVA, dont l'ordre de grandeur est relativement élevé (33 % dans les populations diploïdes et 19 % dans les populations tétraploïdes), confirment les résultats de Garcia *et al.* (2006) pour des populations spontanées d'*Artemisia arborescens* L. et *Artemisia absinthium* L., pour les quelles, des différences intra-populationnelles, de l'ordre de 8,8 % et 6 % ont été respectivement observées. Ces taux s'élèvent jusqu'à 14 % chez des spécimens cultivées d'*Artemisia arborescens*. Des résultats similaires de la variation intraspécifique de la taille du

génome de l'ordre de 21 à 26 % ont été également observés par Zaitlin et Pierce (2010) au sein du groupe de *Sinningia speciosa* (Lodd.) Hiern, sauvages.

Dans d'autre part, de nombreuses études montrent un faible pourcentage de variation intraspécifique. Garcia *et al.* (2008), ont observé des différences négligeables dans la taille du génome intraspécifique dans les espèces du sous-genre *Tridentatae*; endémique de l'Amérique du nord, dont la plus part allant de 1 à 2 %. Des résultats similaires, mais statistiquement significative de la variation intraspécifique de la taille du génome, de l'ordre de 1,6% ont été obtenus par Lysák *et al.* (2000) pour différentes populations, géographiquement isolées de *Sesleria albicans* Kit.

# IV.2.3.2 Réduction de l'ADN monoploïde 1Cx chez les polyploïdes

La réduction relative dans les quantités de 1Cx chez les populations tétraploïdes en comparaison avec les populations diploïdes observée dans cette étude, est en accord avec les propos de Pellicer et al. (2010b) pour des espèces du genre Artemisia, et Garcia et al. (2008) pour des espèces du genre Artemisia, sous-genre Tridentatae (Rydb.) McArthur (Artemisia sect. Tridentatae Rydb.) originaire de l'Amérique du Nord. La même observation a été faite par Leitch et Bennett (2004) chez les angiospermes d'une manière générale. Par contre, Pellicer et al. (2010a) n'ont pas trouvé de réduction dans la quantité de 1Cx dans les espèces d'Artemisia endémiques de l'Amérique du Sud.

### IV.2.3.3 Effet de l'altitude sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n

Le paramètre de la position altitudinale des différentes populations étudiées a été inclus dans cette étude, car il peut refléter une capacité de la plante à coloniser différents environnements et habitats (Garcia *et al.*, 2008). Pour la quantité d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx, bien que des variations significatives aient été observées sur ce paramètre en fonction des variations des altitudes, une faible corrélation négative statistiquement non significative a été, en revanche enregistrée. Ce qui rend ces résultats difficiles à interpréter. A l'opposé de ce constat, les variations significatives du paramètre 2C en fonction des variations des altitudes observées dans cette étude, sont accompagnées par des corrélations significatives positives avec l'élévation. Ces résultats confirment des études précédentes ayant suggéré une augmentation de la teneur en ADN comme adaptation à des altitudes élevées (Cerbah *et al.*, 1999 – dans le groupe d'espèces d'*Hypochaeris*; Godelle *et al.*, 1993 – dans le complexe de *Crepis praemorsa*; Rayburn et Auger, 1990, et Bennett et Smith, 1976 – dans les cultures).

Par contre, Torrell et Vallès (2001a), Garcia *et al.* (2004) et Garcia *et al.* (2008), en étudiant différents taxons du genre *Artemisia*, n'ont trouvé aucune preuve de variation de la taille du génome en fonction des variations altitudinales. De plus, une corrélation négative entre la taille du génome et l'altitude a été rapportée par Reeves *et al.* (1998) dans *Dactylis*.

L'augmentation observée dans les quantités d'ADN holoploïde 2C en fonction de l'augmentation de l'élévation semble être une conséquence du phénomène polyploïdisation. Une corrélation significative positive entre le nombre de chromosome 2n et l'augmentation de l'élévation a été enregistrée. A l'exception de la population P60 diploïdes situées sur une altitude de 1800 m, toutes les populations situées sur des altitudes supérieures à 1000 m (12 populations) sont tétraploïdes. En outre, nous avons constaté que les deux positions extrêmes d'élévation 545 m et 1800 m sont occupées par les deux populations diploïdes P17 et P60 respectivement. Ces résultats confirment ceux obtenus par Garcia et al. (2008), ayant constaté que l'espèce Artemisia frigida Willd., rencontrée dans l'Amérique du Nord, et qui présente l'une des tailles de génome les plus faibles d'Artemisia, occupe différentes altitudes allant de 900 à 3500 m. Selon les mêmes auteurs, sa petite taille de génome peut bien être impliquée dans cette large adaptabilité. En revanche, pour les populations tétraploïdes, nous avons observé que ces dernières sont distribuées sur des altitudes allant de 550 m (P6) jusqu'à 1300 m (P11). Elles présentent ainsi un espace d'élévation plus étroit par rapport aux populations diploïdes. Cette donnée confirme celle de Garcia et al. (2008), ayant observe que l'espèce Artemisia pygmaea Gray., notée par sa plus grande taille de génome des espèces étudiée, ne pousse que dans un intervalle d'élévation étroit.

#### IV.2.3.4 Effet de la mise en défens sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n

La mise en défens est une technique naturelle qui consiste à mettre au repos, par des rotations périodiques, des surfaces dégradées afin d'y favoriser la restauration de l'écosystème (Diatta et al., 2000). Il est intéressant de souligner que le choix de l'emplacement de la mise en défens est sujet à la disponibilité des ressources pastorales et aux conditions écologiques du parcours. Selon Mata et al. (2000), dans les régions arides, caractérisées par une forte variabilité climatique, l'effet de la protection dépend surtout de la pluviométrie, puisque l'eau demeure le facteur le plus déterminant de la dynamique de la végétation au sein de ces écosystèmes.

Les travaux phytoécologiques ont mis en évidence un impact positif des mises en défens sur la remontée biologique par augmentation quantitative et qualitative du taux de recouvrement de la végétation, de la richesse floristique et de la phytomasse (Benaradj *et al.*, 2010; Acherkouk *et al.*, 2012; Maatougui *et al.*, 2013). C'est dans cette optique que le paramètre « mise en défens » a été retenu dans cette étude afin de vérifier si il existait des différences dans la taille du génome entre les populations d'*Artemisia herba-alba* situées dans des aires protégées et non protégées.

Parmi les 28 populations étudiées, 16 populations (P2-P4, P6, P10-P16, P26, P31, P33, P38 et P39), sont situées dans des parcours protégés par le HCDS et l'INRF (P2), et sont par conséquent en bon état de conservation. Le reste, soit 12 populations (P1, P5, P7-P9, P17-P20, P37, P40 et P60), sont situées dans des zones ouvertes, et exposées aux différents facteurs de dégradation, notamment, la sècheresse, le pacage et le défrichement. Leur état est "Plus ou moins" dégradé. Toutes les populations des zones protégées sont tétraploïdes - exception pour la population P6 qui présente à la fois des individus diploïdes et tétraploïdes-tandis que les populations des zones dégradées sont en majorité (55 %) diploïdes.

Les résultats de l'analyse de la variance ont montré des différences non significative (P = 0,79) dans les quantités d'ADN nucléaire monoploïde 1Cx entre les populations protégées et les populations non protégées. En revanche, pour les deux autres paramètres liés à la polyploïdie, en l'occurrence 2C et 2n, le test ANOVA a montré des différences significatives dans les quantités d'ADN 2C et le nombre de chromosomes entre les populations protégées et celles non protégées. L'origine de cette variation pourrait être attribuée au phénomène de polyploïdisation qui est corrélée à d'autres facteurs écoclimatiques comme nous allons le voir dans les sections suivantes. En analysant uniquement les variations des quantités d'ADN 2C dans les populations tétraploïdes, les résultats n'ont pas révélé des différences significatives dans la taille du génome « 2C » entre les populations protégées et les populations non protégées, ce qui confirme bien que la mise en défens n'a pas un effet significatif sur les variations de la quantité d'ADN nucléaire holoploïde 2C.

En consultant la bibliographie, nous n'avons pas rencontré des études traitant l'impact de la mise en défens sur les variations de la taille du génome. Cependant, plusieurs travaux se sont intéressés à l'étude de la variation intraspécifique de la teneur en ADN nucléaire entre les populations sauvages et leurs cultivars. Bennett et Bennett (1992), en mesurant les quantités d'ADN nucléaire 2C chez 10 populations de *Milium effusum* L. (*Poaceae*), ont trouvé que les plantes issues de populations cultivées présentent des quantités d'ADN significativement plus

grandes que les plantes prélevées dans des populations spontanées, et ce malgré la présence d'un nombre constant de chromosomes et l'absence de différences évidentes dans le caryotype. A l'opposé de ces résultats, Garcia *et al.* (2006) ont trouvé que les populations sauvages d'*Artemisia arborescens* avaient des tailles du génome significativement plus grandes que les populations cultivées (environ 5 %), et étaient également plus grandes que les cultivars connues (près de 3 %), en concluant que le processus de domestication chez cette espèce a conduit à une diminution progressive de son génome.

# IV.2.3.5 Effet des facteurs écoclimatiques « tm » et « P/ETP » sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n

Des études antérieures suggèrent que la variation de la teneur en ADN est corrélée avec les facteurs environnementaux (à titre d'exemple : Wakamiya *et al.*, 1993; Turpeinen *et al.*, 1999; Suda *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2005). Cependant, des rapports contradictoires quant à la nature des relations entre la taille du génome et les facteurs environnementaux sont toujours pertinents (Knight et Ackerly, 2002).

Le test de corrélation fait état de réponses significatives de la taille du génome 2C et du nombre de chromosomes 2n aux deux facteurs écoclimatiques principaux ; le stress thermique dû au froid de l'hiver (tm) et le stress hydrique ou degré d'aridité du climat (P/ETP) ont été observées.

# IV.2.3.5.1 Effet de la température minimale de janvier « tm » sur les paramètres <math>1Cx, 2C et 2n

Bien qu'une faible corrélation positive significative ait été enregistrée entre la taille du génome monoploïde 1Cx et la température minimale du mois le plus froid (tm), la taille du génome holoploïde 2C a montré une importante corrélation négative avec « tm ». Ceci est en concordance avec les résultats de plusieurs travaux précédents : Knight et Ackerly (2002), en examinant la variation de la teneur en ADN 2C pour 401 espèces de la flore californienne écologiquement diversifiée, ont confirmé qu'il y avait une relation linéaire négative significative entre la teneur en ADN 2C et la température minimale de janvier. MacGillivray et Grime (1995) en mesurant la tolérance au gel, ont constaté que les espèces qui ont survécu à des températures plus froides avaient tendance à avoir une taille du génome plus grande (corrélation négative avec la température). Grime et Mowforth (1982) et Grime *et al.* (1985) ont mesuré le moment de la croissance printanière de plusieurs espèces de la flore du

Royaume-Uni. Les espèces qui ont retardé la croissance jusqu'à ce que le printemps et l'été soient plus chauds ont tendance à avoir une taille du génome plus petite. Ceux qui se sont développées tôt au printemps avaient une plus grande taille du génome (corrélation négative avec la température). Campbell *et al.* (1999) ont trouvé la même corrélation pour les populations de trèfle blanc. Cependant, Bretagnolle et Thompson (1996) ont trouvé la relation inverse pour les populations sympatriques de *Dactylis glomerata* L.

#### IV.2.3.5.2 Effet de P/ETP sur les paramètres 1Cx, 2C et 2n

L'aridité du climat a été estimée par le quotient pluvio-évapotranspiratoire (P/ETP), ce dernier est corrélé avec la pluviométrie annuelle. La relation entre la taille du génome 2C et les précipitations est largement discutée, avec des rapports par fois contradictoires. Knight et Ackerly (2002) ont rapporté des corrélations positives entre les tailles des génomes et les précipitations annuelles. Ceci confirme bien nos résultats pour une corrélation positive de la taille du génome 2C avec P/ETP. Price et al. (1981), et Castro-Jimenez et al. (1989) ont également trouvé des relations positives. Bottini et al. (2000) font état d'une corrélation négative, mais la disponibilité de l'eau différait entre les sites indépendamment de la pluviométrie moyenne annuelle. Les populations qui se sont trouvées dans des sites où la disponibilité en eau était élevée avaient tendance à avoir une taille du génome plus grande (aucune statistique n'a été présentée pour étayer cette affirmation). D'autres chercheurs ont trouvé des résultats négatifs ou non concluants. Par exemple, Wakamiya et al. (1993) ont trouvé une corrélation négative entre les précipitations annuelles et la taille du génome pour 18 pins nord-américains. Suda et al. (2003) ont également trouvé une corrélation négative pour plusieurs espèces de la flore Micronésienne. Garcia et al. (2004) ont constaté qu'à l'échelle diploïde, les taxons bien adaptés aux conditions extrêmes de la température et la sècheresse des régions désertiques ou semi-désertiques d'Asie centrale (Artemisia leucodes Schrenk), et d'Amérique du Nord (Artemisia pygmaea A. Gray) et dans les déserts sableux d'Amérique du Nord (Artemisia filifolia Torrey) présentent des quantités d'ADN plus élevées parmi toutes les espèces d'Artemisia analysées (relations négatives). Garcia et al. (2008) n'ont trouvé aucune différence significative entre les groupes des taxons de Tridentatae; endémique de l'Amérique du nord, en fonction des précipitations annuelles et la tolérance à la sècheresse. De même, Sims et Price (1985) n'ont trouvé aucune relation significative entre la taille du génome et les estimations des précipitations annuelles moyennes dans les aires de répartition de 16 espèces d'Helianthus.

# IV.2.3.6 Effet des facteurs environnementaux sur la distribution spatiale des deux cytotypes

La projection des individus (populations) sur le plan factoriel de l'ACP et les résultats du test d'indépendance de Ch<sup>2</sup> entre la polyploïdie et le climat montrent que la rudesse de l'hiver et l'aridité du climat jouent un rôle capital dans la distribution géographique des deux cytotypes d'Artemisia herba-alba en Algérie steppique et saharienne. En effet, tous les cytotypes diploïdes sont distribués exclusivement dans des zones marquées par des hivers frais à tempérés et de climats arides ou sahariens. Outre la population P60 diploïde, située dans la région du Hoggar (W. de Tamanrasset) à l'extrême sud Algérien dans un climat saharien caractérisé par une température minimale : tm = 4,2 °C et un indice d'aridité P/ETP = 0,04 avec une pluviométrie annuelle moyenne P = 49 mm, tous les autres cytotypes diploïdes sont situés dans la partie centrale de la zone étudiée, dans un couloir aride allant du centre de la steppe (Wilaya de M'sila) jusqu'à la Wilaya de Biskra vers l'Est, sur une distance approximative de 200 km. En revanche, et contrairement aux cytotypes diploïdes distribués exclusivement dans des conditions arides et sahariennes, les cytotypes tétraploïdes présentent une distribution spatiale plus large couvrant presque toute la steppe Algérienne (excepté pour le grand sud où ce cytotype n'a pas été rencontré) avec une grande adaptation aux variations des conditions hydriques et thermiques allant de l'aride inférieur tempéré (AIt ; P20) jusqu'au semi-aride inférieur froid (SAIff; P40). Cependant, la contribution de chacun des paramètres écoclimatiques dans la distribution spatiale des deux cytotypes ne semble pas équivalente. En ce qui concerne la variante thermique, toutes les populations situées dans des zones marquées par une température minimale (tm) inférieure à 1,6 °C (16 populations, soit 57 %) sont des populations polyploïdes. Cela explique bien que c'est plutôt le facteur tm qui est le plus déterminant dans la distribution spatiale des deux cytotypes. L'adaptation d'avantage des cytotypes tétraploïdes d'Artemisia herba-alba aux climats marqués par des hivers froids en comparaison avec les cytotypes diploïdes corrobore avec les conclusions de plusieurs auteurs (Löve et Löve, 1943; Clausen et al., 1945; Packer, 1969; Suda et al., 2009) pour une distribution d'avantage des polyploïdes dans des environnements extrêmes en comparaison avec des diploïdes, ce qui était souvent attribué à une plus grande résistance au froid et à la tolérance aux longues photopériodes (Husband et al., 2013). Ces résultats supportent aussi les conclusions de Boussaid (2013) pour une meilleure adaptation des polyploïdes de Stipa tenacissima de l'Algérie aux environnements extrêmes.

Dans d'autre part, la distribution des polyploïdes en fonction de l'aridité du climat a suscité beaucoup de discussions avec des rapports non concluants. Plusieurs auteurs ont signalé que les polyploïdes sont plus fréquents dans des environnements plus secs que les diploïdes (Sanderson *et al.*, 1989; McArthur et Sanderson,1999; Vallès *et al.*, 2001a et 2001b; Levin, 2002; Buggs et Pannell, 2007; Maherali *et al.*, 2009; Manzaneda *et al.*, 2012). Par contre, Martin et Husband (2009), dans une analyse récente, ont comparé l'étendue et les aires géographiques et écologiques moyennes des taxons diploïdes et polyploïdes dans 144 genres de plantes nord-américaines. Ils n'ont trouvé aucune différence dans les aires de distribution géographique entre les deux niveaux de ploïdie en fonction des variations des températures et de précipitations. Dans la présente étude, bien qu'une tendance légère de distribution des populations diploïdes dans des climats plus arides (par exemple la P60) vis-à-vis des tétraploïdes a été observée, il ne nous a pas été possible de prospecter d'une manière suffisante l'effet de l'aridité du climat sur la distribution spatiale des deux cytotypes, étant donné que 96 % des populations échantillonnées sont récoltées dans des climats arides et semi-arides.

#### IV.2.4 Étude phylogénétique et phylogéographique

Les valeurs des indices de différenciation génétique obtenues dans cette étude pour 17 populations Algériennes d'Artemisia herba-alba sur la base de l'identité des haplotypes (Gst = 0,518), ainsi que sur la base de la proportion des sites polymorphes qui distinguent chaque paire d'haplotypes (Nst = 0,615), sont très proches de ceux obtenues par Shimono et al. (2013) (Gst = 0,544; Nst = 0,618) pour 28 populations Japonaises d'Artemisia indica Willd. La différenciation génétique inter-population (Gst) obtenue est légèrement en dessous de la valeur moyenne (Gst = 0,670) détectée chez 183 espèces de plantes compilées par Petit et al. (2005).

L'analyse de la structure génétique a montré un faible niveau de diversité génétique intrapopulation (π), traduit par un nombre important de populations monomorphes. Ce faible niveau, révélé par des marqueurs chloroplastiques, a été également observé dans d'autres espèces du genre Artemisia (Artemisia halodendron Turcz., Huang et al., 2013; Artemisia eriantha Ten., Sanz et al., 2014; Artemisia crithmifolia L., Garcia-Fernandez et al., 2017; Artemisia eriantha Ten., Sanz et al., 2014). Dans d'autres parts, les populations diploïdes se sont montrées plus diversifiées en comparaisons avec les populations tétraploïdes, (50 % des populations diploïdes contenant des haplotypes multiples contre 18,75 % dans les populations tétraploïdes), cette observation concorde avec les résultats de Rois *et al.* (2015) ayant constaté que la diversité des haplotypes et des nucléotides est plus élevée chez les diploïdes que chez les tétraploïdes.

La diversité haplotypique (*Hd*), comparée avec celle détectée par Huang *et al.* (2013) (*Hd* = 0,83), Garcia-Fernandez *et al.* (2017) (*Hd* = 0,69) et Huang *et al.* (2013) (*Hd* = 0,83) est également faible. Cela est la conséquence du nombre réduit (35,29 %) des haplotypes multiples par population. La grande richesse en haplotypes se trouve localisée dans la région Centre-Est de l'Algérie qui est marquée également par une importante distribution des cytotypes diploïdes.

Malgré les faibles diversités haplotypiques et intra -populationnelles observées, et l'aire géographique relativement réduite des populations d'*Artemisia herba-alba* échantillonnées en comparaison avec l'aire potentielle de distribution de cette espèce dans le monde, l'existence d'un composant phylogéographique à cette structure génétique est indiquée par une valeur *Nst* significativement plus élevée par rapport à *Gst* (P < 0,01). Ce qui reflète le fait que les haplotypes distincts mélangés dans la même population sont en moyenne plus étroitement apparentés que les haplotypes distincts de différentes populations. Autrement dit, les haplotypes phylogénétiquement les plus proches sont mélangés dans les mêmes populations.

Cette structure phylogéographique se manifeste par i) une diversité élevée dans le Centre-Est ii) une séparation géographique des haplotypes divergents est décelable à l'intérieur de cette zone de diversité élevée, iii) une baisse de la diversité accompagnée par l'apparition des haplotypes plus distincts, dans les habitats géographiquement les plus éloignées à l'Ouest et l'extrême sud (Hoggar) Algérien.

Au plan phylogénétique, la position de deux haplotypes H5 et H6 dans la limite Sud-est de l'aire de répartition des populations étudiées, et qui se trouvent géographiquement les plus proches de l'haplotype H10 (Figure 36), suggère que ce dernier est probablement dérivé de ces deux haplotypes. La topologie de l'arbre phylogénétique (Figure 37) soutient cette hypothèse, les trois haplotypes sont situés dans le même cluster.

La position de l'haplotype H4 dans le graphe du cladogramme (Figure 37) est congruente avec sa position dans le réseau d'haplotypes (Figure 35) qui le place relativement éloigné de l'haplotype H7 par quatre pas mutationnels. La distance géographique relativement éloignée entre les deux haplotypes (H4 et H7), pourrait expliquer leur position phylogénétique dans le cladogramme.

### **CHAPITRE V**

# Discussion générale

#### V. Discussion générale

### V.1 Étude caryologique

La polyploïdie est l'un des principaux mécanismes évolutifs chez les plantes (Otto et Whitton, 2000; Soltis et Soltis, 2000; Cui et al., 2006). Ce mécanisme est très courant dans le genre Artemisia, où les niveaux de ploïdie jusqu'à 16x ont été signalés (Pellicer et al., 2010a). Les populations polyploïdes nord-africaines d'Artemisia herba-alba reflètent un processus de différenciation du génome chez cette espèce. La même situation dans les populations Ibériques a conduit à la prise en compte de deux taxons, séparés soit à des niveaux spécifiques soit à des niveaux sous-spécifiques [2x: Artemisia valentina Lam., Artemisia herba-alba ssp. valentina (Lam.) Mascl.; 4x: Artemisia aragonensis Lam., Artemisia herba-alba ssp. Artemisia herba-alba], bien que leur distinction morphologique soit très difficile (Vallès, 1987). Cependant, la polyploïdie n'est pas le seul mécanisme d'évolution du génome. D'autres mécanismes modifiant la taille, la forme et le nombre de chromosomes, ont été examinés plus tôt par Darlington (1937), Stebbins (1971), Levin (2002) et Schubert et Lysak (2011). Les translocations robertsoniennes et les fissions centriques peuvent entraîner une réduction ou une augmentation du nombre de chromosomes (dysploïdie descendante / ascendante). D'autres mécanismes tels que les insertions, les additions, les délétions, les inversions et les translocations réciproques peuvent modifier la taille et la morphologie des chromosomes.

Les différences structurelles observées dans le nombre et la position des chromosomes submétacentriques dans les caryotypes de chacun des deux cytotypes peuvent être expliquées par ces mécanismes. La délétion d'un segment du chromosome n° 13 par exemple, peut réduire sa taille pour qu'il soit décalé dans le classement et devenir le chromosome n° 12. Ou encore un chromosome métacentrique peut devenir submétacentrique après une translocation (Betina, 2004). Les différences caryomorphologiques structurelles intra-cytotypes peuvent occulter d'autres différences caryosystématiques et évolutionnaires qui ne peuvent être détectées que par d'autres techniques telles que les techniques de banding (Giemsa C-banding et le chromomycine et bisbenzimide fluorochrome banding) et le FISH (Vallès et Siljak-Yakovlev, 1997; Torrell *et al.*, 2003)

Selon Stebbins (1971), les caryotypes asymétriques sont considérés les plus évolués par rapport aux caryotypes symétriques dont ils dérivent. De ce fait, la symétrie observée dans les

deux cytotypes, suggère un état primitif chez l'espèce *Artemisia herba-alba*. Des analyses récentes chez les *Brassicaceae* persuadent en fait, que l'asymétrie du caryotype pourrait être un état transitoire plutôt qu'un simple critère évolutif dérivé (Lysák *et al.*, 2006; Mandáková et Lysák, 2008).

L'absence de satellite dans les populations algériennes d'Artemisia herba-alba peut être expliquée par une spiralisation occultant ces structures (Khalfallah, 1990), comme il peut être lié à la fragilité des extrémités satellifères. Ces dernières, lors du montage et écrasement des chromosomes, se détachent systématiquement en produisant des chromosomes dépourvus des satellites (Markarian et Schulz-Schaeffer, 1958; Naranjo et al., 1998). Une dernière hypothèse que nous pouvons émettre sur l'absence des satellites et qui corrobore avec les suggestions de Betina (2004), c'est que les caryotypes d'Artemisia herba-alba d'Algérie existent sous cet aspect, et qu'ils présentent une spécificité endémique au Nord de l'Afrique.

## V.2 Étude de la cartographie physique de l'ADNr

L'ADN ribosomique nucléaire (ADNr) codant pour l'ARNr 5S, 5,8S, 18S et 26S appartient aux principaux gènes d'entretien jouant un rôle central dans le métabolisme cellulaire (Grummt, 1999). Typiquement, ces gènes se produisent comme des unités répétitives arrangées en tandem qui varient considérablement en nombre de copies entre les espèces, de quelques centaines à plusieurs centaines ou même des milliers d'exemplaires (Garcia et al., 2017). Dans la plus part des plantes et des animaux, les gènes d'ARNr 5S sont physiquement séparés (arrangement séparé de type-S) des gènes d'ARNr 35S (18S-5.8S-26S). Cependant, des exceptions notables à cette règle ont été constatées chez certaines espèces où des arrangements de type-L ont été observés chez certains groupes de végétaux (par exemple, Sone et al., 1999; chez les bryophytes; Galian et al., 2012 chez Ginkgo; Garcia et Kovarık, 2013 dans d'autres gymnospermes comme les Pinaceae, les Cupressaceae et les Podocarpaceae). Parmi ces groupes, figure aussi le genre Artemisia dans lequel, de nombreuses études utilisant la technique de FISH effectuées sur plusieurs espèces de ce genre (Torrell et al., 2001, 2003; Hoshi et al., 2006; Garcia et al., 2007; Pellicer et al., 2008; Garcia et al., 2009b, 2010; 2010a; ) ont fait état d'une colocalisation des deux gènes ribosomiques 5S et 18S-5.8S-26S dans le même locus. Nos résultats qui ont révélé une colocalisation des deux gènes sur le même site chromosomique confirment les conclusions de ces travaux. En fait, la présence de ce type de disposition dans le genre Artemisia, fait de ce dernier une exception, en raison de sa rareté dans les spermatophytes (Vallès et al., 2011). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer cette structure liée. D'après Vallès et al. (2011), cette observation cytogénétique pourrait être interprétée de différentes façons: i) les deux gènes ribosomiques 5S et 35S sont indépendants l'un de l'autre et situés sur des *loci* proches sur le chromosome, ii) il y a plusieurs unités de 5S et 35S organisées en tandem et regroupées dans un locus ou, iii) finalement, tous les gènes de l'ARNr étaient liés dans un nouveau type d'unité d'ADN. Les travaux récents de Garcia et al. (2009b, 2010) utilisant des techniques de l'hybridation moléculaire Southern Blot et le séquençage d'ADNr, ont démontré que c'est plutôt la troisième hypothèse qui donne une explication acceptable à la structure liée des deux gènes ribosomiques 5S et 35S. Ces résultats ont démontré que ces gènes sont tous disposés dans un opéron unique contenant le gène 5S et les gènes 35S. Ces derniers sont composés de deux unités (5S-1et 5S-2) insérées dans une orientation inversée à l'intérieur de la grande unité de l'espace intergénique (IGS) entre les deux unités 26S et 18S de l'ADNr 35S. L'importance de cette structure selon Garcia et al., (2016), réside dans le fait que la séquence entre les gènes 5S et 26S, appelée IGS1, présente un polymorphisme significatif de longueur et de séquence, et pourrait être ainsi utilisée, à l'image de la région ITS1, comme un marqueur approprié pour inférer des relations phylogénétiques dans les espèces de type-L. Il y a lieu de noter que l'activité des gènes liés reste inconnue jusqu'à présent (Garcia et al., 2012b).

L'organisation liée (de type-L) des deux gènes ribosomiques 5S et 35S observée chez les genres proches et aussi les genres phylogénétiquement moins proches à *Artemisia* (*Ajania* et *Nipponanthemum*) laisse à penser que l'arrangement lié est apparu avant la séparation du genre *Artemisia* du reste de la famille des *Asteraceae* (> 10 Ma) (Garcia *et al.*, 2016). Les mécanismes conduisant à cet arrangement lié sont probablement les recombinaisons d'ADN et / ou l'activité des éléments transposables (Drouin et de Sá, 1995 ; Garcia *et al.*, 2016).

le sens de l'évolution de la structure liée (type-L) de l'ADNr 5S-35S vis-à-vis la structure séparée (type-S) est largement discutée, avec des rapports non concluants. D'après Garcia *et al.* (2012), le statut ancestral de la structure de type-L ou S chez les angiospermes reste à déterminer. Alors que, l'arrangement de type-L est observé chez des espèces précoces telles que les algues streptophytes et les plantes vertes qui se sont divergentes au début, telles que les hépatiques, les mousses, les anthocérotes, les lycophytes et les monilophytes (Sone *et al.*, 1999; Wicke *et al.*, 2011), ce qui mène à dire que l'arrangement lié (type-L) de l'ADNr 35S-5S est le plus primitif, et par conséquent comme l'état ancestral, les résultats de la reconstruction phylogénétique basée sur l'examen de la structure et l'organisation de l'ADNr indiquant que près de 25% des espèces d'*Asteraceae* présenteraient exclusivement

l'arrangement lié qui apparait à des niveaux taxonomique inférieurs tels que le genre (Garcia et al., 2009b, 2010). Cela signifié que l'intégration du gène 5S dans l'unité 35S pourrait avoir eu lieu à plusieurs reprises pendant l'évolution de la plante, et probablement une fois dans les Asteraceae (Garcia et al., 2010), et par conséquent, l'arrangement de type-L des deux gènes ribosomiques 5S et 35S aurait remplacé l'arrangement de type-S par une évolution accumulée (Garcia et al., 2016). Cependant, la tendance inverse, de l'arrangement lié (type-L) vers l'arrangement séparé (type-S) a également été supposée dans quelques espèces indiquant une réversibilité possible de ces processus (Garcia et al., 2010).

# V.3 Étude de la taille du génome

La taille du génome obtenue par cytométrie en flux pour l'espèce *Artemisia herba-alba* de l'Algérie est considérée, selon les classifications de Leitch *et al.* (1998) et Soltis *et al.* (2003), comme petite à intermédiaire.

L'ampleur de la variation intraspécifique de la taille du génome holoploïde (valeur C; C-value en anglais) a été largement débattue (Greilhuber, 2005). Bien que de nombreux exemples de variation intraspécifique de la valeur C aient récemment été montrés comme des artéfacts des méthodes de mesure (Greilhuber, 2005; Murray, 2005), suite à des erreurs méthodologiques ou d'une mauvaise identification des taxons (Greilhuber, 1998; Ohri, 1998), ou à cause de la présence de composés cytosoliques (comme l'acide chlorogénique ou la caféine, Noirot et al. (2000)), conduisant à une variation pseudo-intraspécifique de la taille du génome, de nombreux rapports continuent de documenter des véritables variations intraspécifiques de la taille du génome lorsque les conditions de l'expérience et le choix du standard approprié sont respectés (Bennett et Thomas, 1991; Reeves et al., 1998; Hall et al., 2000; Moscone et al., 2003; Garcia et al., 2006). Ceci pourrait être le cas d'Artemisia herba-alba d'Algérie; étant donné que les mesures ont toujours été faites avec le même standard interne et avec le même cytomètre de flux pour chaque population, et l'absence dans Artemisia de l'acide chlorogénique ou la caféine (Garcia et al., 2006) qui peuvent provoquer des biais dans les évaluations de la taille du génome, nous croyons que les différences détectées dans cette étude reflètent une variation intra-cytotype réelle.

La compréhension avancée du génome nucléaire et de ses composants fournit des indices quant aux mécanismes qui pourraient être responsables aux changements du génome. En fait, les variations de la taille du génome au sein des espèces sont en général, attribuées à

l'amplification de l'ADN répétitif non codant, en particulier les rétrotransposons (Leitch et Leitch, 2013). D'après Narayan (1998), le génome d'eucaryotes (estimé à 100 000 gènes codés) représente approximativement 0,12 pg d'ADN, alors qu'une grande partie de l'ADN génomique - plus de 90% dans plusieurs plantes supérieures - ne code pas l'information génétique. Les séquences d'ADN excédentaires ont été décrites de diverses façons par différents auteurs comme «indésirables», «égoïstes» ou «parasitaires» (Doolittle et Sapienza, 1980; Orgel et Crick, 1980). Ces éléments sont capables d'augmenter considérablement la taille du génome en multipliant le nombre de copies de gènes (Bennetzen, 2000). La présence d'éléments transposables (plus de 60% de certains génomes végétaux sont constitués d'éléments transposables (Bennetzen et Kellogg, 1997)) peut être aussi à l'origine de cette variation (Garcia et al., 2006). D'autres mécanismes contribuent à la variation de la taille du génome comme les phénomènes de pertes, de délétions, les variations et les réarrangements chromosomiques (par exemple, la polyploïdie, l'aneuploïdie, la présence de chromosomes B, la présence de chromosomes sexuels dimorphes (Costich et al., 1991; Poggio et al., 1998; Greilhuber, 1998; Ma et al., 2004; Vitte et Panaud, 2005; Piegu et al., 2006), le transfert du matériel chromosomique des organites vers le noyau (Adams et Palmer, 2003; Shahmuradov et al., 2003) et enfin la variation de taille et de nombre des introns (Deutsch et Long, 1999). Dans ces conditions, il est possible que la valeur C d'une espèce, bien qu'elle soit relativement constante, permette un certain degré de variation raisonnable (Garcia et al., 2006).

Les différences significatives constatées ici dans la taille du génome dans chaque niveau de ploïdie pourraient être dues à quelques pertes, gains, réarrangements des chromosomes, ou à À des changements dans les dimensions des chromosomes. première l'aneuploïdie/dysploïdie n'est pas la plus probable des causes possibles, et ce pour deux raisons. Primo, tous les comptages chromosomiques effectués sur Artemisia herba-alba ont démontré que cette espèces contient deux nombres chromosomiques: 2n = 18 ou 2n = 36(Watanabe, 2015). Secundo, le sous-genre Seriphidium, auquel appartient cette espèce, a été largement étudié et est en fait l'un des rares groupes d'Artemisia dépourvus de dysploïdie (Vallès et al., 2011; Malik et al., 2017). Pour éclaircir cette question, d'autres études seront nécessaires en se concentrant sur une analyse approfondie des caractéristiques caryotypiques.

Les différences des quantités d'ADN nucléaires observées à l'échelle intra-cytotype, ne semblent pas être directement associées à des facteurs environnementaux tels que l'altitude ou le climat, ni à la géographie et ne sont donc pas faciles à expliquer. Par exemple, la taille du génome la plus élevée chez les populations tétraploïdes correspond à la population P11 (Sebgag, Aflou), qui croît à 1386 m d'altitude, alors que la plus petite taille du génome a été observée chez la population P10 (Gueltet Sidi Saad, Aflou), poussant à 1210 m. Les deux populations sont géographiquement proches l'une de autre et sont situées sur des altitudes similaires qui sont les plus hautes pour toutes les populations tétraploïdes. La population P11 pousse dans un habitat de montagne avec des hivers froids, tandis que la population P10 est située dans une haute plaine, où les hivers pourraient être légèrement plus doux. En outre, la population ayant la deuxième taille de génome la plus faible parmi les tétraploïdes (P26) est située près de la Tunisie, à 1070 m à l'extrême Est Algérien. De même, les conditions climatiques ne semblent pas expliquer les différences intra-cytotype de la taille du génome dans le reste de nos données. Le même constat a été fait par Duchoslav *et al.* (2013) ayant montré que les variables environnementales n'étaient pas pertinentes dans la modulation de la taille du génome chez *Allium oleraceum* L.

Dans d'autre part, les variations de la quantité d'ADN nucléaire 2C au moyen de la polyploïdie (la polyploïdisation) et la formation des deux cytotypes d'*Artemisia herba-alba* avec des patterns bien distincts de leurs distribution spatiale en fonction des variations des conditions écoclimatiques de la zone étudiée nécessiterait d'y apporter plus d'attention, afin de comprendre leurs origines et les facteurs écoclimatiques qui les prédiquent.

Plusieurs études ont tenté de trouver une signification écologique de la variation de la taille du génome, que ce soit à l'échelle de la population ou à l'échelle de l'espèce en générale (variation intra et inter-spécifique), en utilisant des gradients environnementaux comme l'altitude et la latitude (Bennett, 1976; Teoh et Rees, 1976; Levin et Funderburg, 1979; Grime et Mowforth, 1982; Sims et Price, 1985; Rayburn, 1990; Rayburn et Auger,1990; Creber et al., 1994; Reeves et al.,1998). Ces deux gradients sont considérés comme associés à des paramètres climatiques tels que la température, les précipitations et la durée de la saison de croissance (Greilhuber et Leitch, 2013). Cependant, la non clarté dans les rapports entre la taille du génome et l'altitude ou la latitude peut survenir, car les paramètres climatiques sont les plus biologiquement pertinents en fonction desquels la taille du génome peut varier, et ceux-ci ne varient pas linéairement avec les gradients environnementaux (Manzaneda et al., 2012; Greilhuber et Leitch, 2013). Une comparaison des résultats entre différentes études a montré que les directions des relations entre la taille du génome et les paramètres environnementaux ne sont pas toujours cohérentes (Knight et al., 2005). Les résultats de Levin et Funderburg (1979), Bennett et al.(1982), Bennett (1987), et Rayburn (1990),

concluent que la vraie relation entre la taille du génome et l'altitude ou la latitude peut être représentée plus précisément par une distribution unimodale où les espèces à faible teneur en ADN peuvent exister à n'importe quelle altitude ou latitude, alors que les espèces ayant de grands génomes se situent à des altitudes et latitudes intermédiaires.

Bien que nos résultats soutiennent ces suggestions pour une distribution spatiale plus large du cytotype diploïde, et sont en accord, aussi avec les conclusions de Knight *et al.* (2005), selon les quelles les espèces à génome important sont progressivement exclues des habitats avec des températures maximales extrêmes et une diminution des précipitations annuelles (chose qui a été confirmée dans les populations diploïdes d'*Artemisia herba-alba* distribuées dans les climats arides et sahariens), l'exclusion des cytotypes diploïdes des milieux marqués par des hivers froids semble être un résultat intéressant qui nécessiterait de lui accorder plus d'importance dans l'étude cytogénétique de cette espèce, car il peut refléter une capacité accrue des cytotypes polyploïdes d'*Artemisia herba-alba* de supporter des températures hivernales plus basses en comparaisons avec leurs progéniteurs diploïdes.

La coexistence d'individus diploïdes et tétraploïdes dans la même population n'est pas rare chez *Artemisia*, car certaines populations présentant des niveaux de ploïdie mixte ont été détectées chez d'autres espèces (Kreitschitz et Vallès, 2003; Garcia *et al.*, 2009a). Selon Fowler et Levin (1984) et Rodriguez (1996), la présence de populations avec des niveaux de ploïdie mixtes, pourrait être le résultat d'un isolement prézygotique due à une ségrégation spatiale ou reproductive, ou une formation récurrente du cytotype rare (Felber, 1991; Bever et Felber, 1992). Les deux populations ayant présenté des niveaux de ploïdie mixtes (P5 et P6) sont relativement proches l'une de l'autre. Leur position géographique vis-à-vis des populations tétraploïdes se distingue par une élévation basse, et se trouvent enclavées par des barrières physiques qui sont les monts de Ouled Nnail au sud et les monts du Hodna au nord. Cet isolement géographique pourrait être à l'origine de la coexistence des deux cytotypes dans le même habitat.

La réduction du génome (valeur 1Cx) observée chez l'espèce Artemisia herba-alba d'Algérie, suite à la formation de polyploïdes est un phénomène biologique répandu plutôt qu'un artéfact (Leitch et Bennett, 2004). Sharma et Sen (2002) ont considéré qu'avec la polyploïdisation, les chromosomes ont tendance à diminuer légèrement leurs tailles, chacun de manière égale, et ont émis l'hypothèse que ce mécanisme de «renforcement» était une «stratégie de défense» contre la possibilité accrue de mutations avec polyploïdie (une augmentation de la quantité d'ADN nucléaire augmente la probabilité de mutations). Les mécanismes ayant conduit à cette

réduction de la quantité d'ADN chez les polyploïdes sont dus à l'élimination, chez certaines espèces, des séquences d'ADN non codantes (Shaked et al., 2001; Ozkan et al., 2001), et la perte de segments chromosomiques (par exemple l'hétérochromatine télomérique qui comprend principalement des séquences d'ADN hautement répétées) suite à la formation des polyploïdes (Gustafson et Bennett, 1982). Certains processus moléculaires ont été suggérés pour cette réduction du génome, comme, entre autres, l'appariement homéologue, qui peut entraîner des restructurations et des délétions chromosomiques, et donc une perte d'ADN à la suite de la rupture du système de réparation post-réplicative (Comai, 2000) ou la perte sélective de gènes (Ku et al., 2000; Simillion et al., 2002). Cependant, de nombreux mécanismes moléculaires sous-jacents responsables de ce phénomène sont encore inconnus (Garcia et al., 2005). Leitch et Bennett (2004), suggèrent qu'une force d'évolution majeure conduisant à la réduction du génome chez de nombreux polyploïdes peut simplement être une sélection naturelle pour une valeur C plus petite. Après la polyploïdisation, qui entraîne un doublement de la quantité d'ADN, la sélection naturelle peut favoriser les individus ayant des quantités d'ADN réduites (par exemple ceux ayant des mécanismes d'élimination d'ADN plus efficaces).

### V.4 Étude phylogénétique et phylogéographique

Artemisia herba-alba est une espèce anémophile qu'est pollinisée par le vent, ce mécanisme de pollinisation est presque le moyen exclusif dans les espèces du genre Artemisia (Vallès et al., 2011). L'absence de pappus dans les graines de ses espèces, leur taille relativement réduite et leur poids léger, leur permettent une dispersion à longue distance (Laursen et al., 2007). Cependant, les barrières naturelles et les distances géographiques restent toujours des facteurs limitant à cette capacité de dispersion (Sheldon et Burrows, 1973; Levin et Kerster, 1974; Loveless et Hamrick, 1984).

La diversité haplotypique relativement élevée dans la zone du Centre-Est, révélée par l'analyse de deux régions concaténées de l'ADN chloroplastique (*rpl32-trn*L et *trnV-ndhC*), pourrait être le résultat de l'absence de barrières naturelles entre les populations occupant cet habitat, et qu'était à la faveur d'une large dispersion de l'espèce et par conséquent, aux flux de gènes. En fait, cette zone est située dans un couloir aride flanquée entre deux chaines montagneuses (l'atlas Tellien et l'atlas Saharien), et s'étend depuis la cuvette du Hodna à l'Ouest jusqu'à le Sud de Tébessa à l'Est. Elle est marquée par son altitude relativement faible, l'absence d'obstacles physiques et une abondance des cytotypes diploïdes. La diversité

élevée observée dans ces populations pourrait refléter l'accumulation de mutations nucléotidiques sur de longues échelles temporelles évolutives (Chiang et Schaal, 1999, Huang et al., 2001). Cela nous permettra de formuler l'hypothèse que cette zone, qui est marquée par sa diversité élevée, soit était une zone de refuge privilégiée lors de périodes climatiques passées particulières, soit une zone de rencontre entre fronts de colonisation. Une prospection plus large, incluant toute l'aire de distribution d'*Artemisia herba-alba* dans l'Afrique du nord et le bassin méditerranéen pourrait confirmer ou infirmer cette hypothèse.

La richesse haplotypique dans les cytotypes diploïdes révélée par les espaceurs intergéniques (rpl32-trnL et trnV-ndhC) en comparaison avec les tétraploïdes, et qui est traduite par une diversité élevée dans ces cytotypes, suggère que ces haplotypes ont été perdus lors du processus de polyploïdisation. Il y a lieu de noter ici, que cette diversité génétique élevée chez les cytotypes diploïdes en comparaison avec leurs homologues tétraploïdes a été observée aussi dans les quantités d'ADN nucléaire.

D'autre part, selon Avise et al. (1987), les populations géographiquement proches sont parfois aussi génétiquement proches et appartiennent aux mêmes lignées phylogénétiques. Dans ce contexte, le faible niveau de diversité inter-populations, et la structure phylogéographique détectée par l'analyse de deux régions d'espaceurs intergéniques de l'ADN chloroplastique, pourraient être due à la distance géographique d'une part et la présence de barrières naturelles (montagnes, et Sahara) d'autre part. Partant du principe que la structuration génétique des populations végétales est fortement influencée à la fois par l'ascendance commune et par les modes actuels d'échange génétique inter-populations (Schaal et al., 1998) La position de l'haplotype H1 dans le centre du réseau haplotypique (Figure 35) et sa large distribution géographique (Figure 36) suggère que cet haplotype est probablement le plus ancien (Schaal et al., 1998), à partir duquel se sont dérivés les autres haplotypes les plus récents, situés à l'extrémité du réseau haplotypique et notés par leur distribution géographique limitée (Golding 1987; Castelloe et Templeton, 1994; Templeton et al., 1995). Le faible niveau de diversité nucléotide intra-populations détecté principalement dans les populations les plus distantes de la zone de diversification, dans la limite Nord, à l'Ouest et l'extrême Sud Algérien (le Hoggar), pourrait être le résultat d'un faible flux de gènes dû à une fragmentation de l'habitat (Zhou et al., 2010).

La baisse de diversité génétique dans la population du Hoggar (P60) renforce l'idée d'une rupture de flux de gènes causée par les barrières physiques et les longues distances géographiques. La structure génétique de son haplotype qui est phylogénétiquement plus

éloigné des autres haplotypes pourrait être le signal d'un ancien refuge de petite taille qui aurait perdu de la diversité par dérive génétique. Le cladogramme (Figure 37) a montré des liens phylogénétiques entre l'haplotype restreint dans les montagnes du Hoggar (P60) et les haplotypes H5 et H6, et un degré moindre l'haplotype H4, situés tous dans la limite sud de la steppe algérienne (Figure 36). Compte tenu du manque des données palynologiques sur les premières apparitions d'Artemisia dans la région du Hoggar, étant donné que les fossiles du pollen d'Artemisia ne sont pas encore identifiés au niveau de l'espèce (Subally et Quézel, 2002), nous suggérons que l'origine de cette espèce dans les montagnes du Hoggar remonte à la fin du Miocène. Cette période a été marquée par l'augmentation des ponts terrestres en Méditerranée (Meulenkamp et Sissingh, 2003), qui aurait également fourni des voies de migration de la flore eurasiatique vers l'Afrique et la Macaronésie comme décrit dans plusieurs autres groupes de plantes (Oberprieler, 2005; Mansion et al., 2008). La succession des phases pluviales et arides dans le Sahara ont ponctué l'histoire climatique de ce désert (Szabo et al., 1995; Maley, 2010) depuis 7 Ma de sa création (Schuster et al., 2006). Les périodes humides pluviales ont favorisé l'établissement de corridors biologiques entre les écosystèmes méditerranéens et sahariens centraux (Quézel et Martinez, 1960; Osborne et al., 2008), et certainement entre les montagnes sahariennes (Migliore et al., 2012). Ces corridors ont probablement favorisé le flux génétique entre les populations d'Artemisia herba-alba situées dans la limite sud de la steppe (P9, P11, P17, P26) et la population du Hoggar (P60). En revanche, les phases arides et les processus de désertification qui ont eu lieu pourraient avoir réduit sa distribution dans cette région. Les montagnes du Sahara Central ont constitué ainsi des refuges biogéographiques cruciaux pour cette espèce et d'autres plantes méditerranéennes incapables de survivre dans les habitats arides au-dessous de 1500 m (Migliore et al., 2012).

#### **Conclusion et perspectives**

Ce travail est une contribution à la caractérisation génétique par des approches multidisciplinaires de cytogénétique classique, de cytogénétique moléculaire et d'étude phylogénétique et phylogéographique de différentes populations d'*Artemisia herba-alba* couvrant l'aire de distribution de cette espèce en Algérie. À cette fin, nous avons établi le caryotype, étudié la localisation des gènes ribosomiques 5S et 35S, évalué la quantité d'ADN nucléaire, et enfin la diversité génétique populationnelle. Cette diversité des approches nous a fourni une multitude de renseignements qui nous ont permis d'avancer les données suivantes:

- 1- Deux nombres chromosomiques 2n = 2x = 18 (8 populations) et 2n = 4x = 36 (22 populations) chez l'espèce *Artemisia herba-alba* de l'Algérie, ont été révélés par la coloration de l'acéto orceine et confirmés par mesure de la quantité d'ADN nucléaire au moyen de la cytométrie en flux.
- 2- Deux populations, occupant une position géographique plus ou moins centrale dans la zone étudiée, présentent les deux cytotypes
- 3- Le cytotype diploïde 2n = 2x = 18 a été détecté pour la première fois en Algérie
- 4- L'analyse caryomorphologique a révélé des caryotypes symétriques, dépourvus de chromosomes B, et leurs chromosomes ne présentent pas d'extrémités satéllifères
- 5- L'étude du nombre et la localisation des gènes ribosomiques 5S et 35 S par la technique de l'hybridation *in situ* fluorescente a mis en évidence 2 *loci* dans le cytotype diploïde et 4 *loci* dans le cytotype tétraploïde. Les deux gènes se colocalisent sur le même site chromosomique.
- 6- L'étude par cytométrie en flux effectuée sur 28 populations d'*Artemisia herba-alba*, a permis de distinguer deux groupes de cytotypes selon les valeurs moyennes de leurs quantités d'ADN nucléaire (2C) : 12,77 pg chez les cytotypes tétraploïdes et 6,42 pg chez les cytotypes diploïdes.
- 7- Des variations intra-cytotype élevées, de l'ordre de 33 % dans les cyotypes diploïdes et 19 % dans les cytotypes tétraploïdes ont été détectées pour les valeurs 2C de l'ADN nucléaire.
- 8- La quantité d'ADN monoploïde a montré une réduction significative chez les cytotypes polyploïdes en comparaison avec leurs progéniteurs diploïdes.

- 9- La quantité d'ADN nucléaire 2C a augmenté significativement au moyen de la polyploïdisation chez les populations situées sur des altitudes élevées.
- 10- Les populations d'*Artemisia herba-alba* situées dans des aires protégées non pas manifesté des différences significatives pour les paramètres cytogénétiques étudiés, à savoir : 2n, 1Cx et 2C, en comparaison avec les populations non protégées.
- 11- La quantité d'ADN nucléaire (2C) et le nombre de chromosomes (2n) ont montré des réponses significatives positives vis-à-vis le quotient pluvio-évapotranspiratoire (P/ETP) et significatives négatives vis-à-vis la température minimale de janvier « tm ».
- 12- La température minimale de janvier « tm » semble être le facteur déterminant dans la distribution spatiale des deux cytotypes.
- 13- Les cytotypes à 2n = 18 sont restreints aux régions à climat aride et saharien et exclus des régions à hiver froid, alors que les cytotypes à 2n = 36 sont plus largement rencontrés.
- 14- L'étude phylogénétique et phylogéographique par l'utilisation des séquences de l'ADNcp, portée sur 84 individus issus de 17 populations d'*Artemisia herba-alba* a montré un faible niveau de diversité génétique. Mais malgré cela, il y a suffisamment de variation sur l'ADNcp pour qu'un signal phylogéographique soit détecté.
- 15- L'haplotype H1 est probablement le plus ancien à partir duquel se sont dérivés les autres haplotypes les plus récents.
- 16- La région du Centre-est s'est montré la plus diversifiée, ce qui laisse à penser que cette zone était, soit une zone de refuge privilégié, soit une zone de rencontre entre fronts de colonisation ; à partir de la quelle ont dérivé les haplotypes rares.
- 17- Le faible niveau de diversité intra-populations détecté principalement dans les populations les plus distantes de la zone de diversification, pourrait être le résultat d'un faible flux de gènes dû à une fragmentation de l'habitat.
- 18- La population P60 située dans l'extrême sud Algérie, dans le Hoggar est probablement dérivée des populations situées dans la limite sud de la zone étudiée par le biais de corridors biologiques établis à la fin du Miocène entre les écosystèmes méditerranéens et sahariens centraux. Les montagnes du Sahara Central ont constitué ainsi des refuges biogéographiques cruciaux pour ce taxon.

Outre, des études phylogénétiques et phylogéographiques supplémentaires, avec un échantillonnage plus large d'*Artemisia herba-alba* comprenant toute la région de l'Afrique du nord occidentale et la Péninsule Ibérique, ont été effectués (les résultats définitifs ne sont pas encore publiés). Ces études devraient contribuer à la meilleure connaissance sur la diversité

génétique, l'origine et l'histoire phylogénétique et phylogéographique de ce taxon dans la Méditerranée occidentale.

Toutes ces observations indiquent qu'en Algérie, des conditions bioclimatiques très variées joueraient un rôle majeur sur la diversité et la structuration des populations d'*Artemisia herba-alba*. Elles révèlent aussi l'ampleur de la polyploïdie comme manifestation de la diversité génétique. Les populations diploïdes, localisées principalement dans le Centre et l'Est de l'Algérie, se sont montrées remarquablement diversifiées. Elles représentent de ce fait une valeur comme réservoir de gènes d'intérêt utilisables qui peuvent être privilégiés dans l'optique de la conservation.

Une prospection des populations mixtes (populations avec de mélange de cytotypes) ; leurs fréquences et leurs limites de répartition s'avèrent nécessaires pour comprendre l'origine et l'évolution de la polyploïdie dans ce taxon.

Encore, il serait indispensable de délimiter les aires potentielles de répartition de cette espèce en Algérie, de renforcer la stratégie de mises en défens, et de réfléchir à la mise en place d'une collection (Pastoritum) des individus d'*Artemisia herba-alba* de différentes régions pour conserver les ressources génétiques de ce taxon.

A une échelle plus large, des travaux futurs visant à délimiter les schémas de distribution des différents cytotypes d'*Artemisia herba-alba*, dans un contexte écoclimatique et spatial, dans toute son aire de distribution dans le monde sont nécessaires pour appréhender la dynamique évolutive de ce taxon et aideront à sa conservation.

Les marqueurs chloroplastiques, malgré leur faible diversité, nous ont permis de détecter la structuration phylogéographique à *Artemisia herba-alba*. En revanche, les marqueurs nucléaires que nous avons testés n'ont pas donné des résultats, cela ne nous empêche pas à l'avenir de tester d'autres régions nucléaires qui permettraient d'avoir une idée plus fine sur la diversité génétique et la structuration populationnelle de ce taxon.

En fin, pour résoudre le problème de systématique (y compris synonymie) marquant le complexe *Artemisia herba-alba*, il serait nécessaire qu'une étude phylogénétique approfondie basée sur des marqueurs moléculaires soit entreprise dans toute son aire de répartition pour une mise en place d'une nouvelle systématique moléculaire de ce taxon.

#### Références bibliographiques

- **Abdeddaim, B. K. K. 2010.** Etude de deux cytotypes de *Lygeum spartum* L. par approches pluridisciplinaires : Palynologie, Cytogénétique classique et moléculaire. *Thèse d'Etat. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf.* 99p
- **Abdelkefi, A., Ben Fadhel, N., Ben Salah, A., Boussaid, M. & Zaouali, Y. 2004.** Plantes pastorales en milieux arides de L'Ae du Nord. In : Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : *CIHEAM* : 55-59 (*Cahiers Options Méditerranéennes*; n . 62)
- Abdelmoula, N. B., Portnoï, M-F., Vialard, F., Amouri, A., Akker, J. V. & Taillemite, J-L. 2000. Les techniques de cytogénétique moléculaire: principes et progrès. *Médecine / Sciences*, 16: 1405-11
- **Abdel-Samad, N. 2016.** Caractérisation génétique du genre Iris évoluant dans la Méditerranée orientale. *Thèse de doctorat. Université Paris-Sud.* NNT : 2016SACLS250
- **Acherkouk, M., Maatougui, A. & El-Houmaizi, M.A. 2012.** Etude de l'impact d'une mise en repos pastoral dans les pâturages steppiques de l'Oriental du Maroc sur la restauration de la végétation. *Sécheresse*, 23 : 102–12
- **Adams, K.L. & Palmer, J.D. 2003.** Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29:380-395.
- Aguilar, R., Quesada, M., Ashworth, L., Herreriasdiego, Y. & Lobo, J. 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, 17: 5177–5188
- **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, année 1988*
- **Aidoud, A., Le Floc'h, E. & Le Houérou, H.N. 2006.** Les steppes arides du nord de l'Afrique. Science et changements planétaires. *Sécheresse. Volume 17, Numéro 1, 19-30*. Alger
- **Akrout, A. 2004.** Etude des huiles essentielles de quelques plantes pastorales de la région de Matmata (Tunisie). *CIHEAM IAMZ*, 2004. 489 P. (*Cahiers Options méditerranéennes*; v. 62)
- **Ali, H.B.M., Lysak, M.A. & Schubert, I. .2005.** Chromosomal localization of rDNA in the Brassicaceae. *Genome*, 48:341–346
- **Álvarez, I. & Wendel, J. F. 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution, 29 (3): 417-434
- **Antonovics, J. 1976.** The nature of limits to natural selection. *Annals of the Missouri Botanical Garde*, 63: 224-47
- **Arano, H. & Saito, H. 1980.** Cytological studies in family umbelliferae V. Karyotype of seven species in Subtribes Seselinae. *La Kromosomo II*, 17:471-480

- **Audigeos, D. 2010.** Relations entre diversité génétique et environnement. Quels sont les processus évolutifs mis en jeu ? Cas d'une espèce d'arbre tropical : *Eperua falcata* Aublet. *Thèse de Doctorat. Université des Antilles et de la Guyane*
- Austerlitz, F., Mariette, S., Machon, N., Gouyon, P-H. & Godelle, B. 2000. Effects of colonization processes on genetic diversity: differences between annual plants and tree species. *Genetics*, 154: 1309-1321
- **Avise, J. C. 2004.** Molecular markers, natural history and evolution, 2nd ed. Sinaucer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA
- **Avise, J.C. 2000.** Phylogeography. The history and formation of species. *Cambridge, Mass., Harvard University Press*
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.Z. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18: 489-522
- **Ayad,** N. 2008. Etude éco-phytochimique et apport nutritionnel de l'armoise blanche (Artemisia herba-alba Asso) du sud Oranais, dans l'aliment du cheptel Thèse de doctorat. Univ. Djillali Liabes. Sidi-Bel-Abbès. 98 P
- **Ayad, N., Hellal B. & Maatoug, M. 2007.** Dynamique des peuplements d'Artemisia herbaalba Asso dans la steppe du sud oranais (Algérie occidentale). Science et changements planétaires / Sécheresse. Volume 18. Numéro 3, 193-8
- Azzi, R., Djaziri, R., Lahfa, F., Sekkal, F.Z., Benmehdi, H. & Belkacem, N. 2012. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used in the traditional treatment of diabetes mellitus in the North Western and South Western Algeria. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6: 2041–2050
- **Baba-aissa, F. 1991.** Les plantes médicinales en Algérie. *Coédition Bouchène et Ad. Diwan.* Alger.181 P
- **Baeza, C.M., Schrader, O. & Budahn, H. 2007.** Characterization of geographically isolated accessions in five *Alstroemeria* L. species (Chile) using FISH of tandemly repeated DNA sequences and RAPD analysis. *Plant Systematic Evolution*, 269:1–14
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Zhiri, A., Baudoux, D. & Idaomar, M. 2006. Antigenotoxic effects of three essential oils in diploid yeast (Saccharomyces cerevisiae) after treatments with UVC radiation, 8-MOP plus UVA and MMS. *Mutation research*, 606 (1-2): 27-38
- Barr, C.M., Keller, S.R., Ingvarsson, P.K., Sloan, D.B. & Taylor, D.R. 2007. Variation in mutation rate and polymorphism among mitochondrial genes of *Silene vulgaris*. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1783–1791
- **Battandier, J. A. & Trabut, L. C.1888.** Flore de l'Algérie (Dicotylédones): Edit. A. Jourdan, Alger et F. Savy, Paris
- Beaulieu, J. M., Moles, A. T., Leitch, I. J., Bennett, M. D., Dickie, J. B. & Knight, C. A. 2007. Correlated evolution of genome size and seed mass. *New Phytologist*, 173(2): 422-437
- **Beaulieu, J. M., Smith, S. A. & Leitch, I. J. 2010.** On the tempo of genome size evolution in angiosperms. *Journal of Botany*, doi:10.1155/2010/989152

- Behtari, B., Gholami, F., Khalid, K. A, Dianati T., G. & Bahari, R. 2012. Effect of Growth Stages and Altitude on *Artemisia herba-alba* Asso Essential Oil Growing in Iran. *Journal of essential oil Bearing plants. Volume 15 issue 2*
- Belhattab, R., Amor, L., Barroso, J. G., Pedro, L. G. & Figueiredo, A. C. 2014. Essential oil from *Artemisia herba-alba* Asso grown wild in Algeria: Variability assessment and comparison with an updated literature survey. *Arabian Journal of Chemistry*, 7: 243–251
- **Benaradj, A., Mederbal, K. & Benabdelli, K. 2010.** Remontée biologique du parcours steppique à *Lygeum spartum* après une durée de Mise en défens dans la steppe sudoranaise de Naâma (cas de la station de Touadjeur). *Mediterranea*, serie de estudios biologicos, Epoca II n° 21
- **Bennett, M. D. 1976.** DNA amount, latitude, and crop plant distribution. *Environmental and Experimental Botany*, 16: 93-108
- **Bennett, M.D. 1987.** Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist*, 106: 177-200
- **Bennett, S., & Bennett, M. 1992.** Variation in nuclear DNA amount between wild and cultivated populations of *Milium effusum* (2n = 28). *Genome*, 35: 1050-1053.
- **Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 2012.** Plant DNA *C*-values database (release 6.0, Dec. 2012). http://www.kew.org/cvalues/)
- **Bennett, M. D. & Smith, J. B. 1976.** Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 274: 227–274
- **Bennett, M.D. et Leitch, I.J. 2005a.** Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany*, 95: 45–90
- **Bennett, M.D. et Leitch, I.J. 2005b.** Plant genome size research: a field in focus. *Annals of Botany*, 95: 1–6
- **Bennett, M.D., Smith, J.B. & Lewis Smith, R.I. 1982.** DNA amounts of angiosperms from the Antartic and South Georgia. *Environmental and Experimental Botany*, 22: 307-318
- **Bennett, S.T. & Thomas, S.M. 1991.** Karyological analysis and genome size in *Milium* (Gramineae) with special reference to polyploidy and chromosomal evolution. *Genome*, 34: 868–878
- **Bennetzen, J.L. & Kellogg, E.A. 1997.** Do plants have a oneway ticket to genomic obesity? *Plant Cell*, 9(9): 1509–1514
- **Bennetzen, J.L. 2000.** Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology*, 42: 251-269
- **Besser, W. S. J. G. 1829.** Synopsis Absinthiorum. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*, 1: 219–265
- **Besser, W. S. J. G. 1832.** Tentamen de Abrotanis seu de sectione IIda Artemisiarum Linnaei. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*, 3: 1–92
- **Besser, W. S. J. G. 1834.** De Seriphidiis seu de sectione IIIa Artemisiarum Linnaei. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*, 7: 1–46

- **Besser, W. S. J. G. 1835.** Dracunculi seu de sectione IVta et ultima Artemisiarum Linnaei. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*, 8: 1–95
- **Betina, S. 2004.** Etude du genome de l'armoise blanche Algérienne *Artemisia herba-alba* Asso. Mémoire de magister en biotechnologie végétale. *Université Mentouri, Constantine. Faculté des Sciences. Département des Sciences de la nature*
- **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
- **Bever, J.D. & Felber, F. 1992.** The theoretical population genetics of autopolyploidy. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 8:185–217
- Bezza, L., Mannarino, A., Fattarsi, K., Mikail, C., Abou, L., Hadji-Minaglou, F. & Kaloustian, J. 2010. Composition chimique de l'huile essentielle d'*Artemisia herbaalba* provenant de la région de Biskra (Algérie). *Phytothérapie*, 8: 277–281
- **Birky, C.W. J. 2001.** The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *The Annual Review of Genetics*, 35: 125–148
- Blanchet, P., Brown, S., Hirsch, A. M., Marie, D. & Watanabe, K. 1992. Détermination des niveaux de ploïdie dans le genre *Actinidia* Lindl. par cytométrie en flux. *Fruits*, 47 (3): 451 -460
- **Blondel, J., Aronson, J., Bodiou, J.Y. & Boeuf, G. 2010.** The Mediterranean region: biological diversity in space and time, 2nd edn. Oxford University Press, New York.
- **Bohm, B. A. & Stuessy, T. F. 2001.** Flavonoids of the Sunflower Family (*Asteraceae*). *Springer*, Wien, New York
- Boissier, E. 1875. Flora Orientalis, vol. 3, Genevae and Basileae.
- **Bolnick, D. I. William, E. & Stutz, W.E. 2017.** Frequency dependence limits divergent evolution by favouring rare immigrants over residents. *Nature*, 546: 285-288
- **Borchsenius, F. 2009.** Fastgap 1.2. Denmark: Department of Biological Sciences, University of Aarhus. Available via http:// 192.38.46.42/aubot/fb/FastGap\_home.htm.
- **Botineau, M. 2010**. Botanique, systématique et appliquée des plantes à fleurs. *Edition TEC & DOC. Lavoisier* Paris
- **Botschantzev, V. 1970.** Géobotanique des pâturages du secteur Ouest du département de Médéa de la république algérienne démocratique et populaire. I<sup>e</sup> partie (textes). *Edition « Naouka »*. Filiale de Leningrad. 1970. 124 P
- Bottini, M.C.J., Greizerstein, E.J., Aulicino, M.B. & Poggio, L. 2000. Relationship among genome size, environmental conditions and geographical distribution in natural populations of NW Patagonian species of *Berberis* L. (Berberidaceae). *Annals of Botany*, 86: 565–573.
- **Boudjelal, A., Henchiri, C., Sari, M., Sarri, D., Hendel, N., Benkhaled, A., Ruberto, G. 2013.** Herbalists and wild medicinal plants in M'Sila (North Algeria): An ethnopharmacology survey. *Journal of Ethnopharmacology*. 148(2013): 395–402
- **Bougoutaia, Y. 2009.** Contribution à la prospection et l'évaluation de la variabilité génétique de l'armoise blanche (*Artemisia herba-alba* Asso) dans une zone steppique. *Mémoire de Magister. Université de Djelfa*

- **Bougoutaia, Y., Nedjimi, B., Adda, A. & Kaid-Harche, M. 2014.** Etude caryologique et moléculaire de deux populations algériennes d'*Artemisia herba alba* Asso. (Asteraceae). *Revue Agriculture* 8: 21-25
- **Boussaid, M. 2013.** Diversité des populations naturelles de *Stipa tenacissima* L. en Algérie: Approches Phénotypique, Caryologique et Moléculaire. *Thèse d'Etat. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf*
- **Bremer, K. & Humphries, C.J. 1993.** Generic monograph of the *Asteraceae -Anthemideae*. *Bulletin of the Natural History Museum London, Botany Series,* 23: 71–177
- **Bremer, K. & Janson, R.K. 1992.** A new subfamily of the *Asteraceae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79: 414-415
- **Bretagnolle, F. & Thompson, J.D. 1996.** An experimental study of ecological differences in winter growth between sympatric diploid and autotetraploid *Dactylis glomerata*. *Journal of Ecology*, 84: 343–351
- **Brown, G. D. 2010.** The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). *Molecules*, 15: 7603–7698
- **Buggs, R.J.A. & Pannell, J.R. 2007.** Ecological differentiation and diploid superiority across a moving ploidy contact zone. *Evolution*, 61: 125–140
- Campbell, B.D. Caradus, J.R. & Hunt, C.L. 1999. Temperature responses and nuclear DNA amounts of seven white clover populations which differ in early spring growth rates. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42: 9–17
- Castelloe, J. & Templeton, A.R. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 102–113
- Castro-Jimenez, Y., Newton, R.J. Price, H.J. & Halliwell, R.S. 1989. Drought stress response of Microseris species differing in nuclear DNA content. *American Journal of Botany*, 76: 789–795
- Catalán, P., Kellogg, E. A. & Olmstead, R. G. 1997. Phylogeny of Poaceae subfamily *Pooideae* based on chloroplast ndhf gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 8(2): 150-166
- Cerbah, M., Coulaud, J., Brown, S.C., & Siljak-Yakovlev, S. 1999. Evolutionary DNA variation in the genus *Hypochaeris*. *Heredity*, 82: 261–266
- **Chiang, T.Y. & Schaal, B.A. 1999.** Phylogeography of North American populations of the moss species *Hylocomium splendens* based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 2 of nuclear ribosomal DNA. *Molecular Ecology*, 8: 1037–1042
- Clausen, J., Keck, D. D. & Hiesey, W.M. 1945. Experimental studies on the nature of species. II. Plant evolution through amphiploidy and autoploidy, with examples from the Madiinae, vol 564. *Carnegie Inst, Washington, Carnegie Inst Wash*.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9:1657–60. doi:10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x
- **Comai, L. 2000.** Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plants. *Plant Molecular Biology*, 43: 387-399
- Costich, D.E., Meagher, T.R. & Yurkow, E.J. 1991. A rapid means of sex identification in Silene latifolia by use of flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 359–370

- Creber, H. M. C., Davies, M.S., Francis, D. & Walker, H.D. 1994. Variation in DNA C-value in natural populations of *Dactylis glomerata*. *New Phytologist*, 128: 555-561
- **Crété, P. 1965**. Précis de Botanique, Tome II, systématique des angiospermes. 2<sup>eme</sup> édition. *Masson et Cie, Paris*
- Cui, L., Wall, P. K., Leebens-Mack, J. H., Lindsay, B. G., Soltis, D. E., Doyle, J. J., Soltis, P. S., Carlson, J. E., Arumuganathan, K., Barakat, A., Albert, V. A., Ma, H. & dePamphilis, C. W. 2006. Widespread genome duplications throughout the history of flowering plants. *Genome Research*, 16: 738–749
- **Cullins, K.W. 1992.** Design and testing of a plant-specific primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology,* 1: 233–240
- **Darlington, C. D. 1937.** Recent advances in cytology. *J. & A. Churchill*, London.
- **Dart, S., Kron, P. & Mable, B. K. 2004.** Characterizing polyploidy in *Arabidopsis lyrata* using chromosome counts and flow cytometry. *Canadian journal of botany*, 82: 185-197
- De Candolle A. P. 1837. Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis, pars VI
- **De Menocal, P., Ortiz, J., Guilderson, T., Adkins, J., Sarnthein, & al. 2000.** Abrupt onset and termination of the African Humid Period: rapid climate responses to gradual insolation forcing. *Quaternary Science Reviews*, 19: 347–361
- **Derwich, E., Benziane, Z., Boukir, A. 2009.** Chemical compositions and insecticidal activity of essential oils of three *Artemisia* sp: *Artemisia herba-alba*, *Artemisia absinthium* and *Artemisia pontica* (Morocco). *Electronic Journal of Environmental*, *Agricultural & Food Chemistry*, Vol. 8 Issue 12: 1202-1211
- **Deutsch, M. & Long, M., 1999.** Intron-exon structure of eukaryotic model organisms. *Nucleic Acids Research*, 27: 3219-3228
- **Di Bartolomeo, F., Startek, J.B. & Van den Ende, W. 2013.** Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? *Phytotherapy Research*, 27: 1457–1473. doi: 10.1002/ptr.4901
- **Diatta, M., Albergel, J., Perez, P., Faye, E., Séne, M. & Grouzis M. 2000.** Effcacité de la mise en défens testée dans l'aménagement d'un petit bassin versant de Thysse Kaymor (Sénégal). Bulletin du réseau érosion IRD et *GTZ*, 20 : 232-244
- Dif, M. M., Benali Toumi, F., Boukaaza, H., Mokaddem, F., Benyahia, M. & Bouazza, S. 2016. Phenolic Content and Antioxidant Activity of *Artemisa herba-alba*, A Medicinal Plant from Algerian Arid Zone. *Phytothérapie*, 10298-016-1077-9
- **Djebaili, S. 1984.** Steppe Algérienne. Phytosociologie et écologie. *Ed. Office des Publications Universitaires*, 1. Place centrale de Ben Aknoun (Alger). 159 P
- **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
- **Dob, T. & Benabdelkader, T. 2006.** Chemical Composition of the Essential Oil of *Artemisia herba-alba* Asso Grown in Algeria. *Journal of essential oil Research, Volume 18, 2006 issue 6*
- **Doležel, J. & Bartoš, J. 2005.** Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, 95: 99–110
- **Doležel, J. 1991.** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis*, 2: 143-154. http://dx.doi.org/10.1002/pca.2800020402

- **Doležel, J., Bartoš, J., Voglmayr, H. & Greilhuber, J. 2003.** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry*, 51: 127-128. http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.10013
- **Doležel, J., Binarová, P. & Lucretti S. 1989**. Analysis of nuclear DNA content in plant cells by flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31:113-120. http://dx.doi.org/10.1007/BF02907241
- **Doolittle, W.F. & Sapienza, C. 1980.** Selfish genes, the phenotypic paradigm and genome evolution. *Nature*, 284: 601-603
- **Doyle, J. J. 1991.** DNA protocols for plants. G. Hewitt, A. W. B. Johnson, and J. P. W. Young (eds.), Molecular Techniques in Taxonomy. NATO ASI Series H, Cell Biology, 57: 283-293
- **Drouin, G. & de Sa M. M. 1995.** The concerted evolution of 5S ribosomal genes linked to the repeat units of other multigene families. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 481–493
- **Duchoslav, M., Šafářová, L. & Jandová, M. 2013.** Role of adaptive and non-adaptive mechanisms forming complex paterns of genome size variation in six cytotypes of polyploid *Allium oleraceum* (Amaryllidaceae) on a continental scale. *Annals of Botany*, 111: 419-431. http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcs297
- **Duminil, J. 2006.** Etudes Comparatives de la Structure Génétique des Plantes. *Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré*, Nancy I
- **Duminil, J. 2014.** Mitochondrial Genome and Plant Taxonomy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1115 (9): 121-139. Doi 10.1007/978-1-62703-767-9-6
- **Elder, J.F. & Turner, B.J. 1995.** Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology*, 70: 297–320
- **Ellstrand, N. & Elam, D. 1993.** Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 217-242
- **Emberger, L., 1955.** Une classification biogéographique des climats. *Natur. Monsp.*, sér. Bot., Vol.7: 3-42
- **Ennos, R.A. 1994.** Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, 72: 250-259
- **Fady, B. & Conord, C. 2010.** Macroecological patterns of species and genetic diversity in vascular plants of the Mediterranean Basin. *Diversity and Distributions*, 16: 53–64
- **Felber, F. 1991.** Establishment of a tetraploid cytotype in a diploid population. *Journal of Evolutionary Biology*, 4:195–207
- **Feliner, G. N. & Rosselló J. A. 2007.** Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44:911–919
- **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/10.1080/12538078.1997.1051 5761
- Ferchichi, A., Chaieb, C. & Ferjani, E. 2004. Caractérisation de la variabilité du comportement phytologique de certaines populations d'Artemisia herba-alba du sud

- Tunisien. CIHEAM-IAMZ, 2004. 489 P. (Cahiers Options Méditerranéennes; v. 62)
- Fernández, C. J. Munoz, C. F. & Ortiz, V.A.1979. Numeros cromosomicos para la flora espanola. *Lagascalia*, 9 (1): 115-130
- **Feuerstein, I., Mueller, D., Hobert, K., Danin,** A. & Segal, R. 1986. Constitution of essential oils from *Artemisia herba-alba* populations of Palestine and Sinai. *Phytochemistry*, 25: 2343-2347
- Floret, C. & Potanier, R. 1982. Aridité en Tunisie présaharienne. Climat, sol, végétation et aménagement. Travaux et documents de l'ORSTOM. Edition de l'office de la recherche scientifique et technique outre-mer. Paris. 543 P
- **Fowler, N.L. & Levin, D.A. 1984.** Ecological constraints on the establishment of a novel polyploid in competition with its diploid progenitor. *American Naturalist*, 124:703–711
- Francis, D., Davies, M. S. & Barlow, P. W. 2008. A strong nucleotypic effect on the cell cycle regardless of ploidy level. *Annals of Botany*, 101(6): 747-757
- Funk, V. A., Bayer, R. J., Keeley, S., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schillig, E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., Garcia-Jacas, N., Susanna, A. & Jansen, R.K. 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biologiske Skrifter*, 55:343-374
- Galbraith, D.W., Harkins, K.R., Maddox, J.M., Ayres, N.M., Sharma, D.P. & Firoozabady, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049–1051
- **Galian, J.A., Rosato, M. & Rossello, J.A. 2012.** Early evolutionary colocalization of the nuclear ribosomal 5S and 45S gene families in seed plants: evidence from the living fossil gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Heredity*, 108: 640–646
- **Gall, J.G. & Pardue, M.L. 1969.** Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytogenetical preparations. *Proceedings National Academy of Sciences. USA*, 63: 378-83
- **Garbari, F., Bedini, G. & Peruzzi, L. 2012.** Chromosome numbers of the Italian flora. From the Caryologia foundation to present. *Caryologia*, 65: 62-71 http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2012.678090
- Garcia, S. 2007. Una approximació à l'estudi de l'évolució i la sistemàtica d'Artemisia i gèneres afins en els àmbits de la citogenètica i filogènia moleculars. Thèse d'Etat. Université de Barcelone
- Garcia, S. & Kovarık, A. 2013. Dancing together and separate again: gymnosperms exhibit frequent changes of fundamental 5S and 35S rRNA gene rDNA organisation. *Heredity*, 111: 23–33
- Garcia, S., Canela, M. A., Garnatje, T., McArthur, E. D., Pellicer, J., Sanderson, S. C. & Vallès, J. 2008. Evolutionary and ecological implications of genome size in the North American endemic sagebrushes and allies (*Artemisia*, Asteraceae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94: 631–649
- Garcia, S., Cortés, P., Fernàndez, X., Garnatje, T. & Kovarik, A. 2016. Organisation, expression and evolution of rRNA genes in plant genomes. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences VI*, 49-75 ISBN: 978-81-308-0566-5

- Garcia, S., Garnatje, T. & Kovarık, A. 2012a. Plant rDNA database: ribosomal DNA *loci* information goes online. *Chromosoma*, 121: 389–394
- Garcia, S., Garnatje, T., Hidalgo, O., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J. 2007. Extensive ribosomal DNA (18S-5.8S-26S and 5S) colocalization in the North American endemic sagebrushes (subgenus *Tridentatae*, *Artemisia*, Asteraceae) revealed by FISH. *Plant Systematics and Evolution*, 267: 79–92
- Garcia, S., Garnatje, T., McArthur, E. D., Pellicer, J., Sanderson, S. C. & Vallès, J. 2011b. Taxonomic and nomenclatural rearrangements in *Artemisia* subgen. *Tridentatae* including a redefinition of *Sphaeromeria* (*Asteraceae*, *Anthemideae*). *Western North American Naturalist*, 71: 158–163
- Garcia, S., Garnatje, T., Pellicer, J., McArthur, E.D., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J. 2009a. Ribosomal DNA, heterochromatin, and correlation with genome size in diploid and polyploid North American endemic sagebrushes (*Artemisia*, *Asteraceae*). *Genome*, 52: 1012–1024
- Garcia, S., Garnatje, T., Twibell, J. D. & Vallès, J. 2006. Genome size variation in the *Artemisia arborescens* complex (Asteraceae, Anthemideae) and cultivars. *Genome*, 49: 244–253
- Garcia, S., Inceer, H., Garnatje T. & Vallès, J. 2005. Genome size variation in some representatives of the genus *Tripleurospermum*. *Biologia Plantrum*, (3): 381-387
- Garcia, S., Khaitová, L. C. & Kovařík, A. 2012b. Expression of 5 S rRNA genes linked to 35 S rDNA in plants, their epigenetic modification and regulatory element divergence. *BMC Plant Biology*, 12:95
- Garcia, S., Kovarık, A., Leitch, A. R. & Garnatje, T. 2017. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. *The Plant Journal*, 89: 1020–1030
- Garcia, S., Leitch, I., Anadon-Rosell, A., Canela, M.Á., Gálvez, F., Garnatje, T., Gras, A., Hidalgo, O., Johnston, E., Mas de Xaxars, G., Pellicer, J., Siljak-Yakovlev, S., Vallès, J., Vitales, D. & Bennett, M.D. 2014. Recent updates and developments to plant genome size databases. *Nucleic Acids Research*, 42: D1159-D1166.
- Garcia, S., Lim, K. Y., Chester, M., Garnatje, T., Pellicer, J., Vallès, J., Leitch, A. R. & Kovarik, K. 2009b. Linkage of 35S and 5S rRNA genes in *Artemisia* (family Asteraceae): First evidence from angiosperms. *Chromosoma*, 118: 85–97.
- Garcia, S., McArthur, E. D., Pellicer, J., Sanderson, S. C., Vallès, J. & Garnatje, T. 2011a. A molecular phylogenetic approach to western North America endemic *Artemisia* and allies (*Asteraceae*): Untangling the sagebrushes. *American Journal of Botany*, 98: 638-653
- Garcia, S., Panero, J.L., Siroky, J. & Kovarık, A. 2010. Repeated reunions and splits feature the highly dynamic evolution of 5S and 35S ribosomal RNA genes rDNA in the Asteraceae family. *BMC Plant Biology*, 10, 176
- Garcia-Fernandez, A., Vitales, D., Pellicer, J., Garnatje, T. & Vallès, J. 2017. Phylogeographic insights into *Artemisia crithmifolia* (Asteraceae) reveal several areas of the Iberian Atlantic coast as refugia for genetic diversity. *Plant Systematics and Evolution*, 303:509–519. doi 10.1007/s00606-017-1387-x

- **Geber, G. & Schweizer, D. 1988**. Cytochimical heterochromatin differenciation in *Sinapis alba* (Cruciferae) using a simple air drying technique for producing chromosome spreads. *Plant Systematics and Evolution*, 158: 97-106
- Godelle, B., Cartier, D., Marie, D., Brown, S.C., & Siljak-Yakovlev, S. 1993. Heterochromatin study demonstrating the non-linearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry*, 14: 618–626
- **Golding, G. B. 1987.** The detection of deleterious selection using ancestors inferred from a phylogenetic history. *Genetics Research*, 49: 71–82
- **Goudjil-Benhizia, H. 2014.** Caractérisation cytogénétique classique et moléculaire de trois espèces endémiques du genre *Hedysarum* L. *Thèse d'Etat. Université de Constantine I.*81p
- Gouja, H., Garnatje, T., Hidalgo, O., Neffati, M., Raies, A. & Garcia, S. 2015. Physical mapping of ribosomal DNA and genome size in diploid and polyploid North African Calligonum species (Polygonaceae). *Plant Systematics and Evolution* 301: 1569-1579. http://dx.doi.org/10.1007/s00606-014-1183-9
- Greger, H. 1977. Anthemideae Chemical review. In The Biology and Chemistry of the Compositae, Vol. II, (V. H. Heywood, J. B. Harborne and B. L. Turner, eds.), pp. 899 941. Academic Press, London/New York/San Francisco
- **Greilhuber, J. & Leitch, I. J. 2013.** Genome Size and the Phenotype. Plant Genome Diversity Volume 2. Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. *Springer-Verlag Wien*, 978-3-7091-1159-8
- **Greilhuber, J. 1998.** Intraspecific variation in genome size: a critical reassessment. *Annals of Botany* 82 (Suppl. A): 27–35
- **Greilhuber, J. 2005.** Intraspecific variation in genome size in angiosperms: identifying its existence. *Annals of Botany* 95: 91–98
- Greilhuber, J., Borsch, T., Muller, K., Worberg, A., Porembski, S. & Barthlott, W. 2006. Smallest Angiosperm Genomes Found in *Lentibulariaceae*, with Chromosomes of Bacterial Size. *Plant Biology*, 8: 770–777
- **Greilhuber, J., Dolezel, J., Lysak, M. A. & Bennett, M. D. 2005.** The origin, evolution and proposed stabilization of the terms "genome size" and "C-value" to describe nuclear DNA contents. *Annals of Botany*, 95: 255–260
- Greuter, W. 2006. Compositae (pro parte majore). In: *Greuter, W. & Raab-Straube, E. von (ed.): Compositae. EuroMed Plantbase* the information resource for Euro-Mediterranean plant diversity. http://www.emplantbase.org/home.html
- Griffiths, A., Wessler, S., Lewontin, R. et Carrol, S. et al., 2010. Introduction à l'analyse génétique. Edition De Boeck université. 5eme édition. Bruxelles.
- **Grime, J.P. & Mowforth, M.A. 1982.** Variation in genome size—an ecological interpretation. *Nature*, 299: 151–153
- **Grime, J.P., Shacklock, M.L. & Band, S.R. 1985.** Nuclear DNA contents, shoot phenology and species co-existence in a limestone grassland community. *The New Phytologist*, 100: 435–445

- **Grivet, F. 2002.** Phylogéographie et évolution moléculaire comparée d'arbres forestiers à l'aide des marqueurs chloroplastiques. Thèse de doctorat. *Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré*, Nancy I
- **Grummt, I. 1999.** Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology,* 62:109–154
- **Guerra, M. 2008.** Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: Concepts and implications. *Cytogenetics and Genome Research*, 120: 339-350. http://dx.doi.org/10.1159/000121083
- Guignard, J.L. 1998. Botanique, 11<sup>e</sup> édition. Masson, Paris
- **Guindon, S. & Gascuel, O. 2003.** A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5): 696-704
- **Gustafson, J. P. & Bennett, M. D. 1982.** The effect of telomeric heterochromatin from *Secale cereale* on *Triticale* (x *Triticosecale*). I. The influence of the loss of several blocks of telomeric heterochromatin on early endosperm development and kernel characteristics at maturity. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 24: 83–92
- Hall, S.E., Dvorak, W.S., Johnston, J.S., Price, H.J., & Williams, C.G. 2000. Flow cytometric analysis of DNA content for tropical and temperate new world pines. *Annals of Botany*, 86: 1081–1086.
- **Hall, TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- Hamrick, J. L. & Godt, M. J. 1990. Allozyme diversity in plant species. *In* A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], Plant population genetics, breeding, and genetic resources, 43–63. Sinauer, Sunderland, MA.
- **Hamrick, J. L. & Holden, L. R. 1979.** Influence of microhabitat heterogeneity on gene frequency distribution and gametic phase disequilibrium in *Avena barbata*. *Evolution*, 33:521-33
- **Hamrick, J.L. & Godt, M.J. 1996.** Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences,* 351:1291-1298
- **Hamrick, J.L., Murawski, D.A. & Nason, J. 1993.** The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. *Vegetation*, 107/108: 281-297
- **Haouari, M. & Ferchichi, A. 2004.** Utilisation des marqueurs ISSR pour l'étude du polymorphisme génétique d'*Artemisia herba-alba*. In : *Ferchichi A. (comp.), Ferchichi A. (collab.). Réhabilitation des pâturages et des parcours en milieux méditerranéens. Zaragoza : CIHEAM*, 115-119 (Cahiers Options Méditerranéennes; n. 62)
- **Haouari, M. & Ferchichi, A. 2008.** Study of genetic polymorphism of *Artemisia herba-alba* from Tunisia using ISSR markers. *African Journal of Biotechnology*, 7 (1): 044-050
- **Haouari, M. & Ferchichi, A. 2009.** Essential oil composition of *Artemisia herba-alba* from southern Tunisia. *Molecules*. 14: 1585-1594
- Hatimi S., Boudouma M., Bichichi M., Chaib N. & Idrissi N. G. 2001. Evaluation in vitro de l'activité antileishmanienne d'*Artemisia herba-alba* Asso. *Thérapeutique*, *Bulletin de la Société de pathologie exotique*, 94(1), 29-31
- HCDS. 2010. Les potentialités agro-pastorales de la steppe Algérienne. Analyse et

- interprétation des résultats de l'étude. Rapport d'étude. Haut commissariat au développement de la steppe (HCDS). Djelfa
- **Hewitt, G.M. 1999.** Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87-112
- **Heywood, V.H. & Humphries, C.J. 1977.** *Anthemideae* systematic review. in: *Heywood, V.H., Harborne, J.B. & Turner, B.L.* (*eds.*). The Biology and Chemistry of the Compositae, *vol. 2. Academic Press,* London. Pp. 851–898
- **Hobbs, CR. & Baldwin, BG. 2013.** Asian origin and upslope migration of Hawaiian *Artemisia* (Compositae–Anthemideae). *Journal of Biogeography*, 40: 442–454.
- **Hoshi, Y., Matoba, H. & Kondo, K. 2006.** Physical mapping of ribosomal RNA genes in the genus *Artemisia* L. (Asteraceae). *Caryologia*, 59: 312–318
- **Houmani, M., Houmani, Z. & Skoula, M. 2004.** Intérêt de *Artemisia herba-alba* Asso dans l'alimentation du bétail des steppes algériennes. *Acta Botanica Gallica*, 151: 165-172. http://dx.doi.org/10.1080/12538078.20 04.10516031
- **Huang, J., Cang, H., Liu, Q. & Shao, J. 2013.** Environment friendly inhibitor for mild steel by *Artemisia halodendron*. *International Journal of Electrochemical Science*, 8: 8592–8602
- Huang, S., Chiang, Y.C., Schaal, B.A., Chou, C.H. & Chiang, T.Y. 2001. Organelle DNA phylogeography of *Cycas taitungensis*, a relict species in Taiwan. *Molecular Ecology*, 10: 2669–2681
- **Hudaib M. & Aburjai T.2006.** Composition of the essential oil from *Artemisia herba-alba* growing in Jordan, *Journal of Essential Oil Research*, 18: 301-304.
- **Hudson, R.R. 1990.** Gene genealogies and the coalescence process. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* **7**: 1-44
- **Hudson, R.R., Slatkin, M. & Maddison, W.P. 1992.** Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583-589
- **Husband, B. C., Baldwin, S. J. & Suda, J. 2013.** The Incidence of Polyploidy in Natural Plant Populations: Major Patterns and Evolutionary Processes. Plant Genome Diversity. Volume 2. Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. *Springer Wien Heidelberg.* New York Dordrecht London. 978-3-7091-1159-8. doi 10.1007/978-3-7091-1160-4
- **Ibn Tattou, M. & Fennane, M. 2008.** Flore vasculaire du Maroc, inventaire et chorologie (Vol. 2). *Trav. Inst. Sci., Rabat, sér. Bot., 39,* 398 p
- **Ickert-Bond, S. M. & Wen, J. 2006.** Phylogeny and biogeography of Altingiaceae: evidence from combined analysis of five non-coding chloroplast regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39: 512–528
- Imai, H.T., Maruyama, T., Gojobori, T., Inoue. Y. & Crozier, R.H. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. 1. The minimum interaction hypothesis. *The American Naturalist*, 128:900–920
- Jahier, J., Chèvre, A.M., Eber F., Delourme, R. & Tanguy, A. M. 1992. Techniques de cytogénétique végétale. *INRA éd. Paris. 184p*.
- Janaćković, P., Novaković, J., Soković, M., Vujisić, L., Giweli, A. A., tevanović, Z. D. & Marin, P. D. 2015. Composition and antimicrobial activity of essential oils of

- Artemisia judaica, A. herba-alba and A. arborescens from Libya. Archives of Biological Sciences. Belgrade, 67(2): 455-466
- **Joaquim, E., Figueiredo-Ribeiro, R.DC., Hayashi, A. & Carvalho, M. 2014.** Inulin contents and tissue distribution in underground storage organs of *Asteraceae* species from the Brazilian rocky fields. *Botany*, 92(11):827-836. doi: 10.1139/cjb-2014-0087
- **Jones, K. 1998.** Robertsonian fusion and centric fission in karyotype evolution of higher plants. *Botanical review*, 64:273–289
- **Jouad, H., Haloui, M., Rhiouani, H., El Hilaly, J. & Eddouks, M. 2010.** Ethnobotanical survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes, cardiac and renal diseases in the North centre region of Morocco (Fez–Boulemane). *Journal of Ethnopharmacology, Volume 77, Issues* 2-3: 175-182
- **Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E. & Stevens, P., 2002.** Botanique, systématique. Une perspective phylogénétique. *1*<sup>ere</sup> édition. De Boeck Université s.a. Paris
- **Julve, Ph., 2015** ff.- Baseflor. Index botanique, écologique et chorologique de la flore de France. Version : 30 octobre 2015. http://perso.wanadoo.fr/philippe.julve/catminat. htm;http://www.tela-botanica.org/site:accueil
- Kadri, A., Ben Chobba, I., Zarai, Z., Békir, A., Gharsallah, N., Damak, M. & Gdoura, R. 2011. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from aerial parts of *Artemisia herba-alba* grown in Tunisian semi-arid region. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(15): 2923-2929
- **Kaiser, H.F. 1960.** The application of electronic computers to factor analysis. *Educational and Psychological Measurement*, 20: 141-151.
- **Kawara, S., Takata, M. & Takehara, K. 1999.** High frequency of DNA aneuploidy detected by DNA flow cytometry in Bowen's disease. *Journal of Dermatological Science*, 21: 23–26
- **Kawatani, T. & Ohno, T. 1964.** Chromosome number in *Artemisia. Bulletin of the National Institute of Hygienic Sciences*, 82: 183-193
- **Khalfallah, N. 1990.** Les relations génétiques entre les forms sauvages du pool primaire du mil (*Pennisetum* dipploïde), analyse cytogénétique et biométriques cojointe de l'organisation de la variabilité. *Thèse d'état. Université Paris XI*, Orsay
- **Kimatu, J.N., Muluvi, G. M. & Liu, B. 2012.** Genetic Diversity, Habitat Fragmentation and Epigenetic Variations, *The Molecular Basis of Plant Genetic Diversity, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN:* 978-953-51-0157-4, In Tech, Available from: http://www.intechopen.com/books/the-molecular -basis-of-plantgenetic-diversity/genetic-diversity-habitat-fragmentation-and-epigenetic-variations
- King, R.C., Stansfield, W.D. & Mulligan, P.K. 2006. A dictionary of genetics, 7th ed. Oxford. p44
- Knight, C., Molinari, N. A. & Petrov, D. A. 2005. The Large Genome Constraint Hypothesis: Evolution, Ecology and Phenotype. *Annals of Botany*, 95: 177–190, 2005. doi:10.1093/aob/mci011, available online at www.aob.oupjournals.org
- Knight, C.A., & Ackerly, D.D. 2002. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis. *Ecology Letters*, 5: 66–76

- **Koffi, K. G. 2010.** Etude de la variabilité génétique et de la phylogéographie de *Santiria trimera* (Burseraceae) implications pour une conservation durable des forêts humides d'Afrique. *Thèse de doctorat. Université Libre de* Bruxelles
- Kornkven, A. M., Watson, L. E. & Estes, J. R. 1998. Phylogenetic analysis of *Artemisia* section *Tridentatae* (*Asteraceae*) based on sequences from the internal transcribed spacers (ITS) of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 86: 1787–1795
- Kornkven, A. M., Watson, L. E. & Estes, J. R. 1999. Molecular phylogeny of *Artemisia* section *Tridentatae* (*Asteraceae*) based on chloroplast DNA restriction site variation. *Systematic Botany*, 24: 69–84
- **Kreitschitz, A. & Vallès, J. 2003.** New or rare data on chromosome numbers in several taxa of the genus *Artemisia* (Asteraceae) in Poland. *Folia Geobotanica*, 38: 333-343.http://dx.doi.org/10.1007/BF02803203
- **Kremer, A. 2000.** Changements climatiques et diversité génétique. *Revue forestière française*, vol. LII, numéro spécial "Conséquences des changements climatiques pour la forêt et la sylviculture"
- **Ku, H.M., Vision, T. & Liu, J.P. 2000.** Tanksley, S.D.: Comparing sequenced segments of the tomato and *Arabidopsis* genomes: large-scale duplication followed by selective gene loss creates a network of synteny. *Proceedings of the National Academy of Sciences-USA*, 97: 9121-9126
- Kubešová, M., Moravcova, L., Suda, J., Jarošík, V. & Pyšek, P. 2010. Naturalized plants have smaller genomes than their non-invading relatives: a flow cytometric analysis of the Czech alien flora. *Preslia*, 82(1): 81-96
- Kurşat, M., Civelek, Ş., Turkoğlu, İ. & Tabur, S. 2011. Artemisia sieberi Bess. subsp. sieberi A new record for Turkey and a delete record for Turkey Artemisia herba-alba Asso. (Asteraceae). Pakistan Journal of Botany, 43: 1819–1821
- Lakehal, S., Meliani, A., Benmimoune, S., Bensouna, S.N., Benrebiha, F.Z. & Chaouia, C. 2016. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Artemisia herbaalba* Asso Grown in Algeria. *Medicinal chemistry (Los Angeles)*. Volume 6(6): 435-439
- **Lammi, A., Siikamäki, P. & Mustajärvi, K. 1999.** Genetic Diversity, Population Size, and Fitness in Central and Peripheral Populations of a Rare Plant *Lychnis viscaria*. *Conservation Biology*, 13: 1069–1078 doi:10.1046/j.1523-1739.1999.98278.x
- **Laursen, S., Reiners, W., Kelly, R. & Gerow, K. 2007.** Pollen dispersal by *Artemisia tridentata* (Asteraceae). *International Journal of Biometeorology*, 51:465–481. doi:10.1007/s00484-007-0086-7
- Le Houérou, H. N., Claudin, J. & Pouget, M. 1977. Etude bioclimatique des steppes Algériennes (Avec une carte bioclimatique à 1/1.000.000ème). Bulletin de la Société d'histoire naturelle d'Afrique du Nord Alger, T. 68, fasc. J et 4, 1977
- **Le Houérou, H.N. 1995.** Bioclimatologie et biogéographie des steppes arides du Nord de l'Afrique: Diversité biologique, développement durable et désertisation. In : *Le Houérou H.N. (ed.). Montpellier : CIHEAM, 1995. p. 1 -396 (Option s Méditerranéennes : Série B. Etudes et Recherches; n. 10)*

- **Le Houérou, H.N. 1995.** Bioclimatologie et biogéographie des steppes arides du Nord de l'Afrique : diversité biologique, développement durable et désertisation. . *Montpellier : CIHEAM, (Options Méditerranées :* Série B. Etudes et Recherches; n. 10)
- **Lefebvre, C. 2011.** Intérêt de la cytogénétique conventionnelle et moléculaire dans les hémopathies malignes. *CHU Grenoble, EC génétique*
- **Leitch, I. J. & Bennett, M. D. 2004.** Genome downsizing in polyploid plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82, 651–663
- **Leitch, I. J., Chase, M. W. & Bennett, M. D. 1998.** Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. *Annals of Botany*, 82, 85–94
- **Leitch, I.J. & Leitch, A.R. 2013.** Genome Size Diversity and Evolution in Land Plants. Plant Genome Diversity Volume 2. Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. *Springer-Verlag Wien*, 978-3-7091-1159-8
- **Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A.A. 1964.** Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220. http://dx.doi. org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x
- **Lévêque, C. 2017.** La biodiversité : avec ou sans l'homme ?: Réflexions d'un écologue sur la protection de la nature en France. *Editions Quae*, 128 pages
- **Levin, D. A. & Kerster, H. W. 1974.** Gene flow in seed plants. In *Evolutionary Biology, ed. T. Dobzhansky, M. K. Hecht, W. D. Steere*, 7:139-220. New York: Plenum
- **Levin, D. A. 2002.** The role of chromosomal change in plant evolution. *Oxford University Press*, New York
- Levin, D. A., Palestis, B. G., Jones, R. N. & Trivers, R. 2005. Phyletic hot spots for B chromosomes in angiosperms. *Evolution*, 59(5): 962-969
- **Levin, D.A. & Funderburg, S.W. 1979.** Genome size in angiosperms: temperate versus tropical species. *The American Naturalist*, 114: 784-795
- **Levitzky, G.A. 1931.** The karyotype in systematics. *Bulletin Of Applied Botany, Of Genetics And Plant-breeding*, 27: 220–240
- **Librado, P. & Rozas, J. 2009.** DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451–2. doi:10.1093/bioinformatics/ btp187
- **Ling, Y. R. 1991.** The Old World Artemisia (Compositae). Bulletin of Botanical Research, Harbin 12, 1–108.
- **Liu, B. & Davis, T. 2011.** Conservation and loss of ribosomal RNA gene sites in diploid and polyploid *Fragaria* (Rosaceae). *BMC Plant Biology*, 11: 157
- **Liu, J.-S. & Schardl, C.L. 1994.** A conserved sequence in internal transcribed spacer 1 of plant nuclear rRNA genes. *Plant Molecular Biology*, 26: 775–778
- Liu, Y., Huo, N., Dong, L., Wang, Y., Zhang, S. et al. 2013. Complete Chloroplast Genome Sequences of Mongolia Medicine *Artemisia frigida* and Phylogenetic Relationships with Other Plants. *PLoS ONE*, 8(2): e57533. doi:10.1371/journal.pone.0057533
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Santos, C., Doležel, J. & Suda, J. 2008. FLOWer: A Plant DNA Flow Cytometry Database (release 1.0, May 2008) http://flower.web.ua.pt/

- **Löve, A. et Löve, D. 1943.** The significance of differences in the distribution of diploids and polyploids. *Hereditas*, 29:145–163
- Loveless, M. D. & Hamrick, J. L. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 15: 65-95
- **Lynch, M. & Crease, T. J. 1990.** The analysis of population survey data on DNA sequence variation. *Molecular Biology and Evolution*, 7: 377-394
- Lysák, M. A., Rostková, A., Dixon, J.M., Rossi, G. & Doležel, J. 2000. Limited Genome Size Variation in *Sesleria albicans*. *Annals of Botany*, Volume 86, Issue 2, 1 August 2000, P. 399–403, https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1200
- Lysak, M. A., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K. & Schubert, I. 2006. Mechanisms of chromosome number reduction in Arabidopsis thaliana and related Brassicaceae species. *Proceedings of the National Academy of Sciences-USA*, 103:5224–5229
- Ma, J., Devos, K.M. & Bennetzen, J.L. 2004. Analyses of LTR-retrotransposon structures reveal recent and rapid genomic DNA loss in rice. *Genome Research*, 14: 860-869
- Maatougui, A., Tardif, N., Acherkouk, M., & El-Houmaizi M.A.2013. Impact d'une mise en défens sur la biodiversité végétale d'une steppe semi-aride à *Artemisia herba-alba* Asso dans les hauts plateaux de l'oriental Marocain. *ScienceLib Editions Mersenne*: Volume 5, N° 131006
- **MacGillivray, C.W. & Grime, J.P. 1995.** Genome size predicts frost resistance in British herbaceous plants: implications for rates of vegetation response to global warming. *Functional Ecology*, 9: 320–325
- Maghni, B., Adda, A. & Merah, O. 2017. Evaluating morphological variability of *Artemisia herba-alba* Asso from western Algeria. *Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 9(1): 509-527
- Maghni, B., Bougoutaia, Y., Abderrabi, K., Adda, A. & Merah, O. 2016. Optimization of DNA Extraction and PCR Conditions for Genetic Diversity Study in *Artemisia herba-Alba* from Algeria. *Scientific Journal of Genetics and Gene Therapy*, 2(1): 010-012
- Magri, D., Fineschi, S., Bellarosa, R., Buonamici, A., Sebastiani, F., Schirone, B., Simeone, M.C. & Vendramin, G.G. 2007. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology*, 16: 5259–5266
- **Maherali, H., Walden, A.E & Husband, B.C. 2009.** Genome duplication and the evolution of physiological responses to water stress. *New Phytologist*, 184: 721–731.
- Mahmood, T., Hassan, N., Nazar, N. & Naveed, I. 2011. Phylogenetic analysis of different *Artemisia* species based on chloroplast gene RPS11. *Archives of Biological Science Belgrade*, 63(3): 661-665
- Mai, J.C. & Coleman, A.W. 1997. The Internal Transcribed Spacer 2 exhibits a common secondary structure in green algae and flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* 44: 258–271
- Maki, M., Morita, H., Oiki, S. & Takahashi. H. 1999. The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis*, section *Flavae* (Liliaceae). *American Journal of Botany*, 86(2): 287–292

- **Maley, J. 2010.** Climate and Palaeoenvironment evolution in north tropical Africa from the end of the Tertiary to the Upper Quaternary. *Palaeoecology of Africa*, 30: 227–278
- Malik, S., Vitales, D., Hayat, M.Q., Korobkov, A.A., Garnatje, T. & Vallès, J. 2017. Phylogeny and biogeography of *Artemisia* subgenus *Seriphidium* (*Asteraceae*, *Anthemideae*). *Taxon*, 66: 934-952
- Maluszynska, J. & Heslop-Harrison, J.S. 1993. Physical mapping of rDNA *loci* in *Brassica* species. *Genome*, 36: 774–781
- Maluszynska, J., Hasterok, R. & Weiss, H. 1998. rRNA genes: their distribution and activity in plants. In: *Maluszynska J (ed) Plant cytogenetics*. Silesian University Press, Katowice, pp 75–95
- **Mandakova, T. & Lysak, M.A. 2008.** Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in x = 7 crucifer species (*Brassicaceae*). *Plant Cell*, 20:2559–2570
- Mansion, G., Rosenbaum, G., Schoenenberger, N., Bacchetta, G., Rosselló, J. A. & Conti, E. 2008. Phylogenetic analysis informed by geological history supports multiple, sequential invasions of the Mediterranean Basin by the angiosperm family Araceae. *Systematic Biology*, 57: 269-285
- **Mantel, N.A. 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220
- Manzaneda, A. J. Rey, P. J. Bastida, J. M. Weiss-Lehman, C. Raskin, E. & Mitchell-Olds, T. 2012. Environmental aridity is associated with cytotype segregation and polyploidy occurrence in *Brachypodium distachyon* (Poaceae). *New Phytologist*, 193: 797–805. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03988.x.
- Marchelli, P., Baier, C., Mengel, C., Ziegenhagen, B., Gallo, L.A. 2010. Biogeographic history of the threatened species *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and implications for conservation: a case study with organelle DNA markers. *Conservation Genetics*, 11:951–963
- Marie, D. & Brown, S.C. 1993. A cytometric exercise in plant DNA histograms, with 2C values for 70 species. *Biology of the Cell*, 78: 41-51. http://dx.doi.org/ 10.1016/0248-4900(93)90113-S
- **Markarian, D. & Schulz-Schaeffer, J. 1958.** A possible origin of supernumerary fragment chromosomes. *Journal of Heredity,* 49: 2-7
- Marouf, A. 2012. Plantes natives d'Algérie. http://algerianativeplants.net/index.php#
- Martin, S.L. & Husband, B.C. 2009. Influence of phylogeny and ploidy on species ranges of North American angiosperms. *Journal of Ecology*, 97: 913–922
- Mata, J., Bermejo, L.A., Delgado, J.V., Camacho, A. & Flores, M.P. 2000. Livestock use research in Canary protected areas. *Methodology Archivos de Zootecnia*. 49: 275-284
- Matsushima, R., Hamamura, Y., Higashiyama, T., Arimura, S., Sodmergen, Tsutsumi, N. & Sakamoto, W. 2008. Mitochondrial dynamics in plant male gametophyte visualized by fluorescent live imaging. *Plant and Cell Physiology*, 49: 1074–1083
- Mazzella, C., Rodriguez, M., Vaio, M., Gaiero, P., Lopez-Carro, B., Santinaque, F.F. et al. 2010. Karyological features of Achyrocline (Asteraceae, Gnaphalieae): stable karyotypes, low DNA content variation and linkage of rRNA genes. *Cytogenetic Genome Research*, 128: 169–176

- **McArthur, E.D., & Sanderson, S.C. 1999.** Cytogeography and chromosome evolution of subgenus *Tridentatae* of *Artemisia* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 86: 1754–1775
- Messai, L., Hegazy, M. F., Ahmed, A. A., Kalla, A., Djaballah, B. & Shinji, O. 2008. Sesquiterpene lactones from Algerian Artemisia herba-alba. Phytochemistry Letters, Volume 1, Issue 2, Pages 85-88
- **Messaili, B. 1995.** Systématique des spermaphytes. *Office des Publications Universitaires* Alger
- **Meulenkamp, J. J. & Sissingh, W. 2003.** Tertiary palaeogeography and tectonostratigraphic evolution of the Northern and Southern Peri-Tethys platforms and the intermediate domains of the African-Eurasian convergent plate boundary zone. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology,* 196: 209-228
- Miao, Y., Meng, Q., Fang, X., Yan, X., Wu, F. & Song, Ch. 2011. Origin and development of *Artemisia* in Asia and its implications for the uplift history of the Tibetan Plateau: A review. *Quaternary International*, 236: 3–12
- Migliore, J., Baumel, A., Juin, M. & Médail, F. 2012. From Mediterranean shores to central Saharan mountains: key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal Biogeography*, 39: 942–956
- Migliore, J., Baumel, A., Juin, M., Fady, B. Roig, A. et al. 2013. Surviving in Mountain Climate Refugia: New Insights from the Genetic Diversity and Structure of the Relict Shrub *Myrtus nivellei* (Myrtaceae) in the Sahara Desert. *PLoS ONE* 8(9): e73795. doi:10.1371/journal.pone.0073795
- Mohamed, A.H., El-Sayed, M.A., Hegazy, M. E., Helaly, S.E., Esmail, A.M. & Mohamed, N.S. 2010. Chemical Constituents and Biological Activities of *Artemisia herba-alba*. *Records of Natural* Products, 4: 1-25
- **Montaigne, W. 2011.** Diversité génétique et adaptation au milieu chez les arbres forestiers tropicaux. Etude chez le genre *Virola* (Myristicaceae). *Thèse de Doctorat. Université des Antilles et de la Guyane.* N : 2011AGUY0480
- Moscone, E.A., Baryani, M., Ebert, I., Greilhuber, J., Ehrendorfer, F. & Hunziker, A.T. 2003. Analysis of nuclear DNA content in *Capsicum* (Solanaceae) by flow cytometry and Feulgen densitometry. *Annals of Botany*, 92: 21–29
- Mower, J.P., Touzet. P., Gummow, J.S., Delph, L.F., & Palmer, J.D. 2007. Extensive variation in synonymous substitution rates in mitochondrial genes of seed plants. *BMC Evolutionary Biology*, 7:135
- **Murray, B.G. 2005.** When does intraspecific C-value variation become taxonomically significant? *Annals of Botany*, 95: 119–125
- Naranjo, C. A., Farrari, M.R., Palermo, A. M. & Poggio, L. 1998. Karyotype, DNA Content and Meiotic Behaviour in Five South American Species of *Vicia* (Fabaceae). *Annals of Botany* 82: 757-764
- **Narayan, R.K.J. 1998.** The role of genomic constraints upon evolutionary changes in genome size and chromosome organization. *Annals of Botany*, 82 (Suppl. A): 57–66.
- **Nedjraoui, D. & Bédrani, S. 2008.** La désertification dans les steppes algériennes : causes, impacts et actions de lutte. *Vertigo*, v8. doi: 10.4000/vertigo.5375

- **Nedjraoui, D. 2006.** Country pasture/forage resource profiles: Algeria. Rome (Italie): FAO. 28p; document en ligne: http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/ counprof/PDF% 20files/ Algeria.pdf
- **Nedjraoui, D., 2004.** Evaluation des ressources pastorales des régions steppiques algériennes et définition des indicateurs de dégradation. *CIHEAM-IAMZ*, 2004. 489 P. (*Cahiers Options Méditerranéennes*; v. 62)
- Nègre, R. 1962. Petite flore des régions arides du Maroc occidental. Tome II. CNRS.
- Nei, M. & Li, W-H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76: 5269-5273
- **Nei, M. 1973.** Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 70: 3321-3323
- **Nei, M. 1977.** F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. Annals of Human Genetics, 41:225–233
- Noirot, M., Barre, P., Duperray, C., Louarn, J. & Hamon, S. 2003. Effects of caffeine and chlorogenic acid on propidium iodide accessibility to DNA: consequences on genome size evaluation in coffe tree. *Annals of Botany*, 92: 259–264
- Noirot, M., Barre, P., Louarn, J., Duperray, C. & Hamon, S. 2000. Nucleus-cytosol interactions: a source of stoichiometric error in flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Annals of Botany*, 86: 309–316
- **Oberprieler, C. 2005.** Temporal and spatial diversification of Circum-Mediterranean Compositae-Anthemideae. *Taxon*, 54: 951-966
- **Oberprieler, C., Himmelreich, S. & Vogt, R. 2007b**. A newsubtribal classification of the tribe *Anthemideae* (Compositae). *Willdenowia*, 37: 89-114
- Oberprieler, C., Himmelreich, S., Kallersjo, M., Vallès, J., Watson, L. E. & Vogt, R. 2009. Anthemideae. In Systematics, Evolution and Biogeography of the Compositae, (V. A. Funk, A. Susanna, T. F. Stuessy and R. J. Bayer, eds.), pp. 632–666. International Association Plant Taxonomy, Vienna.
- **Oberprieler, C., Vogt, R. & Watson, L.E. 2007a.** Tribe Anthemideae. In Flowering Plants Vol. VIII. Eudicots. Asterales, (J. W. Kadereit and C. Jeffrey, eds.), pp. 342–374. Springer-Verlag, Berlin
- **Ohri, D. 1998.** Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany*, 82: 75–83
- **Ohri, D. 2005.** Climate and growth form: the consequences for genome size in plants. *Plant Biology*, 7(05): 449-458
- **Oliva, M., Torrell, M. & Vallès, J. 1997**. Data on germination rates and germinative vigour in *Artemisia (Asteraceae). Bocconea, 5*: 679–684
- Orgel, L.E. & Crick, F.H.C. 1980. Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature*, 284: 604-607
- Osborne, A.H., Vance, D., Rohling, E.J., Barton, N., Rogerson, M. & Fello, N. 2008. A humid corridor across the Sahara for the migration of early modern humans out of Africa 120,000 years ago. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 16444–16447
- Otto, S. P. & Whitton, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*, 34: 401–437

- **Ouyahya, A. & Viano, J. 1988.** Recherches cytogénétiques sur le genre *Artemisia* L. au Maroc. *Boletim da Sociedade Broteriana* série 2, 61: 105-124
- **Ouyahya, A. 1987.** Systematique du genre *Artemisia* au Maroc, *Thèse de Doctorat ès Sciences, Univ. Aix-Marseille III*, 433 p
- Ouyahya, A. 1995. Systématique du Genre Artemisia au Maroc. In D.J.N. Hind, C. Jeffrey and G.V. Pope (Editors). Advances, in Compositae Systematics, pp. 293-354. Royal Botanic Gardens, Kew
- **Ozenda, P. 1991.** Flore et végétation du Sahara. 3<sup>eme</sup> édition. CNRS Edition. Paris.662 P. Paris 7<sup>e</sup>. 566 P
- **Ozkan, H, Levy, A. A. & Feldman, M. 2001.** Allopolyploidy induced rapid genome evolution in the wheat (*Aegilops–Triticum*) group. *Plant Cell*, 13: 1735–1747.
- **Packer, J.G. 1969.** Polyploidy in the Canadian arctic archipelago. *Arctic Alpine Research*, 1:15–28
- **Palmer, J.D. 1991.** Plastid chromosomes: structure and evolution. *Bogorad L and Vasil IK editions. Academic Press*, San Diego
- **Panero, J. L. & Funk, V. A. 2002.** Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proceedings of the Biological Society of Washingto*, 115(4):909-922
- **Panero, J. L. & Funk, V.A., 2008.** The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 757–782
- Panero, J. L., Freire, S. E., Espinar, L. A., Crozier, B. S., Barboza, G. E. & Cantero, J. J., 2014. Resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny and a new basal lineage to study early evolution of *Asteraceae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 80: 43–53
- **Panero, J.L. & Crozier, B.S., 2003.** Primers for PCR amplification of Asteraceae chloroplast DNA. *Lundellia*, 6: 1–9
- Pedrosa-Harand, A., de Almeida, C.C., Mosiolek, M., Blair, M.W., Schweizer, D. & Guerra, M. 2006. Extensive ribosomal DNA amplification during Andean common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) evolution. *Theoretical and Applied Genetics*, 112:924–933
- **Pellicer, J. 2009.** Sistemàtica i filogènia d'*Artemisia* i gèneres relacionats: una aproximació citogenètica i molecular amb especial èmfasi en el subgènere *Dracunculus*. *Thèse de doctorat*, Universitat de Barcelona,
- Pellicer, J., Garnatje, T., Molero, J., Pustahija, F., Siljak-Yakovlev, S. et Vallès, J. 2010a. Origin and evolution of the South American endemic *Artemisia* species (Asteraceae): Evidence from molecular phylogeny, ribosomal DNA and genome size data. *Australian Journal of Botany*, 58: 605-616. http://dx.doi.org/10.1071/BT10047
- Pellicer, J., Garcia, S., Canela, M. A., Garnatje, T., Korobkov, A. A., Twibell, J. D. & Vallès, J. 2010b. Genome size dynamics in *Artemisia* L. (Asteraceae): Following the track of polyploidy. *Plant Biology*, 12: 820–830
- **Pellicer, J., Fay, M.F. & Leitch, I.J. 2010c.** The largest eukaryotic genome of them all? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 164: 10–15

- Pellicer, J., Garcia, S., Garnatje, T., Hidalgo, O., Korobkov, A. A., Dariimaa, Sh. & Vallès J. 2007. Chromosome counts in Asian *Artemisia* L. (*Asteraceae*) species: From diploids to the first report of the highest polyploid in the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 153: 301–310
- Pellicer, J., Garcia, S., Garnatje, T., Hidalgo, O., Siljak-Yakovlev, S., & Vallès, J. 2008. Molecular cytogenetic characterization of some representatives of the subgenera *Artemisia* and *Absinthium* (genus *Artemisia*, Asteraceae). *Collectanea Botanica* (*Barcelona*), 27: 19–27.
- **Pellicer, J., Garnatje, T., Korobkov, A. A. & Vallès, J. 2011.** Phylogenetic relationships of subgenus *Dracunculus* (genus *Artemisia, Asteraceae*) based on ribosomal and chloroplast DNA sequences. *Taxon*, 60: 691–704
- **Perry, A. S. & Wolfe, K. H. 2002.** Nucleotide substitution rates in legume chloroplast DNA depend on the presence of the inverted repeat. *Journal of Molecular Evolution*, 55: 501–508
- **Petit, R., Kremer, A. & Wagner, D.B. 1993.** Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity*, 71: 630-641
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D. & Vendramin, G.G. 2005a. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14: 689–701
- **Pharmawati, M., Yan G., Sedgley, R. & Finnegan, P. 2004.** Chloroplast DNA inheritance and variation in Leucadendron species (Proteaceae) as revealed by PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 1694-1701
- Piegu, B., Guyot, R., Picault, N., Roulin, A., Sanyal, A., Kim, H., Collura, K., Brar, D.S., Jackson, S., Wing, R.A. & Panaud, O. 2006. Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. *Genome Research*, 16: 1262-1269
- **Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C.,** *et al.* **1988.** Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 9138-42
- **Pinkel, D., Straume, T. & Gray, JW. 1986**. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 2934-8
- **Podlech, D. 1986.** Compositae, VI Anthemideae. In Rechinger, K. H. (ed.), Flora Iranica, no. 158-Graz
- **Podlech, D. 2013.** Some remarks on *Artemisia* subgenus *Seriphidium (Asteraceae)* mostly from Afghanistan. *Rostaniha*, 14: 48-58
- **Poggio, L., Rosato, M., Chiavarino, A.M. & Naranjo, C.A. 1998.** Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Annals of Botany*, 82(Suppl. A): 107–117.
- **Poljakov, P.P. 1961:** Artemisia. In: Shishkin EK, Bobrov EG, (eds.), Flora of the U.S.S. R., vol. 26, Nauka, Leningrad, 425-631
- **Pons, O. & Petit, R. J. 1996.** Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144: 1237-1245

- **Pons, O. & Petit, R.J. 1995.** Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. *Theoretical and Applied Genetics*, 90:462–70. doi:10.1007/BF00221991.
- **Posada, D. 2008.** jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular biology and evolution*, 25(7): 1253-1256
- **Pouget, M. 1980.** Les relations sol-végétation dans les steppes sud-algéroises. *ORSTOM* (collection "Travaux et Documents"), Paris
- **Price, H.J., Chambers, K.L. & Bachmann, K. 1981.** Geographic and ecological distribution of genomic DNA content variation in *Microseris douglasii* (Asteraceae). *Bot. Gazette*, 142:415-426
- Quezel, P & Santa, S. 1963. Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Tome II. Centre Nationale de la Recherche Scientifique. Paris 7. 1170 P
- **Quézel, P. 1985.** Definition of the Mediterranean region and the origin of its flora. *Plant conservation in the Mediterranean area* (ed. by C. Gomez-Campo), pp. 9–24. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht
- **Quézel, P. et Martinez, C. 1960.** Le dernier interpluvial au Sahara central. Essai de chronologie palynologique et paléoclimatique. *Libyca*, 6/7 : 211–227.
- Rabie, M., Jalili, A., Azarnivand, H., Jamzad, Z. & Arzani, H. 2006. A contribution to the *Artemisia sieberi (Asteraceae)* based on phytochemical studies in Iran. *Iranian Journal Botanical*, 13(2): 120-127
- **Rabinovitch, P.S. 1994.** DNA content histogram and cell-cycle analysis. In: Darzynkiewicz Z, Robinson JP, Crissman HA, eds. *Methods in cell biology: flow cytometry, Vol. 41.* San Diego: Academic Press, 263–296
- **Rambaut, A. 2012.** FigTree v1. 4. Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology. Edinburgh, UK: University of Edinburgh, Institute of Evolutionary Biology
- **Ramirez-Morillo, I.M. et Brown, G. K., 2001.** The origin of the low chromosome number in *Cryptanthus* (Bromeliaceae). *Systematic Botany*, 26: 722-726
- **Raskina, O., Barber, JC., Nevo E. & Belyayev, A. 2008** Repetitive DNA and chromosomal rearrangements: speciation-related events in plant genomes. *Cytogenetic and Genome Research*, 120:351–357
- **Rayburn, A. L. & Auger, J. A. 1990.** Genome size variation in *Zea mays* ssp. *mays* adapted to different altitudes. *Theoretical and Applied Genetics*, 79: 470-474
- **Rayburn, A. L. 1990.** Genome size variation in Southwestern United States Indian maize adapted to various altitudes. *Evolutionary trends in plants*, 4: 53-57
- Reeves, G., Francis, D., Davies, M.S., Rogers, H.J. & Hodkinson, T.R. 1998. Genome size is negatively correlated with altitude in natural populations of *Dactylis glomerata*. *Annals of Botany*, (London), 82(suppl. A): 99–105
- **Reisch, C., Anke, A. & Rohl, M. 2005.** Molecular variation within and between ten population of *Primula farinosa* (Primulaceae) along an altitudinal gradient in the northern Alps. *Basic and Applied Ecology*, 6: 35-45
- **Rodriguez, D. J. 1996.** A model for the establishment of polyploidy in plants. *American Naturalist*, 147:33–46

- **Rognon, P. 1980.** Pluvial and arid phases in the Sahara: the role of non-climatic factors. *Van Zinderen-Bakker Sr EM, Coetzee JA, editors. Palaeoecology of Africa and the surrounding islands. Rotterdam: AA Balkema*, 45–62
- Rois, A. S., Sadio, F., Paulo, O.S., Teixeira, G., Paes, A. P., Espirito-Santo, D., Sharbel, T. F. & Caperta, A.D. 2015. Phylogeography and modes of reproduction in diploid and tetraploid halophytes of *Limonium* species (Plumbaginaceae): evidence for a pattern of geographical parthenogenesis. *Annals of Botany*: Page 1 of 14. doi:10.1093/aob/mcv138, available online at www.aob.oxfordjournals.org
- **Romero-Zarco, C. 1986.** A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon*, 35: 526-530. http://dx.doi.org/10.2307/1221906.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19(12): 1572-1574
- Said, M.E.-A., Vanloot, P., Bombarda, I., Naubron, J.-V., Dahmane, E.M., Aamouche, A., Jean, M., Vanthuyne, N., Dupuy, N. & Roussel, C. 2015. Analysis of the major chiral compounds of *Artemisia herba-alba* essential oils (EOs) using reconstructed Vibrational Circular Dichroism (VCD) spectra: en route to a VCD chiral signature of EOs, *Analytica Chimica Acta*, doi: 10.1016/j.aca.2015.11.010
- Salari, Z., Mehregan, I., Assadi, M., Nejadsattari, T. 2014. Artemisia herba-alba complex: morphological diversity and molecular niformity. Journal of Biodiversity and Environmental Sciences (JBES). Vol. 5, No. 1, p. 608-624
- Saleh, N., El-Negoumy A. M. & Abou-Zaid M. M. (1987). Flavonoids of *Artemisia judaica*, A. monosperma and A. herba-alba. Phytochemistry, 26 (11): 3059-3064
- Salido, S., Valenzuela, L.R., Altarejos, J., Nogueras, M., Sanchez, A. & Cano, E. 2004. Composition and infraspecific variability of *Artemisia herba-alba* from southern Spain. *Biochimical Systematics and Ecology*, 32: 265-277
- Sanderson, S.C., McArthur, E.D. & Stutz, H.C. 1989. A relationship between polyploidy and habitat in western shrub species. In Proceedings of the symposium on shrub ecophysiology and bio technology. *General Technical Report INT*-256. Edited by A. Wallace, E.D. McArthur, and M.R. Haferkamp. US Department of Agriculture, Forest Service, Intermountain Research Station, Ogden, Utah. pp. 23–30
- Sang, T., Crawford, D.J. & Stuessy, T.F. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (Paeonia) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: Implications for biogeography and concerted evolution. *Proceedings National Academy of Sciences. USA*, 92: 6813–6817
- Sanz, M., Schneeweiss, G. M., Vilatersana, R. & Vallès, J. 2011. Temporal origins and diversification of *Artemisia* and allies (*Anthemideae*, *Asteraceae*). *Collectanea Botanica*, 30:7-15
- Sanz, M., Schonswetter, P., Vallès, J., Schneeweiss, GM. & Vilatersana, R. 2014. Southern isolation and northern long-distance dispersal shaped the phylogeography of the widespread, but highly disjunct, European high mountain plant *Artemisia eriantha* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 174:214–226. doi:10.1111/boj.12132
- Sanz, M., Vilatersana, R., Hidalgo, O., Garcia-Jacas, N., Susanna, A., Schneeweiss, G.M. & Vallès, J. 2008. Molecular phylogeny and evolution of fl oral characters of

- Artemisia and allies (Anthemideae, Asteraceae): evidence from nrDNA ETS and ITS sequences. Taxon, 57: 66–78
- **Schaal, B. A. 1975.** Population structure and local differentiation in *Liatris cylindracea*. *The American Naturalist*, 109:511-28
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T. & Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7: 465–474
- **Schubert, I. & Lysak, M.A. 2011.** Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. *Trends in Genetics*, 27:207–216
- Schuster, M., Duringer, P., Ghienne, J.F., Vignaud, P., Mackaye, H.T., Likius, A. & Brunet, M. 2006. The age of the Sahara Desert. *Science*, 311, 821
- **Schuster, W. & Brennicke, A. 1994.** The plant mitochondrial genome: physical structure, information content, RNA editing, and gene migration to the nucleus. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 45:61–78
- **Schweizer, D. & Ehrendorfer, F. 1983.** Evolution of C-band patterns in *Asteraceae Anthemideae. Biologisches Zentralblatt,* 102: 637–655
- **Seitz, U. & Seitz, U. 1979.** The molecular weight of rRNA precursor molecules and their processing in higher plant cells. *Zeitschrift für Naturforschung* C A *Journal of Biosciences*, 34: 253–258
- Serre, J.L. 2006. Génétique des populations. Cours et exercices corrigés. *Dunod*, Paris
- Shahmuradov, I.A., Akbarova, Y.Y., Solovyev, V.V. & Aliyev, J.A., 2003. Abundance of plastid DNA insertions in nuclear genomes of rice and *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 52: 923-934
- Shaked, H., Kashkush, K., Ozkan, H., Feldman, M. & Levy, A. A. 2001. Sequence elimination and cytosine methylation are rapid and reproducible responses of the genome to wide hybridization and allopolyploidy in wheat. *Plant Cell*, 13: 1749–1759.
- Sharma, A. & Sen, S. 2002. Chromosome Botany. Science Publishers, Inc., Enfield.
- **Shaw, J. & Small, R. L. 2005.** Chloroplast DNA phylogeny and phylogeography of the North American plums (*Prunus* subgenus *Prunus* section *Prunocerasus*, Rosaceae). *American Journal of Botany*, 92: 2011–2030
- **Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E. & Small, R. L. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94: 275–288.
- **Sheldon, J. C. & Burrows, F. M. 1973.** The dispersal effectiveness of the achene- pappus units of selected Compositae in steady winds with convection. *New Phytologist*, 72:665-75
- Shimono, Y., Hayakawa, H., Kurokawa, S. Nishida, T., Ikeda, H. & Futagami, N. 2013. Phylogeography of Mugwort (*Artemisia indica*), a Native Pioneer Herb in Japan. *Journal of Heredity*, 104(6):830–841. doi:10.1093/jhered/est054
- **Siljak-Yakovlev, S. 1986.** Etude cytogénétique et palynologique de compositeae endémniques ou relique de la flore Yougoslave. *Thèse d'Etat. Université Paris-Sud.* 217p
- Siljak-Yakovlev, S., 1996. La dysploïdie et l'évolution du caryotype. *Bocconea*, 5 : 211-220

- **Siljak-Yakovlev, S., Pustahija, F., Vicic, V. & Robin, O. 2014.** Molecular cytogenetics (FISH and fluorochrome banding): resolving species relationships and genome organization. *Methods in Molecular Biology*, 1115: 309-323. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-767-9\_15
- Simillion, C., Vandepoele, K., Van Montagu, M.C.E., Zabeau, M. & Van der Peer, Y.2002. The hidden duplication past of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences-USA*, 99: 13627-13632
- Sims, L. E. & Price, H. J. 1985. Nuclear DNA content variation in *Helianthus* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 72: 1213–1219
- **Singh-Ram, J. 2011.** Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop improvement: *Medicinal Plants, Volume 6. CRC Press.* 1098 P
- **Sloan, D.B., Alverson, A.J., Chuckalovcak, J.P., Wu, M., McCauley, D.E., Palmer, J.D.** & Taylor, D.R. 2012. Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *PLoS Biology,* 10(1):e1001241. doi: 10.1371/journal.pbio.1001241
- **Sloan-Bena, F. 1998.** Cartographie physique par hybridation *in situ* en fluorescence. Application à l'étude de remaniements du chromosome X associés à des pathologies. *Thèse de doctorat.* Université de Nancy I
- **Solbrig, O. T. 1977.** Chromosomal cytology and evolution in the family *Compositae*. *In* The Biology and Chemistry of the *Compositae*, (*V. H. Heywood*, *J. B. Harborne and B. L. Turner*, *eds.*), Vol. 1, pp. 269–281. Academic Press, London
- **Soltis, D. E. & Soltis, P. S. 2000.** The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States America*, 97: 7051–7057
- **Soltis, D. E., Soltis, P. S., Bennett, M. D. & Leitch, I. J. 2003.** Evolution of genome size in the angiosperms. *American Journal of Botany*, 90: 1596–1603
- **Soltis, D. E., Soltis, P.S., Collier, T.G. & Edgerton, M. L. 1991.** Chloroplast DNA variation within and among genera of the Heuchera Group (Saxifragaceae): evidence for chloroplast transfer and paraphyly. *American Journal of Botany*, 78: 1091–1112.
- **Sone, T., Fujisawa, M., Takenaka, M.** *et al.*, **1999.** Bryophyte 5S rDNA was inserted into 45S rDNA repeat units after the divergence from higher land plants. *Plant Molecular Biology*, 41, 679–685
- Stebbins, G. L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Edward Arnold, London
- **Stewart, Ph., 1969.** Quotient pluviothermique et dégradation biosphérique. *Bulletin de la Société d'histoire naturelle d'Afrique du Nord.* Vol. 59 (1-4) : 23-36
- **Stuessy, T.F. 2009.** Plant taxonomy. The systematic evaluation of comparative data, *ed. 2. Columbia University Press*, New York
- **Stuessy, T.F. 2011.** Multiple sources of comparative data for creative monography. In: Stuessy, T.F. & Lack, H.W. (eds.), Monographic plant systematics. Fundamental assessment of plant biodiversity, 33-47. Ruggell ARG Ganeter Verlag KG
- **Subally, D. & Quézel. P. 2002.** Glacial or interglacial: *Artemisia*, a plant indicator with dual responses. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 120: 123–130

- **Suda, J., Kyncl, T. & Freiova, R. 2003.** Nuclear DNA amounts in Macronesian angiosperms. *Annals of Botany*, 92: 152–164
- Suda, J., Loureiro, J., Travnicek, P., Rauchova, J., Vit, P., Urfus, T., Kubesova, M., Dreyer, L.L., Oberlander, K.C., Wester, P. & Roets, F. 2009. Flow cytométrie and its applications in plant population biology, ecology and biosystematics: new prospects for the Cape flora. *South African Journal of Botany*, 75:389
- **Swezey, C.S. 2009.** Cenozoic stratigraphy of the Sahara, Northern Africa. *The Journal of African Earth Sciences*, 53: 89–121
- **Swift, H. 1950.** The constancy of desoxyribose nucleic acid in plant nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 36: 643–654
- Szabo, B.J., Haynes, C.V., Jr. & Maxwell, T.A. 1995. Ages of Quaternary pluvial episodes determined by uranium-series and radiocarbon dating of lacustrine deposits of Eastern Sahara. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 113, 227–242
- Tabur, S., Civelek Ş., Öney, S. N., Şby, E., Kursat, M., & Turkoglu, İ. 2012. Chromosome counts and karyomorphology of some species of *Artemisia* (Asteraceae) from Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 36 (3): 235-246
- **Taiza, M. S., Divina, A.A.V., Moemy, G. M. & Rita, DC. L. F.R. 2015.** Anatomy and fructan distribution in vegetative organs of *Dimerostemma vestitum* (Asteraceae) from the *campos rupestres*. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 87(2): 797-812. http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140214
- **Templeton, A. R., Routman, E. & Phillips, C.A. 1995.** Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 140: 767–782.
- **Teoh, S.B. & Rees, H. 1976.** Nuclear DNA amounts in populations of *Picea glauca* and *Pinus* species. *Heredity*, 36: 123-137
- **The Plant List. 2013.** Version 1.1. Published on the Internet; http://www.theplantlist.org/ (accessed 1st January)
- **Torrel, M., & Vallès, J. 2001a.** Genome size in 21 *Artemisia* L. species (Asteraceae, Anthemideae): Systematic, evolutionary, and ecological implications. *Genome*, 44: 231–238
- **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
- **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
- **Torrell, M., Cerbah, M., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J. 2001.** Etude cytogénétique de trois taxons du complexe d'*Artemisia campestris* L. (Asteraceae, Anthemideae): Localisation de l'hétérochromatine et de l'ADN ribosomique. *Bocconea*, 13, 623–628
- **Torrell, M., Cerbah, M., Siljak-Yakovlev, S. & Vallès, J. 2003.** Molecular cytogenetics of the genus *Artemisia* (Asteraceae, Anthemideae): Fluorochrome banding and

- fluorescence *in situ* hybridization. I. Subgenus *Seriphidium* and related taxa. *Plant Systematics and Evolution*, 239: 141–153
- **Torrell, M., Garcia-Jacas, N., Susanna, A. & Vallès, J. 1999.** Phylogeny in *Artemisia* (*Asteraceae, Anthemideae*) Inferred from Nuclear Ribosomal DNA (ITS) Sequences. *Taxon*, 48: 721-736
- **Tournefort, J. P. 1700.** Institutiones reiherbariae. *Edition altera, Gallica calonge Avctior, quingentis circiter Tabulis aneis adornata, Tomus Primus. Paris.* P460: 697.Treuttel and Wûrtz, Paris.
- **Turpeinen, T., Kulmala, J. & Nevo, E. 1999.** Genome size variation in *Hordeum spontaneum* populations. *Genome*, 42: 1094–1099
- **Valdés-Bermejo, E. & Gómez, G. J. 1976.** Notas cariosistematicas sobre flora espanala, I. *Acta Bot. Malacitana*, 2:39-50
- **Valen, L.V. 1965.** Morphological Variation and Width of Ecological Niche. *The American Naturalist*, 99: 377-390
- **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
- Vallès, J. & Garnatje, T. 2005. Artemisia and its allies: Genome organization and evolution and their biosystematic, taxonomic and phylogenetic implications in the Artemisiinae and related subtribes (Asteraceae, Anthemideae). In: Plant genome: Biodiversity and Evolution. Vol. 1B: Phanerogams, (A. Sharma, ed.), pp. 255–285. Science Publishers, Enfield.
- Vallès, J. & McArthur, E. D. 2001. Artemisia systematics and phylogeny: Cytogenetic and molecular insights. In Shrubland Ecosystem Genetics and Biodiversity: Proceedings, Rocky Mountain Research Station, (E. D. McArthur and D. J. Fairbanks, eds.), pp. 67–74. Provo. vol. 30 (2011): 7-15
- **Vallès, J. 1987.** Contribución al estudio de las razas ibéricas de *Artemisia herba-alba* Asso. *Boletim da Sociedade Broteriana* série 2, 60: 5-27
- Vallès, J., Garcia, S., Hidalgo, O., Martin, J., Pellicer, J., Sanz, M. & Garnatje, T. 2011. Biology, Genome Evolution, Biotechnological Issues and Research Including Applied Perspectives in *Artemisia (Asteraceae)*. In: *Jean-Claude Kader and Michel Delseny, editors: Advances in Botanical Research, Vol. 60*
- Vallès, J., Torrell, M., & Garcia-Jacas, N. 2001b. New or rare chromosome counts in *Artemisia* L. (Asteraceae, Anthemideae) and related genera from Kazakhstan. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 137: 399–407.
- Vallès, J., Torrell, M., Garcia-Jacas, N., et Kapustina, L.A. 2001a. New or rare chromosome counts in the genera *Artemisia* L., and *Mausolea* Bunge (Asteraceae, Anthemideae) from Uzbekistan. *Bot Botanical Journal of the Linnean Society*, 135: 391–400
- Vallès, J., Torrell, M., Garnatje, T., Garcia-Jacas, N., Vilatersana, R., Susanna, A. 2003. The genus *Artemisia* and its allies, phylogeny of the subtribe *Artemisiinae* (*Asteraceae*, *Anthemideae*) based on nucleotide sequences of nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS). Plant Biology, 5: 274–284

- **Vermes, I., Haanen, C. & Reutelingsperger, C. 2000.** Flow cytometry of apoptotic cell death. *Journal of Immunological Methods*, 243: 167–190.
- Vitte, C. & Panaud, O. 2005. LTR retrotransposons and plant genome size: Emergence of the increase/decrease model. *Cytogenetics and Genome Research*, 110: 91-107
- **Waisel, Y. 1972.** Ecology of Desert Systems. *Walter G. Whitford, Edition*: Academic Press, 2002. 343 P
- Wakamiya, I., Newton, R. J., Johnston, S.J. & Price, J, H. 1993. Genome size and environmental factors in the genus *Pinus*. *American Journal of Botany*, 80: 1235–1241
- Wakasugi, T., Sugita, M. Tsudzuki, T. & Sugiura, M. 1998. Updated gene map of tobacco chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16: 231–241
- Wang, R-L., Stec, A., Hey, J., Lukens, L. & Doebley, J. 1999. The limits of selection during maize domestication. *Nature*, 398: 236-239
- **Wang, W. 2004.** On the origin and development of *Artemisia (Asteraceae)* in the geological past. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 145: 331–336
- **Watanabe, K. 2015.** Index to Chromosome Numbers in *Asteraceae* (http://www.lib.kobe-u.ac.jp/infolib/meta\_pub/G0000003asteraceaeresult-en, accessed November 4, 2015)
- Watson, L. E., Bates, P. L., Evans, T. M., Unwin, M. M., Estes, J. R. 2002. Molecular phylogeny of subtribe *Artemisiinae* (*Asteraceae*), including *Artemisia* and its allied and segregate genera. *BMC Evolutionary Biology*, 2: 17
- Weiss-Schneeweiss, H. & Gerald, M. Schneeweiss. 2013. Plant Genome Diversity Volume 2. Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes. *Springer*, 2: 209-223
- Wicke, S., Costa, A., Munoz, J. & Quandt, D. 2011. Restless 5S: the re-arrangement(s) and evolution of the nuclear ribosomal DNA in land plants. Molecular *Phylogenetics and Evolution*, 61: 321–332
- Wiegant, W., Kalle, J., Mullenders, L., Brookes, S., Hoovers, J.M.N., Dauwerse, J.G., van Ommen, G.J.B. & Raap, A.K. 1992. High-resolution In situ hybridization using DNA halo preparations. *Human Molecular Cenetics*, 1 (8): 587-591. https://doi.org/10.1093/hmg/1.8.587
- Wills, D. M. & Burk, J. M. 2006. Chloroplast DNA variation confirms a single origin of domesticated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity*, 97: 403–408
- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159
- **Wright, S. 1965.** The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19: 395–420
- **Zaitlin, D. & Pierce, A. J. 2010.** Nuclear DNA content in *Sinningia* (Gesneriaceae); intraspecific genome size variation and genome characterization in *S. speciosa. Genome*, Vol. 53, 2010
- **Zhou, G.Y., Yang, L., Li, C.L., Xu, W.H. & Chen, G.C. 2010**. Genetic diversity in endangered *Notopterygium forbesii* Boissieu based on intraspecies sequence variation of chloroplast DNA and implications for conservation. *Biochemical Systematics and Ecology*, 38: 911–916

- **Zimmer, E.A., Martin, S.L., Beverley, S.M., Kan, Y.W. & Wilson, A.C. 1980.** Rapid duplication and loss of genes coding for the alphachains of hemoglobin. *Proceedings National Academy of Sciences. USA*, 77: 2158–2162
- Zouari, S., Zouari, N., Fakhfakh, N., Bougatef, A., Ayadi, M. A., & Neffati N. 2010. Chemical composition and biological activities of a new essential oil chemotype of Tunisian *Artemisia herba-alba* Asso. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(10): 871-880

**Tableau 34 :** Situations géographiques et données climatiques des stations de prélèvement des échantillons d'*Artemisia herba-alba*.

Pop.	Localisation	Lat. N	Long.	Alt.	St. Météo Réf.	P (mm)	M (°C)	tm (°C)	ETP (mm)	P/ETP	Q3	Climat
P01	Ain Oussera (W.Djelfa)	35°20'	02°57'E	780 m	Ain Oussera <sup>1</sup>	224	38,1	1,81	1370	0,16	21,2	ASf
P02	Oued Sedar (W.Djelfa),	34°28'	03°16'E	1270 m	Djelfa <sup>1</sup>	307	33,8	-0,5	1144	0,27	30,6	ASff
P03	Ben-Hamed (W.Djelfa)	34°20'	02°53'E	1220 m	Taadmit <sup>2</sup>	237	34,5	0,5	1201	0,20	23,9	ASf
P04	El-Euch (W. B. Bou Arreridj)	35°52'	04°34'E	724 m	Borj B.Arréridj <sup>2</sup>	400	35,6	0,7	1246	0,32	39,3	SAIf
P05	El-Hamel (W.M'sila)	35°05'	04°06'E	960 m	Bou-saada <sup>2</sup>	237	37,1	3,7	1400	0,17	24,3	ASt
P06	Zerarka (W. M'sila)	35°35'	04°09'E	550 m	Zerarka <sup>3</sup>	242	30,8	4,2	1201	0,20	31,2	ASt
P07	Mohamed Boudiaf (W.M'sila)	34°52'	04°21′E	883 m	Mohamed Boudiaf <sup>3</sup>	210	33,7	1,6	1211	0,17	22,4	ASf
P08	BenS'rour (W.M'sila)	35°01'	04°35'E	700 m	BenS'rour <sup>3</sup>	200	33,6	2,2	1229	0,16	21,8	ASf
P09	Ouled Slimane (W.M'sila)	34°51'	04°49'E	600 m	Ouled Sliman <sup>3</sup>	186	35,3	2,5	1297	0,14	19,5	AIf
P10	Gueltet Sidi Saad (W. Laghouat)	34°15'	01°58'E	1210 m	Gueltet Sidi Saad <sup>3</sup>	276	32,3	0,8	1136	0,24	30,1	ASf
P11	Sebgag (W.Laghouat)	34°03'	01°53'E	1380 m	Aflou <sup>2</sup>	342	33	0	1133	0,30	35,5	SAIff
P12	Hammam soukhna (W.Sétif)	35° 57'	05°49'E	925 m	Hammam soukhna <sup>3</sup>	407	31,9	1,2	1136	0,36	45,5	SASf
P13	Bouaiche (W. Médéa)	35°34'	02°18'E	870 m	Khemisti <sup>2</sup>	443	35,5	1,3	1263	0,35	44,4	SASf
P14	Rechaiga (W.Tiaret)	35°26'	02°03'E	871 m	Rechaiga <sup>3</sup>	365	32,5	2,2	1191	0,31	41,3	SAIf
P15	Ain Dheb (W.Tiaret)	34°48'	01°34'E	1100 m	Ain Dheb <sup>3</sup>	318	30,9	0,9	1091	0,29	36,4	SAIf
P16	Sidi Abderrahmane (W.Tiaret)	34°39'	01°06'E	1050 m	Chehaima <sup>3</sup>	362	31,2	1,2	1112	0,33	41,4	SAIf
P17	Baniane (W.Biskra)	34°59'	06°02'E	545 m	M'chounech <sup>3</sup>	170	38,8	4,5	1486	0,11	17,0	AIt
P18	Tifelfal (W.Batna)	35°07'	06°14'E	845 m	Ghassira <sup>3</sup>	240	35,3	1,8	1273	0,19	24,6	ASf
P19	Arris (W. Batna)	35°09'	06°14'E	970 m	Arris <sup>2</sup>	345	32,1	0,8	1129	0,31	37,8	SAIf
P20	Zerzour (W.Batna)	35°06'	05°01'E	575 m	M'doukal <sup>2</sup>	196	37,1	3,6	1397	0,14	20,1	AIt
P26	Oum Ali (W. Tébéssa)	35°07'	08°16'E	1017 m	Oum Ali <sup>3</sup>	316	35,4	1,2	1256	0,25	31,7	ASf
P31	Taoura (W. Souk-Ahras)	36°02'	08°06'E	626 m	Sedrata <sup>2</sup>	465	33,9	0,3	1174	0,40	47,5	SASf
P33	Marhoum (W. S.B. Abbès)	34°28'	00°09'W	1202 m	Marhoum <sup>3</sup>	292	30,8	1,0	1091	0,27	33,6	SAIf
P37	Slim (W.M'sila)	35°00'	03°53'E	1020 m	Slim <sup>3</sup>	295	32,0	0,2	1105	0,27	31,8	ASf
P38	Ain Skhouna (W. Saida)	34°36'	00°40'E	1072 m	Ain Skhouna <sup>3</sup>	306	32,4	1,6	1167	0,26	34,1	SAIf
P39	Ras El-Maa (W. S.B. Abbès)	34°22'	01°02'W	1257 m	Ras El-Maa <sup>3</sup>	334	29,9	0,9	1057	0,32	39,5	SAIf
P40	El-Aricha(W. Tlemcen)	34°13'	01°15'W	1265 m	El-Aricha <sup>2</sup>	450	35,6	-1,5	1170	0,38	41,6	SAIff
P60	Tazrouk (W. Tamanrasset)	23°34'	06°00'E	1800 m	Tazrouk <sup>3</sup>	55	33,7	1,4	1205	0,05	5,8	HASf

Légende :

a) **Pop** = Population, **Lat** = Latitude, **Long** = Longitude, **Alt** = Altitude, **St. Météo. Réf** = Station météorologique de référence, **P** = Pluviosité moyenne annuelle en mm, **M** = Moyenne des maxima quotidiens du mois le plus chaud, **tm** = moyenne des minima quotidiens du mois le plus froid, **ETP** = Evapotranspiration (ETP = (tM+tm)/2 x 68,64 (Le Houérou 1995)), **P/ETP**= rapport pluvio-évapotranspiratoir (Indice d'aridité), Q3 = Quotient pluviothermique d'Emberger (1955), modifié par Stewart (1969) pour l'Algérie et le Maroc ; Q3 = 3,43 P/tM-tm, où tM et tm sont exprimés en °C.

b) **AS** = Aride Supérieur, **Al** = Aride Inférieur, **SAS** = Semi-Aride Supérieur, **SAI** = Semi-Aride Inférieur, **HAS** = Hyper-Aride Supérieur (saharien); **ff** = Hivers froids, **f** = Hivers frais, **t** = Hivers tempérés.

c) Chiffres en exposant; sources données climatiques (P, tM, tm): 1 = Bougoutaia (2009), 2 = Le Houérou (1995), 3 = (https://fr.climate-data.org)

#### Préparation de l'acéto-orcéine 2 %

- 2 g d'orcéine
- 45 ml d'acide acétique glacial
- 55 ml d'eau ultra pure

#### Tampon citrate 0,01 M à pH 4,6 : Quantité pour 100 ml.

- 25,5 ml d'acide citrique 1 M
- 24,5 ml de citrate tri-sodium 1 M
- Compléter à 100 ml avec de l'eau ultra pure

### Tampon 20×SSC (pH 7): Quantité pour 1 L

- 175,32g de chlorure de sodium (NaCl)
- 88,23g de citrate de tri-sodium di-hydrate (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)
- Compléter à 1 L avec de l'eau ultra pure
- Ajuster le pH à 7 avec l'HCl

#### Tampon 4×SSC: Quantité pour 1 L

- 200 ml de 20XSSC
- 800 ml de l'eau ultra pure

#### Tampon 4×SSCT (Tween): Quantité pour 1 L

- 2ml de Tween
- 200 ml de 20×SSC
- 798 ml de l'eau ultra pure

#### Tampon 2×SSC : Quantité pour 1 L

- 100 ml de 20×SSC
- 900 ml de l'eau ultra pure

#### Tampon 0,1×SSC: Quantité pour 300 ml

13 ml de 20×SSC

247 ml de l'eau ultra pure

#### Formamide 20%: Quantité pour 200 ml

- 160 ml de  $0.1 \times SSC$
- 40 ml de formamide

#### **Dextran sulfate 50%**

- 50 g de sulfate de dextrane
- 80 ml de l'eau ultra pure (traitée avec du Pyrocarbonate de diéthyle (DEPC))
- Agiter pendant une nuit à 4  $^{\circ}$  C. Le jour suivant, amener la solution à un volume final de 100 ml avec ultra pure

#### Pepsine 1%: Quantité pour 1 ml

- 5 μl de pepsine 1% (10 mg de pepsine stock dans 1ml d'eau ultra pure)
- 1000 μl de HCl 0,01 N

## CTAB concentré : pour 1L

- 100 ml de Tris 1 M, pH 8,0
- 280 ml de NaCl 5 M
- 40 ml d'EDTA 0,5 M
- 20 g de CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide)
- Compléter à 1 L avec H<sub>2</sub>0

#### CTAB prêt à l'emploi (120 ml pour une utilisation entre 2 et 3 jours)

- 20 ml de CTAB concentré
- 0,8 g de PVP (polyvinylpyrrolidone)
- 100 μl de β-mercaptoethanol

#### Tris 1M, pH 8,0: pour 1 L

- 121,1 g Tris (trishydroxyméthylaminométhane :C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)
- 700 ml de H<sub>2</sub>O ultra pure
- Dissoudre tris et porter à 900 ml
- Ajuster le pH à 8,0 avec HCl concentré (nécessite environ 50 ml)
- Compléter à 1 L avec H<sub>2</sub>O ultra pure

#### EDTA (Éthylène Diamine Tétra-Acétique) 0,5 M: pour 1 L

- 186,12 g d'EDTA
- 750 ml de H<sub>2</sub>O ultra pure

- Ajouter environ 20 g de pastilles de NaOH
- Ajouter légèrement plus de NaOH jusqu'à ce que le pH soit de 8,0 EDTA ne se dissoudra pas jusqu'à ce que le pH soit proche de 8,0

### NaCl 5M: pou 1 L

- 292,2 g de NaCl
- 700 ml de H<sub>2</sub>O ultra pure
- Dissoudre et compléter à 1 L avec H<sub>2</sub>O ultra pure.

#### Acétate d'Ammonium 7,5 M: pour 250 ml

- 144,5 g d'acétate d'ammonium
- Porter au volume avec H<sub>2</sub>O ultra pure.

## Gel d'agarose 1,2 % : Quantité pour 200 ml

- 2,4 g d'agarose
- 20 ml de tampon 10×TBE
- 180 ml d'eau ultra pure

#### Tampon 10×TBE (pH: 8,8 - 9,0): Quantité pour 1 L

- 162 g de Tris
- 27,5 g d'acide borique
- 9,5 g de Na<sub>2</sub>EDTA 2H<sub>2</sub>O

#### Tampon 1×TBE: Quantité pour 1 L

- 100 ml de 1×TBE
- Compléter à 1 litre avec l'eau ultra pure.

#### Tampon TE (pH 8): Quantité pour 1 L

- 10 ml de Tris stock (1 M)
- 4 ml d'EDTA stock (0,25 M)
- Compléter à 1 litre avec de l'eau ultra pure.

**Tableau 35 :** Données morphométriques et types chromosomiques du cytotype diploïde (2n = 18) de la population P17 d'Artemisia herba-alba

Paire	Bl (µm)	Bc (µm)	Lt (µm)	Ltr%	r=Bl/Bc	IC%	Type	Sat.	IAs%
1	2,18±0,15	2,09±0,11	4,28±0,13	12,27	1,04	48,93	m	-	
2	2,33±0,35	$1,76\pm0,40$	$4,10\pm0,38$	11,75	1,32	43,06	m	-	
3	2,40±0,23	$1,60\pm0,08$	$3,99\pm0,15$	11,45	1,50	40,07	m		
4	2,20±0,28	1,76±0,08	3,95±0,18	11,35	1,25	44,48	m	-	
5	2,60±0,58	1,31±0,33	3,90±0,45	11,20	2,08	33,51	sm	-	
6	2,36±0,31	1,47±0,10	$3,83\pm0,20$	11,00	1,60	40,39	m	-	
7	1,99±0,29	1,76±0,31	$3,75\pm0,30$	10,77	1,13	46,88	m	-	
8	1,95±0,58	1,79±0,53	3,74±0,56	10,73	1,09	47,89	m	-	
9	1,93±0,26	1,38±0,33	3,30±0,30	9,48	1,40	41,70	m		
Total	19,93	14,92	34,85	100,00				-	57.19

**Légende :** Bl = Bras long ; Bc = Bras court ; Lt = Longueur total du chromosome ; Ltr = Longueur relative du chromosome ; r = Rapport bras long / bras court ; IC = Indice centromérique ; Sat = Satellite ; IAs = Indice d'asymétrie).

**Tableau 36 :** Données morphométriques et types chromosomiques du cytotype diploïde (2n = 18) de la population P6 d'*Artemisia herba-alba* 

Paire	Bl (µm)	Вс (µm)	Lt (µm)	Ltr %	r=Bl/Bc	IC%	Type	Sat.	IAs%
1	2,86±0,15	1,93±0,11	4,79±0,24	11,78	1,48	40,00	m	-	
2	2,56±0,22	2,03±0,12	$4,59\pm0,31$	11,29	1,26	43,68	m	-	
3	2,33±0,05	2,26±0,11	4,59±0,15	11,28	1,03	48,93	m	-	
4	2,89±0,15	1,66±0,17	4,55±0,30	11,17	1,75	35,63	sm	-	
5	2,60±0,31	1,92±0,18	$4,54\pm0,47$	11,15	1,36	42,12	m	-	
6	2,44±0,10	$2,10\pm0,17$	$4,54\pm0,27$	11,15	1,17	45,74	m	-	
7	2,31±0,25	2,12±0,19	4,43±0,43	10,90	1,09	47,55	m	-	
8	2,95±0,16	1,42±0,10	4,37±0,25	10,75	2,09	32,00	sm	-	
9	3,10±0,11	1,19±0,20	4,29±0,30	10,53	2,65	26,95	sm	-	
Total	24.05	16.64	40.69	100 %	-				59.10

**Tableau 37 :** Données morphométriques et types chromosomiques du cytotype tétraploïde (2n = 36) de la population P26 d'*Artemisia herba-alba* 

Paire	Bl (µm)	Вс (µm)	Lt (µm)	Ltr%	r=Bl/Bc	IC%	Type	Sat.	IAs%
1	1,61±0,27	1,60±0,26	3,21±0,26	6,23	1,01	49,78	m	-	
2	$1,57\pm0,15$	$1,51\pm0,15$	$3,07\pm0,15$	5,96	1,04	48,98	m	-	
3	1,85±0,37	1,20±0,17	3,05±0,27	5,91	1,55	39,27	sm	-	
4	$1,62\pm0,39$	$1,42\pm0,32$	$3,04\pm0,35$	5,89	1,14	46,77	m	-	
5	$1,77\pm0,21$	$1,25\pm0,19$	$3,02\pm0,20$	5,86	1,41	41,44	m	-	
6	$1,60\pm0,27$	$1,33\pm0,22$	2,93±0,24	5,68	1,20	45,53	m	-	
7	$1,61\pm0,35$	$1,31\pm0,22$	$2,92\pm0,28$	5,67	1,23	44,77	m	-	
8	1,79±0,30	1,13±0,13	2,92±0,21	5,66	1,58	38,74	sm	-	
9	1,88±0,19	1,04±0,19	2,91±0,19	5,65	1,80	35,66	sm	-	
10	$1,73\pm0,16$	1,17±0,16	2,90±0,16	5,62	1,47	40,42	m	-	
11	$1,50\pm0,15$	$1,38\pm0,14$	$2,89\pm0,14$	5,60	1,08	47,98	m	-	
12	$1,52\pm0,29$	$1,38\pm0,19$	$2,89\pm0,24$	5,61	1,10	47,55	m	-	
13	1,98±0,24	0,88±0,15	2,86±0,20	5,55	2,24	30,88	sm	-	
14	1,86±0,24	0,94±0,19	2,79±0,22	5,42	1,98	33,60	sm	-	
15	$1,54\pm0,42$	1,16±0,28	$2,70\pm0,35$	5,23	1,32	43,07	m	-	
16	$1,30\pm0,18$	1,23±0,11	2,53±0,14	4,91	1,06	48,52	m	-	
17	$1,40\pm0,27$	1,08±0,14	2,49±0,20	4,82	1,30	43,53	m	-	
18	1,53±0,27	0,90±0,21	2,44±0,24	4,73	1,70	37,08	sm	-	
Total	29,65	21,92	51,56	100,00					57,50

**Tableau 38 :** Données morphométrique et types chromosomiques du cytotype tétraploïde (2n = 36) de la population P6 d'*Artemisia herba-alba* 

Paire	Bl (µm)	Вс (µm)	Lt (µm)	Ltr %	r=Bl/Bc	IC%	Type	Sat.	I.as.%
1	2,52±0,05	2,15±0,06	4,68±0,11	6,15	1,17	45,94	m	-	
2	2,56±0,01	$2,04\pm0,00$	$4,60\pm0,01$	6,04	1,25	44,00	m	-	
3	2,33±0,03	2,23±0,06	4,55±0,09	5,99	1,04	48,87	m	-	
4	2,37±0,10	2,15±0,09	4,52±0,19	5,94	1,10	47,77	m	-	
5	2,43±0,14	2,01±0,07	4,44±0,21	5,84	1,21	45,44	m	-	
6	2,65±0,18	1,69±0,00	4,34±0,19	5,71	1,56	39,00	sm	-	
7	$2,29\pm0,05$	2,01±0,09	4,30±0,15	5,65	1,15	46,64	m	-	
8	2,52±0,00	1,77±0,09	4,30±0,09	5,65	1,42	41,00	m	-	
9	2,47±0,08	1,81±0,10	4,29±0,02	5,63	1,37	42,50	m	-	
10	2,61±0,23	1,63±0,25	4,24±0,48	5,57	1,61	38,59	sm	-	
11	2,86±0,49	1,36±0,02	4,22±0,47	5,55	2,10	32,50	sm	-	
12	2,19±0,16	1,95±0,13	4,14±0,29	5,44	1,12	47,00	m	-	
13	2,10±0,15	1,94±0,11	4,03±0,26	5,30	1,08	47,85	m	-	
14	2,00±0,41	1,99±0,42	3,99±0,83	5,24	1,01	49,94	m	-	
15	2,57±0,20	1,40±0,02	3,97±0,18	5,22	1,84	35,50	sm	-	
16	2,84±0,41	1,04±0,05	3,88±0,36	5,09	2,75	27,16	sm	-	
17	2,16±0,15	1,69±0,09	3,86±0,24	5,07	1,27	44,00	m	-	
18	2,33±0,40	1,41±0,40	3,74±0,80	4,92	1,69	37,68	sm	-	
Total	43.81	32.27	76.08	100 %	-				57.58

**Tableau 39 :** Test de Bonferroni des groupes homogènes dans les populations diploïdes d'*Artemisia herba-alba* selon les valeurs de la variable 2C (pg), ( $\alpha = 0.05$ )

Pop	2C	1	2
P7	5,39		****
P5	5,54		****
P9	5,64		****
P6	6,83	****	
P17	6,84	****	
P60	6,93	****	
P18	7,01	****	
P8	7,18	****	

**Tableau 40 :** Test de Bonferroni des groupes homogènes dans les populations tétraploïdes d'*Artemisia herba-alba* selon les valeurs de la variable 2C (pg), ( $\alpha$  = 0,01)

Pop	2C	1	2	3
P10	11,60	****		
P26	11,68	****		
P14	12,07	****	****	
P38	12,36	****	****	****
Р3	12,42	****	****	
P19	12,51	****	****	****
P31	12,54	****	****	****
P6	12,60	****	****	****
P1	12,63	****	****	****
P33	12,68	****	****	****
P39	12,72	****	****	****
P5	12,76	****	****	****
P37	12,88	****	****	****
P2	13,07		****	****
P13	13,10		****	****
P12	13,12		****	****
P16	13,18		****	****
P40	13,24		****	****
P15	13,29		****	****
P4	13,31		****	****
P20	13,35		****	****
P11	13,84			****

**Tableau 41 :** Test de Bonferroni des groupes homogènes dans l'ensemble des populations d'*Artemisia herba-alba* selon les valeurs de la variable 1Cx (pg), ( $\alpha = 0.01$ )

Pop	1Cx	1	2	3	4	5	6	7	8	9
P7	2,70	****								
P5	2,77	****	****	****						
P9	2,82	****	****							
P10	2,91	****	****	****	****					
P26	2,92	****	****	****	****		****			
P14	3,02	****	****	****	****	****	****			
P38	3,09	****	****	****	****	****	****	****	****	
Р3	3,10		****	****	****	****	****		****	
P19	3,13	****	****	****	****	****	****	****	****	
P31	3,13		****	****	****	****	****	****	****	
P6	3,15	****	****	****	****	****	****	****	****	****
P1	3,16		****	****	****	****	****	****	****	
P33	3,17		****	****	****	****	****	****	****	
P39	3,18		****	****	****	****	****	****	****	
P5	3,19			****	****	****	****	****	****	
P37	3,22			****	****	****	****	****	****	****
P2	3,27			****	****	****	****	****	****	****
P13	3,27				****	****	****	****	****	****
P12	3,28					****		****	****	****
P16	3,30					****	****	****	****	****
P40	3,31					****	****	****	****	****
P15	3,32					****		****	****	****
P4	3,33					****		****	****	****
P20	3,34					****		****	****	****
P6	3,42							****		****
P17	3,42							****	****	****
P11	3,46							****	****	****
P60	3,47							****	****	****
P18	3,50							****		****
P8	3,59									****

**Tableau 42 :** Test de Bonferroni des groupes homogène des niveaux de ploïdie d'*Artemisia herba-alba* selon les valeurs de la variables 1Cx (pg), ( $\alpha = 0.05$ )

Niveau de ploïdie	1Cx (pg)	Groupe 1	Groupe 2
P. tétraploïdes	3,20	****	
P. diploïdes	3,29		****

# Liste des publications

- Bougoutaia, Y., Garcia, S., Garnatje, T., Kaid-Harche, M. & Vallès, J. 2016. Genome size, chromosome number, and rDNA rganisation in Algerian populations of *Artemisia herba-alba* (Asteraceae), a basic plant for animal feeding facing overgrazing erosion. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 73(2): e043 2016. ISSN: 0211-1322
- Bougoutaia, Y., Nedjimi, B., Adda, A. & Kaid-Harche, M. 2014. Etude caryologique et moléculaire de deux populations algériennes d'*Artemisia herba alba* Asso. (Asteraceae). *Revue* Agriculture, 08 (2014) 21 – 25
- Maghni, B., Bougoutaia, Y., Abderrabi, K., Adda, A. & Merah, O. 2016. Optimization of DNA Extraction and PCR Conditions for Genetic Diversity Study in *Artemisia herba-alba* Asso. from Algeria. *Scientific Journal of Genetics and Gene Therapy*, 2(1): 010-012