

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE 8 Mai 1945 GUELMA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES  
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

DEPARTEMENT DE SNV



Mémoire De Master

Domaine : Science de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité/Option : Biologie Moléculaire et Cellulaire : Biologie Moléculaire  
des Procaryotes

---

**Thème: Amélioration d'une technique d'extraction  
d'ADN d'un annélide polychète**

**« *Perinereis cultrifera* »**

---

**Présenté par :**

**Boualleg Khadidja.**

**Zeghdoudi Ahlem.**

**Membres de jury :**

**Présidente : Mme. KAIDI S.**

**M.A.B Université de Guelma**

**Encadreur : Mr. YOUNSI M.**

**M.A.B. Université de Guelma**

**Examineur : Mr. ADRAR N.**

**M.A.B. Université de Guelma**

**2014/ 2015**

# *Remerciement*

*Nous remercions notre DIEU le tout puissant pour avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer notre projet de fin d'étude.*

*Nous tenons à remercier vivement notre encadreur YOUNSI MOURAD ses précieux conseil qu'il nous a apportés durant la réalisation de ce travail.*

*Nous remercions les membres de jury d'avoir accepté d'examiner et d'évaluer notre travail.*

*Nous exprimons également nos gratitude à tous les enseignants qui ont corroboré à notre formation aussi bien primaire qu'universitaire.*

*Nous remerciments vont enfin à l'endroit de tous ceux qui de près ou de loin n'ont ménagé aucun effort pour la réalisation de ce travail.*

**Remerciement.**

**Sommaires.**

**Liste des figures.**

**Liste des abréviations.**

### *Sommaires :*

**Introduction.....1**

### **Chapitre I: Généralité.**

#### **Partie I: Les Annélides.**

I.	Définition des annélides .....	5
II.	Les classes des annélides .....	5
II.1.	Classe des Oligochètes :.....	6
II.1.1.	Définition :.....	6
II.1.2.	Morphologie : .....	6
II.1.3.	Biologie : .....	7
II.2.	Classe des Achètes ou Hirudinées :.....	7
II.2.1.	Définition :.....	7
II.2.2.	Morphologie : .....	7
II.2.3.	Biologie : .....	8
II.3.	Classe des polychètes :.....	9
II.3.1.	Définition :.....	9
II.3.2.	Morphologie : .....	11
III.	<i>Perinereis cultrifera</i> .....	11
III.1.	Organisation générale des <i>Perinereis cultrifera</i> : .....	12
III.1.2.	Le tronc ou soma :.....	13
II.1.3.	Le pygidium ou telson :.....	14

#### **Partie II: Écologie de *Perinereis cultrifera*.**

I.	Identification de l'espèce <i>Perinereis cultrifera</i> .....	15
II.	Mode de reproduction et âge de maturité .....	15
II.1.	Développement ovocytaire :.....	17
III.	Cycle de développement .....	17

**Partie III: L'ADN.**

I. Structure et caractéristiques de l'ADN .....	19
I.1. Les constituants de L'ADN : .....	20
I.1.1. Les bases: .....	20
I.1.2. Les nucléosides : .....	21
I.1.3. Les nucléotides : .....	21
I.1.4. Liaisons phosphodiéstères : .....	22
I.2. Les caractéristiques des deux chaînes d'ADN : .....	23
I.2.1. Antiparallèles : .....	23
I.2.2. Complémentaires : .....	23
I.2.3. Chaînes hélicoïdales : .....	24
II. Les différentes formes d'ADN .....	24
III. Propriété physico-chimiques des acides nucléiques.....	24
III.1. La Stabilité : .....	24
III.2. Effet de l'acide : .....	25
III.3. Effet de l'alcali : .....	25
III.4. Dénaturation chimique : .....	25
III.5. La viscosité : .....	26
III.6. La densité de flottabilité : .....	26
IV. Les fonctions de l'ADN : .....	26
V. Extraction.....	27
V.1. Définition : .....	27
VI. Les principales étapes de l'extraction de l'ADN.....	28
VI.1. Fragmentation des tissus : .....	28
VI.2. Séparation de l'ADN des autres constituants : .....	29
VI.3. Récupération de l'ADN : .....	29

**Chapitre II: Partir Expérimentale.****Partie I: Matériels et Méthode.**

I. Présentation des sites.....	30
II. Mode de récolte .....	32
III. Mesure de poids et précision de sexe .....	32
IV. Relation entre poids frais essuyé et poids partiel formolé .....	33

V. Distribution de fréquence de taille.....	34
VI. Extraction d'ADN a partir de la partie médiane de <i>Perinereis cultrifera</i> .....	35
VII. Quantification de l'ADN par spectrophotométrie.....	39

**Partie II: Résultats et Discussion.**

I. Relation entre la quantité d'ADN et le sexe des individus .....	40
II. Relation d'allométrie entre la quantité d'ADN et le poids des individus .....	41
III. Efficacité de la méthode de récolte.....	41
IV. Poids des échantillons et quantité d'ADN.....	42
V. Pureté d'ADN .....	43
VI. La durée du protocole.....	44
<b>Conclusion.....</b>	<b>46</b>

**Références Bibliographique.**

**Annexe.**

**Glossaire.**

**Résumé.**

## Liste des figures

Figure 1 :photographie représente la structure générale de verre de terre.....	6
Figure 2:photographie représente la structure générale des Hirudinées .....	8
Figure 3: photographie représente la structure générale des Polychètes .....	9
Figure 4: photographie de Perinereis cultrifera. ....	12
Figure 5 : Détail de la partie antérieure de Perinereis cultrifera.....	13
Figure 6: schéma représente Le pygidium de perenireis cultrifera .....	14
Figure 7:Mode de reproduction chez les Néréidiens .....	16
Figure 8: Cycle de vie de Perinereis cultrifera .....	18
Figure 9: La structure de l'ADN.....	20
Figure 10:Les bases azotées .....	20
Figure 11: Structure du nucléoside.....	21
Figure 12: Structure du nucléotide .....	22
Figure 13: La liaison phosphodiéstères .....	22
Figure 14: Procédés couramment utilisés pour extraire les acides nucléiques.....	28
Figure 15:Site d'échantillonnage de Perinereis cultifera sur le littorale nord Est Algérien à El-Kala prise le 11 avril 2015.....	30
Figure 16: Site d'échantillonnage de Perinereis cultifera sur le littorale nord Est Algérien à Annaba « La Caroube » prise le 11 avril 2015. ....	31
Figure 17: Site d'échantillonnage de Perinereis cultifera sur le littorale nord ouest Algérien à honaine tlemcen prise le 01 avril 2015. ....	31
Figure 18: Les bouteilles des échantillons.....	32
Figure 19: La mesure de poids et l'identification de sexe. ....	33
Figure 20: Division de la partie médiane de l'individu numéro 01.....	33
Figure 21: Relation entre poids partiel formolé essuyé et poids frais essuyé.....	34
Figure 22: Histogramme de distribution de fréquence du rang de cassure.....	35
Figure 23: Préparation du tampon d'Extraction. ....	36
Figure 24: Agitation du tampon.....	37
Figure 25: Incubation du Tampon et les échantillons.....	37
Figure 26: Les étapes de l'extraction.....	38
Figure 27: Histogramme de la quantité d'ADN selon le sexe des individus.....	40
Figure 28: Courbe de corrélation entre la quantité d'ADN et le poids des individus.....	41
Figure 29: Histogramme de la quantité d'ADN selon mode de récolte et conditionnement.....	42

Figure 30: Histogramme de la quantité d'ADN selon le poids des échantillons.....43

Figure 31: Histogramme de pureté d'ADN selon les poids des échantillons des régions médiane.....44

Figure 32: Histogramme de la quantité d'ADN selon la durée de protocole.....45

## A

**A** : Adénine.

**ADN** : acide désoxyribonucléique.

**ARN** : acide ribonucléique.

## C

**C** : Cytosine.

**CIA** : Chloroforme Iso-Amyle.

## E

**EDTA** : Éthylène Diamine Tétracétate ; chélateur (fixateur) d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ .

## G

**G** : Guanine.

## H

**HCl** : Acide chlorhydrique.

**Liaison H** : Liaison hydrogène.

## N

**Na Cl** : Chlorure de Sodium.

## P

***P. cultrifera*** : *Perinereis cultrifera*.

**PCR** : Polymerase chain reaction.

## S

**SDS** : Dodécyl sulfate de sodium.

## T

**T** : Thymine.

**Tris** : Tris (Hydroxyméthyl) aminométhane.





# Introduction

Le terme « biodiversité » fut utilisé pour la première fois par l'écologiste américain W. Rosen en 1985 et par la suite, largement disséminé par l'entomologiste américain E. O. Wilson. Que signifie-t-il ? Des chapitres entiers ont été consacrés à la présentation et l'explication de ce concept, de façon simple, c'est la variété en quantité et répartition de la vie sur terre. La biodiversité a été considérée depuis longtemps comme de simples inventaires de la diversité biologique. Actuellement, cette dernière est de plus en plus incluse dans les évaluations environnementales, grâce à l'utilisation d'indicateurs destinés aux travaux de protection de la nature et de détection de la pollution. L'étude de la biodiversité marine au sein des espèces et entre les espèces, ainsi que celle des écosystèmes sera d'une grande utilité pour ce qui est des espèces d'intérêt commerciale ou écologique ou encore pour la protection de la nature (**L. Rouabah, 2007**).

La biodiversité connaît depuis plusieurs décennies une altération importante due au changement climatique global (**Walther et al., 2002**) mais également aux perturbations de l'environnement liées aux activités humaines (**Chapinet et al., 2000 ; McKinney, 1998**).

Les connaissances sur la biodiversité terrestre sont toutefois bien plus grandes que pour les milieux aquatiques, moins visibles. Tous les scientifiques s'accordent sur l'insuffisance des données scientifiques existantes pour une conservation efficace et une gestion rationnelle de diverses composantes de la diversité biologique marine. Le gros de cette diversité est invisible, surtout parce que, dans leur immense majorité, ces organismes vivants sont trop petits et cachés dans la végétation, dans le sol, dans les récifs coralliens, dans les vases et les sables recouvrant le fond des océans, des lacs et des rivières. Dans ce milieu marin, ce sont les récifs coralliens qui ont la diversité la plus élevée, suivi par les vers marins qui participent d'une façon non négligeable à cette biodiversité des écosystèmes marins, dont les annélides représentent une forte proportion.

Cette diversité terrestre et marine a poussé la porte pour la nécessité de la taxonomie, branche de la biologie qui a pour but de nommer et de classer les espèces (**Kolb et Whishaw, 2002**), ou encore, c'est la science qui classe les êtres vivants en fonction de leurs relations de parenté, elle est née en 1758 avec la publication de la 10<sup>e</sup> édition de l'ouvrage d'un médecin botaniste suédois, Carl Von Linné qui désirait établir l'ordre qui gouverne la diversité des vivants. Ainsi une espèce est définie par deux mots latins: un nom de genre qu'elle partage avec les espèces voisines et un adjectif ou substantif qui la qualifie (**Véronique Gilliquet, 2009**).

L'Algérie dispose d'une large façade maritime qui se situe au cœur de la Méditerranée, et s'étend sur plus de 1200 Km, du point de vue écologique le littoral Algérien est riche et diversifié, sa façade maritime longue alterne rivage rocheux, plages sableuses et zones humides, toutefois il est caractérisé par une forte concentration de la population (40 % de cette dernière est concentré sur le littoral) (**Taleb et al., 2007**).

En 1763 Adanson a formulé pour la première fois les principes de la taxonomie numérique, deux cents ans plus tard exactement Sokal et Sneath (1963) publient leur travail fondamental "Principles of Numerical Taxonomy", qui ouvre une nouvelle ère dans le domaine des classifications.

Les connaissances actuelles des fonds côtiers (0 à 200 m de profondeur) reflètent la présence d'une macrofaune dont la diversité est très appréciable. Contribuant avec un grand pourcentage à cette diversité, les vers marins sont un groupe zoologique fortement dominant.

Les Annélides Polychètes sont l'un des taxons les plus abondant dans les communautés benthiques en terme de richesse numérique et biodiversité (**Gözler et al., 2009**). Ils sont bien représentés dans la plupart des milieux marins et estuariens, à la fois en nombre d'individus et d'espèces et constituent un pourcentage significatif de la diversité totale de la macrofaune benthique (**Hutchings, 1998**).

Les annélides, embranchement groupant les vers annelés, et renfermant environ 9000 espèces. Ils doivent leur nom à la segmentation bien visible de leur corps.

Les trois principales classes de cet embranchement sont :

- les polychètes (le néréis, l'arénicole) environ 5300 espèces, pour la plupart marins et souvent luminescents, ils portent de nombreuses soies sur chaque segment.
- les oligochètes (vers de terre ou lombrics) environ 3000 espèces, avec une majorité d'espèces vivant dans les eaux douces ou dans le sol comme le lombric, ils n'ont que quelques soies par segment.
- les achètes (sangsues) environ 300 espèces, majoritairement dulcicoles comme les sangsues, mais dont certaines formes sont marines ou terrestres, ils n'ont pas de soies.

L'annélide polychète *Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840) fait partie de la famille des *Nereididae*. C'est un ver de couleur bronze vert avec un rouge clair dorsal, on le trouve

parmi les Rhodophycées, algues rouges meublant les trottoirs et banquettes. Ce dernier est essentiellement utilisé en tant qu'appât pour la pêche sportive à la ligne et pour la pêche récréative. *Perinereis cultrifera* est largement exploité sur le littoral Est-Algérien et il est employé pour la pêche à la daurade (*Dicentrarchus labrax*) et la sole (*Solea solea*) et d'autres variétés de poissons tels que le pageot, le petit loup et le marbré (**Rouabah, 2003**).

Ces organismes interviennent de façon importante dans la décomposition et le recyclage de la matière organique à l'intérieur des sédiments. Ainsi certaines espèces, de par leur intense activité galéicole et tubicole exercent une action sur l'environnement sédimentaire et sur les populations animales et végétales qui y vivent. La bioturbation ainsi générée influence le transport des particules sédimentaires, l'oxygénation et le contenu en eau des sédiments, les échanges de la matière entre la colonne d'eau et les sédiments, le métabolisme de la matière organique et modifie la chimie des eaux interstitielles (**Lopez et Levinton, 1987**).

Les potentialités d'utilisation des annélides polychètes sont multiples dans le secteur industriel (production d'appâts de pêche, production d'aliments pour les animaux d'élevage, traitement des eaux usées) que dans le domaine environnemental (test d'écotoxicité, bio surveillance du milieu marin).

La synthèse des données portant sur *Perinereis cultrifera*, révèle que la période et le mode de reproduction (atoquie ou épitoquie), l'âge à maturité et les paramètres biométriques varient fortement selon la localisation géographique des populations (**Rouabah, 2003**).

La taxonomie numérique est utilisée aux différents domaines comme la biologie pour l'analyse et la classification automatique des espèces, cette taxonomie numérique est strictement liée à la phyllogénétique, filière de la génétique qui a pour objectif de comprendre et de classer les liens de parenté entre les espèces sur un plan moléculaire et pour toutes étude de phyllogénétique l'ADN est la molécule mère, ainsi son extraction et sa purification sont les premières étapes dans la plupart des études de biologie moléculaire et dans toutes les techniques d'ADN recombinant (**Somma, 2002**). L'extraction de l'ADN est une technique qui isole de l'ADN à partir d'une cellule en qualité et en quantité suffisante pour permettre son analyse [1].

Il est important de comparer au plan génétique les différents morphotypes présents sur l'ensemble de l'aire de répartition géographique. C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail sur technique d'extraction d'ADN de différentes parties du corps de l'espèce étudiée afin de les comparer et pouvoir lancer au futur une PCR et le séquençage des gènes marqueurs.

L'évaluation de la diversité génétique des ressources naturelles est un préalable indispensable à la définition des stratégies de leur gestion ou leur amélioration génétique. L'application de la biologie moléculaire pour étudier la variabilité génétique des animaux est restée pendant longtemps limitée par les difficultés d'extraction de l'ADN.

C'est pour cette raison nous avons porté des modifications sur le protocole d'extraction d'ADN. Ces ajustements nous ont permis de mettre au point une méthode plus efficace pour l'extraction de l'ADN.



# Chapitre I : Généralités



# Partie I :

# Les Annélides

Les annélides ou vers annelés conservent, au moins chez les polychètes, la structure schématique considérée comme archaïque des protostomiens ; chez les oligochètes cette disposition s'estompe (fusion des cavités cœlomiques symétrique) alors que chez les achètes ou hirudinées les massifs mésodermique se dissocient précocement forment un abondant tissu de remplissage (parenchymes) qui oblitère la quasi-totalité du cœlome ; dans cette classe les cavités génitales constituent les seuls vestiges des cavités cœlomiques (**Beaumont et Cassier, 2004**).

*Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840), annélide polychète de la famille des *Nereididae*. L'appellation *Perinereis cultrifera* vient de la capacité du ver à creuser des galeries dans la roche. Du latin *Perinereis* qui désigne le genre qui ressemble aux annélides, car c'est un ver annelé doté de pattes et *cultrifera* qui vient de couteau ou couper dans la roche (**Younsi, 2006**).

## I. Définition des annélides

Les annélides appelés encore vers polymères, ont un corps à symétrie bilatérale, divisé en segments successif, ou métamère, par des cloisons (disséminent) (**Pierre et al., 1970**).

La segmentation des annélides est mésodermique mais associée à une segmentation nette de l'épiderme et du cordon nerveux ventral. Les extrémités du corps, prostomium et pygidium, ne sont pas considérés comme des segments (**Claude, 1999**).

Les annélides dont les segments portent des expansions latérales ou parapodes sur lesquels s'insèrent des soies chitineuses plus ou moins nombreuses et complexes.

## II. Les classes des annélides

L'embranchement des annélides groupes l'ensemble des vers annelé, qu'ils soient aquatique (arénicole, sangsue) ou terrestres (vers de terre). Bien que leur taille, leur morphologie et leur biologie soient extrêmement variées, ils ont cependant en commun les caractères suivants :

- ❖ une cavité générale ou cœlomes.
- ❖ Un corps divisé en segments ou métamères, primitivement semblable à l'exception du premier et du dernier, plus ou moins différenciés.
- ❖ Le tube digestif et la chaîne nerveuse ventrale traversent l'ensemble des métamères.
- ❖ Enfin un œuf présentant une segmentation de type spiral [02].



On a distingué trois grands ensembles d'annélides : les oligochètes, les hirudinées (sangues) et les polychètes (**Claude, 1999**).

## II.1. Classe des Oligochètes :

### II.1.1. Définition :

Annélides Clitellates, terrestres ou dulcicoles (exceptionnellement marins), hermaphrodites. Le prostomium réduit ne porte aucun organe sensoriel saillant. Les métamères dépourvus de parapodes sont garnis de soies peu nombreuses, simples, en forme de crochet, directement implantées dans le tégument (**Beaumont et Cassier, 2004**).

La systématique des Oligochètes a été remaniée par Brinkhurst (1986). Deux « Familles », rangées autrefois dans la classe des Oligochètes en ont été retirées ; ce sont les Aeolosomatidae et les Branchiobdellidae (**Henri *et al.*, 2010**) .

### II.1.2. Morphologie :

La classe des Oligochètes telle qu'elle vient d'être définie, correspond à des Annélides caractérisés fondamentalement par la présence de deux paires de faisceaux de soies : une paire latéro-dorsale et une paire latéro-ventrale. Très exceptionnellement, il peut y avoir absence totale de soie comme cela est le cas chez un Enchytraeidae hyporhéique du genre *Achaeta*. Chez les individus sexuellement matures [Fig. 01], il y a présence d'un épaissement glandulaire, le clitellum, qui est en relation avec l'appareil génital.



**Figure 1** : Photographie représente la structure générale de verre de terre [3].

### II.1.3. Biologie :

Les Oligochètes sont hermaphrodites. La reproduction sexuée aboutit à la production de cocons libres ou fixés. Le développement est de type direct. Du cocon sortent des Oligochètes miniatures avec en général un nombre réduit de segment.

La reproduction peut être asexuée chez les Naididae, certains Tubificidae et Lumbriculidae. Lorsqu'il y a reproduction asexuée, elle se fait par scissiparité avec, soit fragmentation ; soit paratomie.

La croissance des Oligochètes résulte de deux processus : par formation de nouveaux segments et leur agrandissement ultérieur. Chez certains Oligochètes (notamment les Enchytraeidae), l'accroissement peut se poursuivre ainsi et un individu âgé aura un très grand nombre de segments. Chez les Naididae, notamment lorsque le nombre de segments atteint un certain seuil, il y a paratomie.

La durée de vie varie de quelques semaines, à quelques mois, voire quelques années, pour certains Tubificidae. Chez les Naididae, une seule génération par an ; chez les Tubificidae, la maturité est atteinte entre six mois et deux ans ; chez les Lumbriculidae, le cycle vital est sur deux ans (**Henri *et al.*, 2010**).

## II.2. Classe des Achètes ou Hirudinées :

### II.2.1. Définition :

Les sangsues sont présentes aussi bien en milieu marin qu'en eau douce. Dans les pays tropicaux, certaines espèces sont terrestres (**Henri *et al.*, 2010**). Leur corps aplati ventralement, comporte un nombre défini et constant de métamères (pas de croissance pygidiale postembryonnaire) subdivisés extérieurement en un nombre variable d'anneaux de parapodes et de soies (à l'exception des Acanthobdellidae). Les Hirudinées possèdent 2 ventouses ; la ventouse antérieure, péribuccale, sert à la fixation et à la succion ; la ventouse postérieure, ventrale par rapport à l'anus, est un simple organe de fixation. La cavité coelomique est comblée par un tissu mésenchymateux (**Beaumont et Cassier, 2004**).

### II.2.2. Morphologie :

Organisme vermiforme, annelé [Fig. 02], aplati dorso-ventralement, doté d'une symétrie bilatérale. Le corps long de 10 cm environ en extension ne mesure que 5-6 cm en

état de contraction. Il est sur la face dorsale, teinté de brun ou de gris-vert foncé et veiné de 6 lignes longitudinales noirâtres ; la face ventrale vert pâle ou jaunâtre présente 2 bandes longitudinales jaune orangé. Chacune des extrémités est pourvue d'une ventouse ; la ventouse buccale entoure la bouche, la ventouse postérieure plus grand, imperforée est ventrale par rapport à l'anus (**Beaumont et Cassier, 2004**).

Les Achètes sont hermaphrodites ; les orifices génitaux sont situés ventralement au niveau du tiers antérieur ; l'orifice génital mâle est situé en avant de l'orifice génital femelle. Toutes les sangsues ont des yeux ; leur nombre varie de deux à dix (**Henri et al., 2010**).



**Figure 2:** photographie représente la structure générale des Hirudinées[03].

### II.2.3. Biologie :

La reproduction est exclusivement sexuée et croisée. Après la reproduction, il y a formation d'un cocon dans lequel les œufs sont déposés. Le développement est de type direct. Chez les Piscicolidae et les Erpobdellidae, le cocon à paroi relativement épaisse est collé au substrat, chez les Glossiphoniidae le cocon est à paroi mince ; il reste fixé sur la face ventrale du géniteur qui va transporter ce cocon jusqu'à éclosion des jeunes sangsues. À partir de l'éclosion, la croissance des jeunes sangsues est relativement rapide et la reproduction prend place avant la fin de la première année. La durée de vie peut être de plusieurs années, pour des espèces hématophages comme *Hirudomedicinalis*, et en général d'une année chez les autres espèces, les adultes mourant après la reproduction (**Henri et al., 2010**).

### II.3. Classe des polychètes :

#### II.3.1. Définition :

Annélides primitifs marins ou d'eau saumâtre, rarement d'eau douce (*Troglochaetus* des eaux souterraines du Jura), à sexes séparés. Métamérie parfaite [Fig. 03]. Chaque métamère porte des expansions latérales à fonction locomotrice, les parapodes garnis de soies chitinoïdes plus ou moins nombreuses et complexes. Larve trochophore libre. Plus de 3500 espèces sont actuellement recensées.

Il est possible de regrouper les nombreux ordres de polychètes en deux sous-classes : les polychètes errantes et les polychètes sédentaires ; le petit groupe des Archiannélides en est actuellement séparé (**Beaumont et Cassier, 2004**).



**Figure 3:** photographie représente la structure générale des Polychètes[04].

#### II.3.1.1. Les polychètes errantes :

Sont caractérisées par leur corps allongé dont tous les métamères sont construits sur le même plan (métamérie homonome) et par la présence de parapodes biramés (exceptionnellement uniramés) bien développés. La tête parfaitement individualisée porte, en relation avec la vie mobile et active, de nombreux organes sensoriels ; la trompe volumineuse est chez les formes prédatrices et carnassières, pourvue de mâchoires puissantes (**A. Beaumont et P. Cassier, 2004**).

### II.3.1.1.1 *Les néréidiformes* :

Polychètes à métamérie bien conservée ; parapodes saillants et soies longues souvent composées ; prostomium, péristomium et appendices céphaliques bien développés de même que la trompe souvent armée de puissantes mâchoires. Mode de vie libre ou fouisseur (rarement tubicole), souvent prédateur (**Beaumont et Cassier, 2004**).

### II.3.1.1.2 *les amphinomiformes* :

Polychètes, à métamérie bien conservée et à trompe puissante, présentant des caractères primitifs : systèmes nerveux à 4 cordons, bouche entourée de plusieurs segments sans péristomium différencié. Trompe excertile sans mâchoire ni papille (**Beaumont et Cassier, 2004**).

### II.3.1.2. Les polychètes sédentaires :

Tubicoles ou fouisseurs, sont caractérisés par l'apparition d'une division fonctionnelle des différentes parties du corps (régions branchiale, thoracique, abdominale, caudale) et une altération plus ou moins profonde de la métamérie primitive. La tête est en général bien développée, les parapodes simples, la trompe inerme, les organes sensoriels réduits ou hypertrophiés et annexés à la fonction alimentaire. Soies simples, en crochets (**Beaumont et Cassier, 2004**).

### II.3.1.3. Les Archiannélides :

Parmi les formes actuelles des Annélides Polychètes le groupe des Archiannélides (ex : *Polygordius*) peut être séparé car il présente un certain nombre de caractères considérés comme primitifs (métamérie régulière, sexes séparés, soies absentes ou simples, parapodes nuls ou réduits à des moignons).

Parmi ces Archiannélides le genre le plus important est *Dinophilus*. Il comprend de très petits animaux ciliés, longs de 1 à 2 mm, qui vivent dans le sable ou les Algues marines. La métamérie se traduit extérieurement par des constriction du corps et par la distribution de cercles ciliés mais ils ne présentent ni parapode, ni soie. Le prostomium n'a pas d'appendice mais porte une paire d'yeux. La métamérie se marque souvent aussi par l'existence de plusieurs paires de protonéphridies. les sexes sont séparés et parfois

présentent même un dimorphisme net. Chez le mâle l'évacuation des produits génitaux se fait par la dernière paire de néphridies modifiées en vésicules séminales.

Par leur morphologie les Archiannélides évoquent des stades de métamorphose postérieurs à la trochophore (**Beaumont et Cassier, 2004**).

### II.3.2. Morphologie :

Le corps des Polychètes, les plus typiques des Annélides, se compose de 3 régions non homologues :

➤ 1° une région antérieure, la tête ou lobe céphalique, ou prostomium. C'est un bourgeon creux contenant le cerveau, sus-œsophagien ; elle porte des appendices sensoriels : Palpes sur l'aire palpaire ; antennes et yeux sur l'aire antenno-oculaire et présente une aire postérieure olfactive (organe nuchal). Dans la larve, ce lobe céphalique ne renferme jamais de sacs mésodermiques.

➤ 2° une région moyenne le soma, tronc ou corps, formé d'une succession de segments homologues, porteurs d'appendices latéraux, les parapodes.

➤ 3° une région postérieure, le pygidium situé à l'extrémité du corps, percé par l'anus, sans sacs cœlomiques, sans parapodes.

Chaque segment du soma, ou métamère, se compose théoriquement :

➤ 1° d'une enveloppe épidermique tégumentaire, non ciliée, sécrétant une cuticule formée de fibrilles se croisant à angle droit.

➤ 2° d'une couche de muscles circulaires ; de faisceaux de muscle longitudinaux qui sont les plus importants ; de muscles obliques ; tous ces muscles sont à fibres lisses.

➤ 3° de deux sacs cœlomiques (cavité générale).

➤ 4° d'une paire de ganglions nerveux.

➤ 5° d'une paire d'organes excréteurs ou néphridies (**Pierre et al.,1970**).

## III. *Perinereis cultrifera*

*Perinereis cultrifera*, ver marin à vie errante, commun dans la vase peut être pris comme type des Polychètes. Cet exemple a déjà fait l'objet d'une description détaillée et abondamment illustrée (**Beaumont et Cassier, 2004**).

*Perinereis cultrifera* Grube, est un ver marin très répandu sur toutes nos côtes. Forme essentiellement mobile, à vie errantes, on la rencontre à marée basse dans les fentes

des rochers, sous les pierres, mais plus fréquemment dans la vase ou le sable des plages ou des estuaires, principalement au niveau des herbiers à Zostères. Cette forme et les espèces voisines sont couramment utilisées comme appâts par les pêcheurs (**Beaumont et Cassier, 2010**).

L'organisation de *P. cultrifera* est assez caractéristique de l'ensemble des Polychètes dont les différents ordres se distinguent par des différences portant sur la morphologie (organes sensoriels, trompe, formations branchiales), sur l'anatomie (néphridies, dissépiments, organes génitaux, tube digestif) (**Beaumont et Cassier, 2004**).

### III.1. Organisation générale des *Perinereis cultrifera* :

Le corps de *Perinereis cultrifera*, long de 10 à 25 centimètres environ, est vermiforme et annelé [fig. 04]. Sur le vivant, la teinte générale varie du jaune verdâtre au vert-bronze. Remarquer sur la ligne médio- dorsale une série de taches plus claires vaguement rectangulaires matérialisant l'emplacement du vaisseau dorsal (V.D.) et, sur les flancs, des lignes obliques également plus claires. Vers l'arrière, les pigments verts disparaissent progressivement, de sorte que les segments postérieurs sont de teinte chair (**Beaumont et Cassier, 2010**).



**Figure 4:** photographie de *Perinereis cultrifera*.

#### III.1.1. La tête :

Cette région antérieure du corps porte les principaux organes sensoriels, la bouche et les pièces masticatrices [fig. 05]. Elle comprend deux parties distinctes :

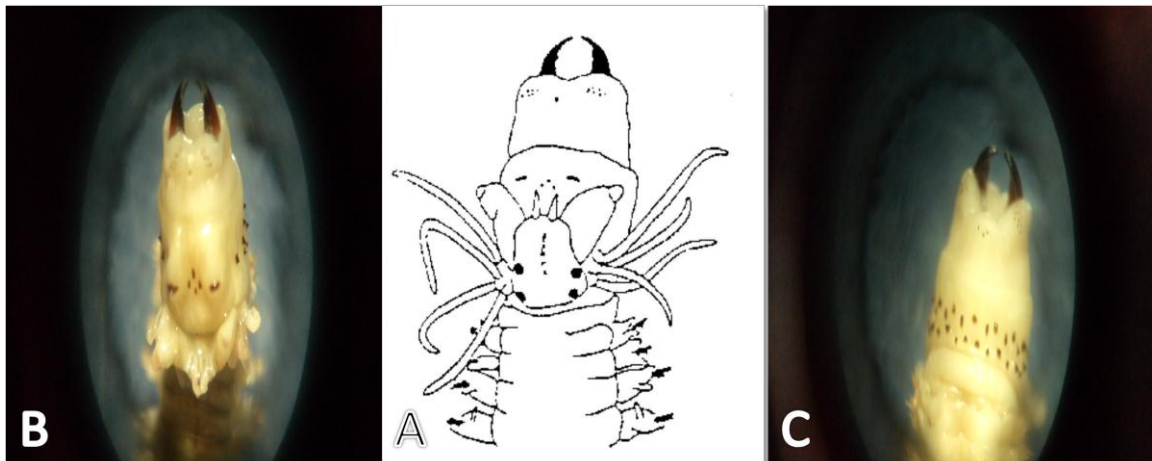
### III.1.1.1. Le prostomium ou lobe céphalique ou acron :

Primitivement pré-buccale, le prostomium est aussi large que long et de forme grossièrement hexagonale ; il porte les organes sensoriels suivants :

- Deux tentacules.
- Deux palpes.
- Deux paires d'yeux rudimentaires ou ocelles.
- Des organes nucaux (**Beaumont et Cassier, 2010**).

### III.1.1.2. Le péristomium :

Le péristomium est percé ventralement de l'orifice buccal et porte de chaque côté deux paires de longs cirres tentaculaires dont les extrémités effilées ou cirrostyles sont insérées deux à deux sur une base commune ou cirrophore (**Beaumont et Cassier, 2010**).



**Figure 5:** A-Détail de la partie antérieure de *Perinereis cultrifera* (**Younsi, 2006**)

B-photographie de la face dorsale, C-photographie de la face ventrale.

### III.1.2. Le tronc ou soma :

Cette partie moyenne de corps, proportionnellement la plus importante, résulte de la juxtaposition d'éléments en apparence tous semblables, les métamères. Chaque métamère est légèrement aplati ventralement et porte une paire de saillies latérales creuses, à fonction locomotrice : les parapodes. Ces derniers sont garnis de soies longues et nombreuses réparties en deux groupes principaux (**Beaumont et Cassier, 2010**).



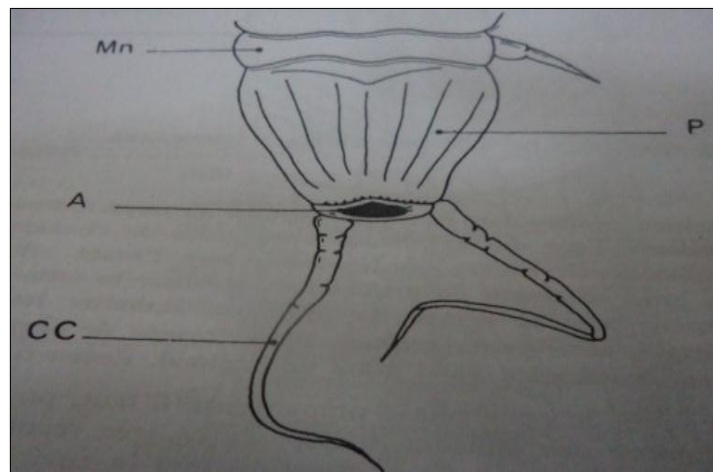
### II.1.2.1. Les parapodes et soies :

Les métamères de la région moyenne du corps portent chacun une paire de saillies latérales ou parapodes. Un parapode est composé d'une rame dorsale, le notopodium et d'une rame verticale, le neuropodium. Chaque rame porte en principe un cirre tentaculaire dorsal et un cirre tentaculaire ventral. Chaque rame contient en outre un sac de soies ou bulbe sétigère, d'où les soies émergent ; les unes relativement fines, très saillantes, les autres plus fortes émergent peu : ce sont les acicules (un acicule par rame) ; il sert d'insertion aux muscles qui font mouvoir les bulbes. Il existe différents sortes de soies ; leur morphologie est variable, ainsi que celle des parapodes, de la tête et du corps en générale (**Pierre et al., 1970**).

### II.1.3. Le pygidium ou telson :

Cette partie postérieure du corps de la néreis a la forme d'un cône tronqué très finement sillonné longitudinalement [fig. 06]. Le pygidium (p.) est percé de l'orifice anal (A.) et porte deux longs cirres caudaux (C.C.) flexibles à fonction sensorielle. Ces cirres sont insérés ventralement.

Les cirres caudaux ne sont pas homologues des parapodes de même que le pygidium n'a pas la valeur d'un métamère car les formations cœlomiques n'y pénètrent jamais (**Beaumont et Cassier, 2010**).



**Figure 6:**Schéma représente Le pygidium de *Perinereis cultrifera* (**Beaumont et Cassier, 2010**).



Partie II :  
Écologie de  
*Perinereis cultrifera*

*Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840), espèce connue en Algérie sous l'appellation vernaculaire de « ver vert de roche », exploitée de façon régulière, de par sa répartition géographique intéresse les pays de la façade atlantique (France; Grande Bretagne; Portugal) et du pourtour méditerranéen (Algérie; Espagne; France; Italie; Tunisie).

Comme l'ont déjà signalé de nombreux auteurs, il est fondamental de bien préciser le statut taxonomique des espèces d'importance économique et/ou écologique. La synthèse des données portant sur la biologie de *Perinereiscultrifera* a mis en évidence que la période et le mode de reproduction, ainsi que l'âge à maturité et les paramètres biométriques varient fortement selon la localisation géographique des populations (**Rouabah A. et Rouabah L., 2007**).

## I. Identification de l'espèce *Perinereis cultrifera*

La plupart des études taxonomiques courantes des organismes marins sont basées sur des caractères phénotypiques et des informations géographiques. Cela mène à des ressemblances morphologiques, mais la distinction évolutionnaire et phylogénétique considère largement l'espèce comme une entité seule et indépendante (**Allouti, 2011**).

Selon le registre européen des espèces marines ERMS ; la classification de l'Annélide Polychète *Perinereis cultrifera* acceptée, et citée dans Fauchald et Bellan (2009) est la suivante:

**Royaume:**Animalia (animaux).

**Embranchement:**Annelida (annélides).

**Classe:**Polychaeta (polychètes).

**Sous classe:** Palpata.

**Ordre:**Aciculata.

**Sous ordre :**Phyllodocida.

**Famille :**Nereididae Johnston, 1865.

**Genre:***Perinereis* (Kinberg, 1865)

**Espèce:***Perinereis cultrifera* (Grube, 1840).

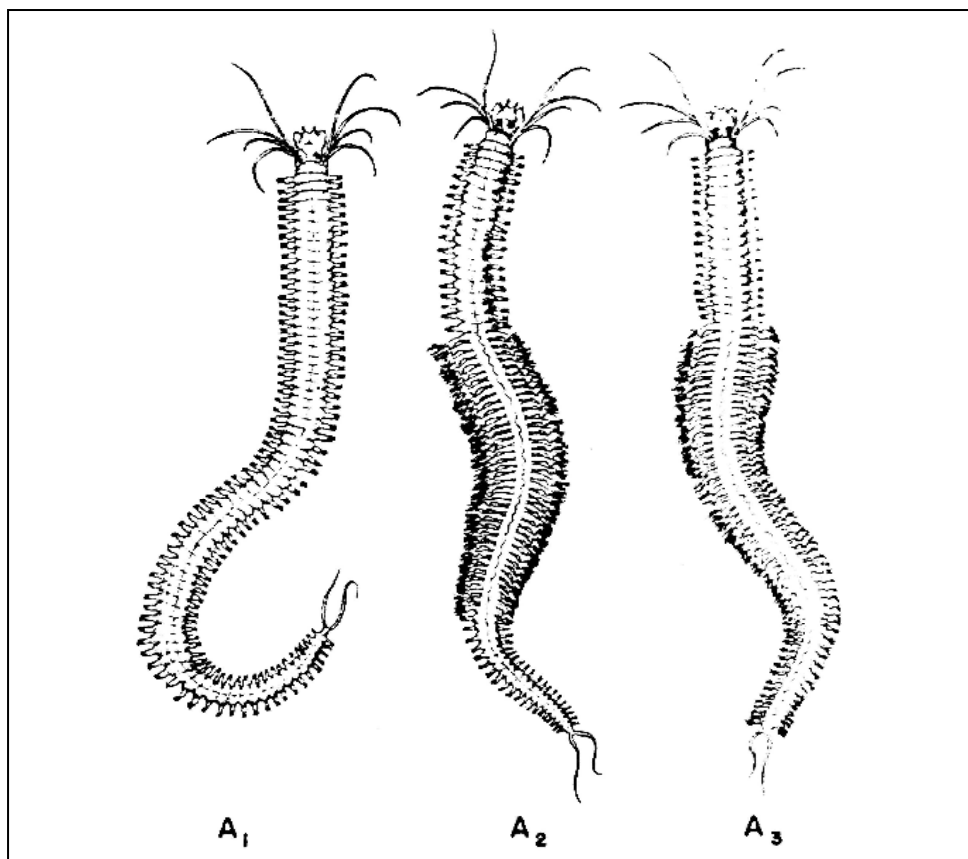
## II. Mode de reproduction et âge de maturité

*Perinereis cultrifera* est une espèce gonochorique. Selon la localisation géographique des populations, la reproduction s'effectue sans modifications morphologiques atouque (**Younsi, 2006**). « La forme atouque de la baie d'Alger, nettement

moins grosse et possédant moins de 80 segments »(Rouabah A. et Rouabah L., 2007). Où elle s'accompagne de transformations somatiques appelées épitoque (Younsi, 2006). « La forme épitoque des côtes de la Manche et de l'Océan Atlantique, caractérisée par son poids important et son grand nombre de segments, plus de 120 segments »(Rouabah A. et Rouabah L., 2007).

La reproduction de *Perinereis cultrifera* est de type épitoque en Manche et en Atlantique [Fig. 07], la ponte a lieu en pleine eau d'avril à juillet selon la provenance des individus et est suivie de la mort des géniteurs (Younsi, 2006). Chez les Néréidés que la sexualité est la mieux connue. Ces vers marins, qui ne se reproduisent qu'une seule fois, meurent dans les jours qui suivent l'essaimage au cours duquel se fait l'émission des produits génitaux. Selon les genres, la durée de vie est de 1, 2, ou 3 ans (Allouti, 2011).

En Méditerranée, sur la baie d'Alger le mode de reproduction est de type atoque, l'épitoque n'a été observée que très rarement et a été par conséquent considérée comme étant un phénomène accidentel (Younsi, 2006).



**Figure 07:** Mode de reproduction chez les Néréidiens (d'après Durchon, 1967)

**A1**Reproduction sans épitoque, **A2** Reproduction avec épitoque médiane,  
**A3** Reproduction avec épitoque médiane et postérieure.

Cependant, Des travaux plus récents rapportent qu'en Méditerranée, la reproduction de *Perinereis cultrifera* peut être de type épitoque dans la lagune de Venise en Italie, à Annaba sur le littoral Nord Est Algérien, (**Rouabah, 2003**).

D'après Durchon (1957), selon les localités il pourrait y avoir présence simultanée des deux formes de reproduction avec une prédominance plus ou moins marquée de l'une ou de l'autre. *Perinereis cultrifera* serait une espèce monotélique en Manche et polytélique en méditerranée (**Younsi, 2006**).

L'épitoque permet à l'animal de mener une vie pélagique. Mâles et femelles se retrouvent en de véritables essaims et au cours d'une "danse nuptiale" rejettent leurs gamètes. Fécondation et développement embryonnaire s'opèrent ainsi en pleine mer (**Caner, 1981**).

## II.1. Développement ovocytaire :

Les ovocytes de *P. cultrifera*, matériel biologique le mieux adapté à nos travaux ont l'avantage de représenter une fraction importante du corps de l'animal. Les travaux cytologiques réalisés par Dhainaut permettent de distinguer trois grandes étapes au cours de ce grand accroissement:

- ❖ Stade 1 : synthèse du vitellus ou vitellogenèse (diamètre ovocytaire inférieur à 120  $\mu$ m) qui se traduit par l'édification, dans le cytoplasme, de réserves lipidiques et de globules vitellins.

- ❖ Stade 2 : synthèses de substances muqueuses ou élaboration des alvéoles corticaux (diamètre ovocytaire supérieur à 130  $\mu$ m). Ces alvéoles corticaux apparaissent comme des inclusions à structure fibreuse intracytoplasmiques.

- ❖ Stade 3 : maturité génitale qui voit s'opérer un profond remaniement au sein de l'ovocyte.

Après fécondation, c'est le contenu de ces alvéoles corticaux qui sera expulsé pour former la gelée protectrice de l'œuf (**Caner, 1981**).

## III. Cycle de développement

Le cycle de vie de certaines espèces d'annélides polychètes est caractérisé par des transitions écologiques qui s'opèrent à deux niveaux (**Porchet, 1996**), une transition liée au développement et à la croissance des adultes et, une autre liée à la reproduction (dissémination de l'espèce). Chez *Perinereis cultrifera*, la structure dimensionnelle de la

population a été mise en évidence grâce aux travaux de (Scaps et al.,1992) [Fig. 08]. Les vers juvéniles, localisés principalement dans le haut de la zone à *Fucus serratus*, migrent au cours de la phase de croissance et de différenciation sexuelle vers le bas de cette même zone où s’accomplissent les transformations morpho-anatomiques liées à l’épitoque. Les adultes benthiques quittent leur galerie et montent dans la colonne d’eau la nuit pour libérer leurs gamètes. Cette libération des gamètes est synchrone. La fécondation se fait dans la colonne d’eau (fécondation externe), le zygote se dépose et adhère au substrat (blocs ou galets). La libération des gamètes se fait par éclatement de la paroi du corps et entraîne la mort des individus (Younsi, 2006).

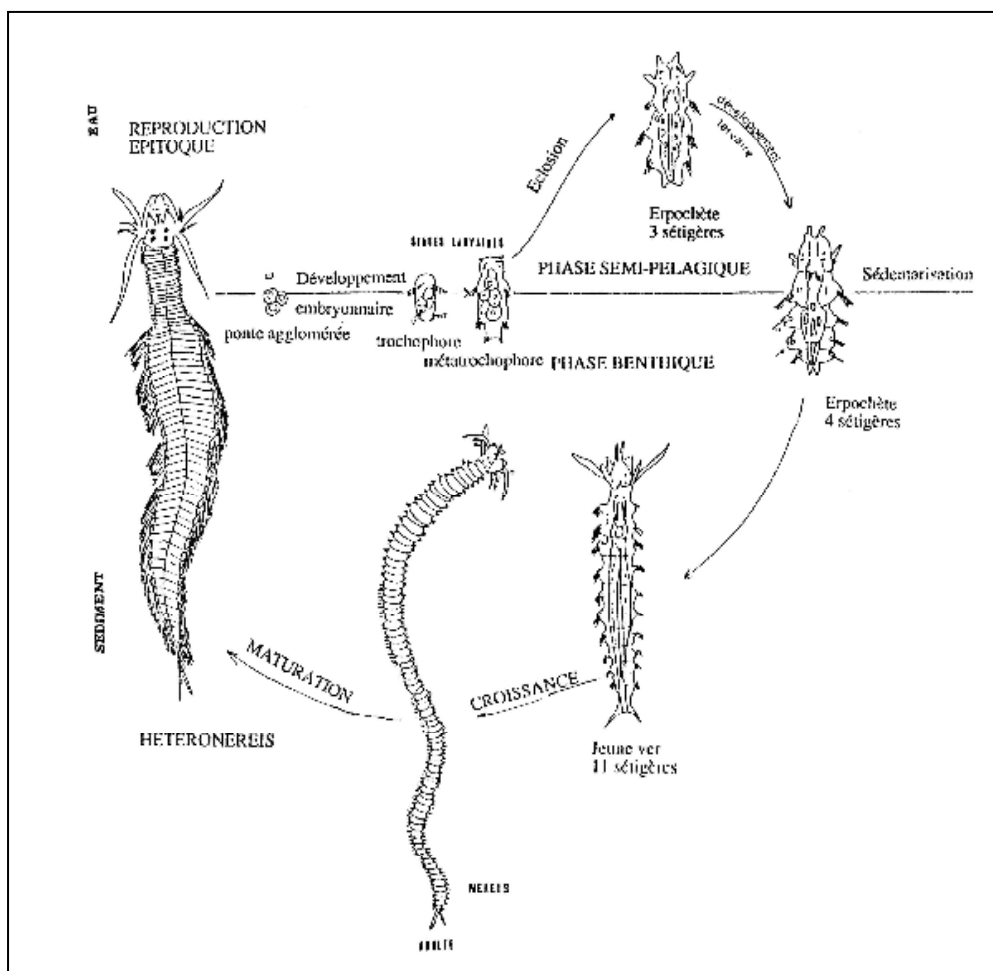


Figure. 08 : Cycle de vie de *Perinereis cultrifera* (in Rouabah, 2003).



# Partie III :

# ADN

C'est en 1953 que Watson et Crick, alors chercheurs à l'université de Cambridge, publièrent dans la célèbre revue *Nature* leur découverte de la structure de l'ADN, ce qui leur valut le prix Nobel de médecine et de physiologie en 1962 (**Beaumont, 2007**).

Presque tous les ADN cellulaires sont des molécules extrêmement longues, chaque chromosome donné ne contient qu'une seule molécule d'ADN. Les cellules d'eucaryotes se sont adaptées à cette extrême longueur en enroulant leur ADN autour de complexes protéiques, les nucléosomes. La plupart des molécules d'ADN sont linéaires mais certaines sont circulaires, c'est le cas notamment des ADN des chromosomes de procaryotes et de certains virus.

La molécule d'ADN est généralement une double hélice enroulée à droite, l'hélice est composée de deux chaînes polydésoxyribonucléiques. Chaque chaîne est un polymère alternant des sucres 2'-désoxyribose et des groupements phosphatés joints par des liaisons phospho-diester. Chaque chaîne est orientée de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', et les deux chaînes sont associées l'une à l'autre de façon antiparallèle (leurs directions sont opposées). L'une des quatre bases azotées (l'adénine et la guanine qui sont des purines, la cytosine et la thymine qui sont des pyrimidines) est projetée sur le côté du sucre, si l'ordre des sucres-phosphate est régulier, l'ordre des bases est différent d'un ADN à l'autre ; c'est ce qui définit le contenu informatif de l'ADN (**Turner et al., 2000**).

## I. Structure et caractéristiques de l'ADN

L'ADN apparaît fréquemment en double hélice [Fig. 09]. Deux chaînes séparées et antiparallèles d'ADN sont enroulées l'une sur l'autre vers le côté hélicoïdal droit, avec les squelettes du sucre phosphorique à l'extérieur et les bases liées en paires grâce à des liaisons hydrogène et superposées les unes sur les autres à l'intérieur. L'adénine se lie à la thymine ; la guanine se lie à la cytosine et forment deux chaînes complémentaires ; l'une spécifie la séquence de l'autre (**Turner et al., 2000**).



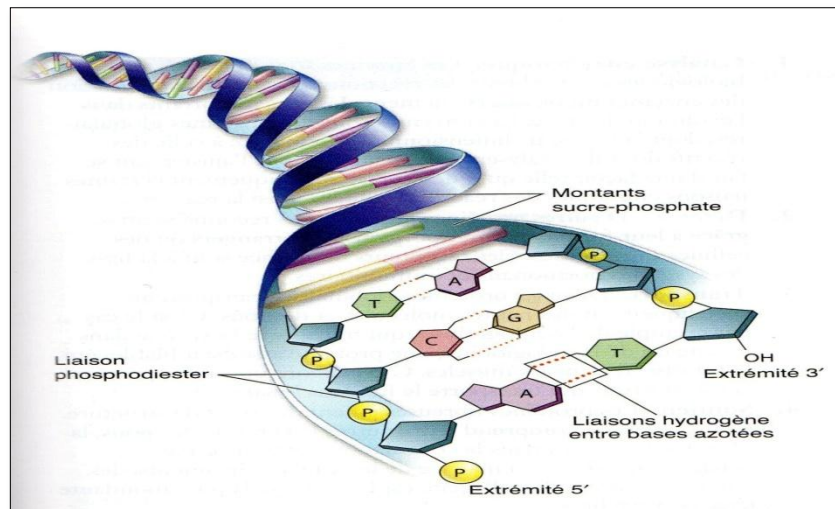


Figure 09 : La structure de l'ADN (Raven *et al.*, 2014) .

## I.1. Les constituants de L'ADN :

### I.1.1. Les bases:

Les bases de l'ADN sont des anneaux aromatiques hétérocycliques contenant le carbone et l'azote, avec une variété de substituant [Fig. 10]. L'adénine (A) et la guanine (G) sont des **purines**, des structures bicycliques (deux anneaux fondus) alors que la cytosine (C) et la thymine (T) sont des **pyrimidines** monocycliques (Turner *et al.*, 2000).

La base purique Adénine (A) forme une paire de bases avec la base pyrimidique thymine (T), alors que la base purique guanine (G) ne forme une paire de base qu'avec la base pyrimidique cytosine (C) (Watson *et al.*, 2009).

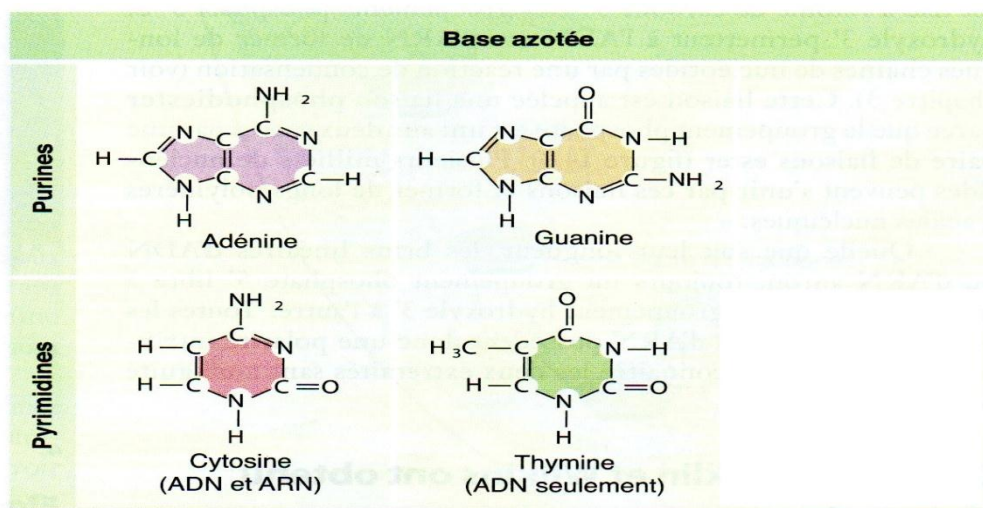


Figure 10 : Les bases azotées (Raven *et al.*, 2014).

### I.1.2. Les nucléosides :

Dans les acides nucléiques les bases sont fixées par une liaison covalente à la position-1' de l'anneau du sucre pentose pour former un nucléoside [Fig. 11], le sucre dans l'ADN est un **désoxyribose-2'**, dans lequel le groupement hydroxyle à la position-2' est remplacé par un hydrogène. Le point d'attache à la base est la position-1' (N-1) des pyrimidines et la position-9' (N-9) des purines (**Turner et al., 2000**).

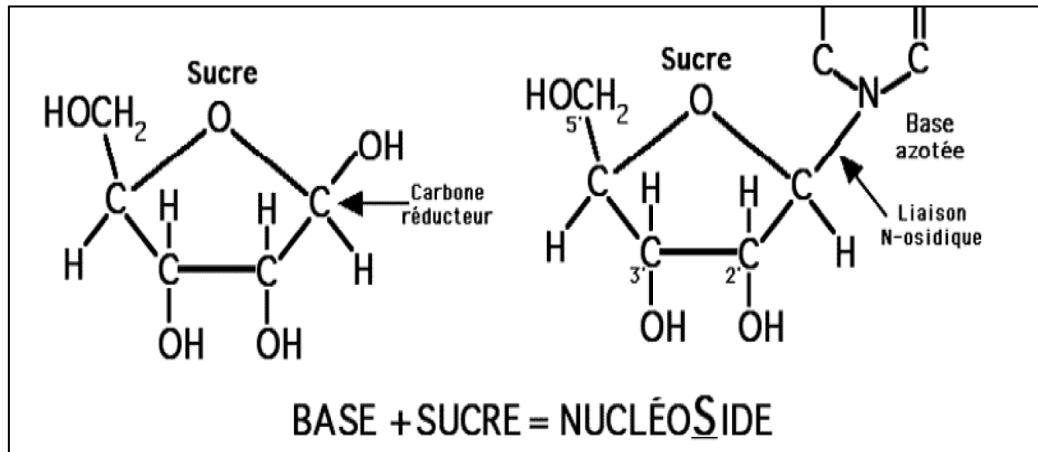


Figure 11 : Structure du nucléoside (**Housset et Raisonier, 2006**).

### I.1.3. Les nucléotides :

Dans l'ADN, l'ose est le 2'-désoxyribose et les nucléotides sont des désoxyribonucléosides monophosphates [Fig. 12]. Ils ne comportent qu'un seul groupe phosphate (le phosphate  $\alpha$ ) (**Maftah et al., 2008**). Il est formé :

- D'une base azotée.
- D'un pentose (désoxyribose).
- D'un groupement phosphoryle (Moussard, 2005).

Dans l'ADN, la cytosine peut être méthylée sur le carbone 5 pour donner la 5-méthyl-cytosine. Les cytosines méthylées sont souvent présentes dans des régions de séquences ADN riches en répétition de nucléotides à guanine et cytosine (les îlots à dinucléotides CpG) (**Maftah et al., 2008**).

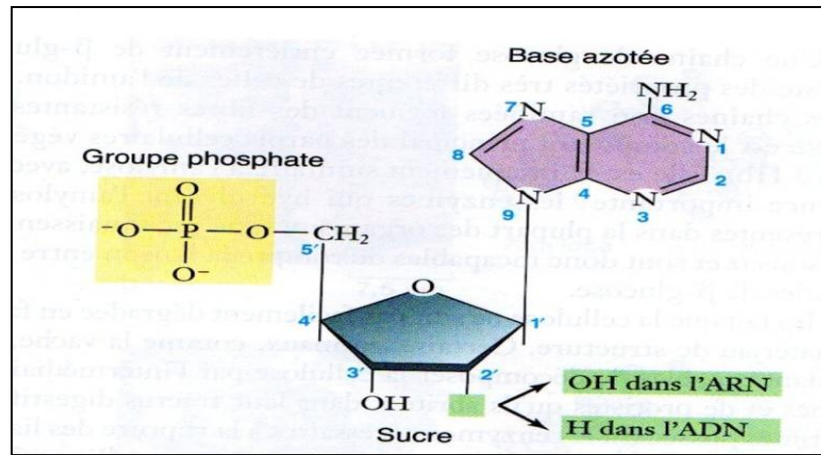


Figure 12 : Structure du nucléotide (Raven et al., 2014).

#### I.1.4. Liaisons phosphodiéstères :

Dans la molécule de l'ADN les désoxyribonucléosides sont joints en un polymère par une liaison covalente, d'un groupement phosphorique entre le 5'-hydroxyle du prochain [Fig. 13] ce genre de lien, ou de liaison, est appelé liaison phosphodiéstères, puisque le phosphate est chimiquement sous forme de diester. Une chaîne d'un acide nucléique peut alors être observée comme ayant une direction toute chaîne d'un acide nucléique quelle que soit sa longueur, possède une extrémité 5-' libre qui peut ou ne peut avoir des groupements phosphoriques fixés et une extrémité 3' – qui est le plus souvent un groupement hydroxyle libre. En cas de pH neutre chaque groupement phosphorique possède une seule charge négative. C'est la liaison pour laquelle on appelle les acides nucléiques acides ; ce sont les anions de puissants acides. Les acides nucléiques sont donc des polymères hautement chargés (Turner et al., 2000).

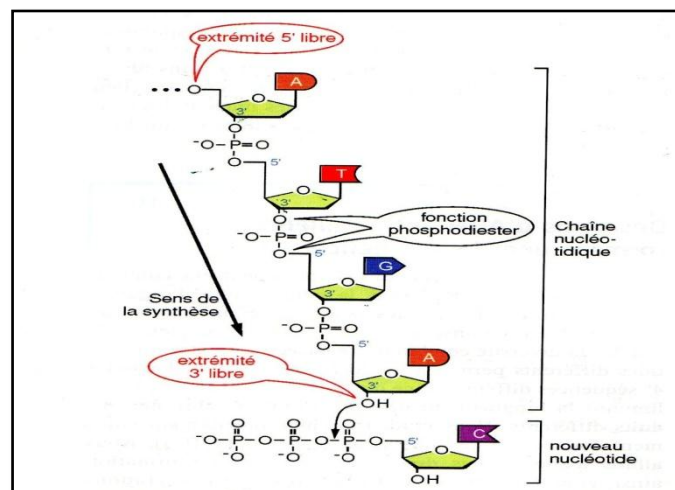


Figure 13 : La liaison phosphodiéstères (Werner, 2007).

## I.2. Les caractéristiques des deux chaînes d'ADN :

Ces deux chaînes ont trois propriétés essentielles, elles sont dites :

- ❖ Antiparallèles.
- ❖ Complémentaires.
- ❖ Hélicoïdales. (**Étienne et Clauser, 2004**).

### I.2.1. Antiparallèles :

« Antiparallèles », signifie que les deux brins de nucléotides sont parallèles mais dans des directions opposées. Prenons l'exemple d'un ADN linéaire :

- ✓ Pour un brin : la direction 5' vers 3' se trouve être, par exemple, de haut en bas.
- ✓ Pour le deuxième brin : la direction 5' vers 3' sera alors à l'inverse, de bas en haut (**Étienne et Clauser, 2004**).

### I.2.2. Complémentaires :

Les brins d'ADN sont complémentaires car chaque nucléotide d'un brin établit des liaisons chimiques avec son nucléotide correspondant de l'autre brin et s'associent ainsi 2 à 2. Cette liaison chimique correspond à des liaisons hydrogène entre les bases des nucléotides (**Étienne et Clauser, 2004**).

On trouve en effet expérimentalement, et quelle que soit l'espèce étudiée, un rapport constant entre A/T et G/C.

Pour que tous les nucléotides puissent s'hybrider, il faut donc qu'un brin soit complémentaire de l'autre ; le brin 5' vers 3' est donc complémentaire du brin 3' vers 5'. Cette complémentarité est due à la conjonction de deux phénomènes :

- Des contraintes stériques :

En face de purine (constitué de deux cycles), on trouve une pyrimidine (formée d'un seul cycle).

- La création de liaisons hydrogènes :

Les deux bases s'apparient grâce à des liaisons hydrogènes qui s'établissent vers le centre de l'hélice d'après les règles de complémentarité déjà énoncées (**Beaumont, 2007**).

### I.2.3. Chaînes hélicoïdales :

L'ADN s'enroule suivant une double hélice droite (pas à droite) sous une forme A et B, et sous la forme d'une double hélice gauche pour l'ADN-Z.

Cette dernière forme, découverte dans les années 1980, nécessite l'alternance régulière d'une base pyrimidique avec une base purique, alternance que l'on rencontre rarement *in vivo*, mais qui existe dans l'ADN humain.

Sachant que la méthylation des bases de l'ADN est un facteur régulateur de l'expression de ces gènes, on est en droit de penser que la forme en ADN-Z serait impliquée dans les processus de régulation.

La forme B de l'ADN est la plus fréquente, avec des petites modifications structurales pour les autres formes A et Z (**Beaumont, 2007**).

## II. Les différentes formes d'ADN

En principe, les deux brins polynucléotidiques peuvent former une hélice de pas droit (forme dextre) ou une hélice de pas gauche (forme senestre). La première forme est la plus fréquente et existe en deux variantes, l'ADN-B, qui diffèrent, entre autres, par la taille de leurs hélices. L'ADN-A a un diamètre plus large (2,6 nm) que l'ADN-B (2 nm). Il est plus compact avec une distance de 0,23 nm entre deux plateaux de bases successifs (11 plateaux par tour). La forme A est observée notamment dans les hélices hybrides ADN-ARN. En solution et dans la cellule, c'est la forme B de l'ADN qui est prédominante. Une forme senestre de l'ADN étirée en zigzag (ADN-Z), avec un diamètre de 1,8 nm, est parfois observée mais sa signification physiologique reste incertaine (**Maftahet *al.*, 2007**).

## III. Propriété physico-chimiques des acides nucléiques

### III.1. La Stabilité :

Bien qu'il puisse apparaître évident que les structure de l'ADN double hélice et de l'ARN soient stabilisées par des liaisons hydrogène, tel n'est pas le cas. Les liaisons H déterminent la spécificité de l'appariement des bases alors que la spécificité d'une hélice d'un acide nucléique est le résultat des interactions hydrophobes et dipôle entre les paires de bases entassées (**Turner *et al.*, 2000**).

### III.2. Effet de l'acide :

Dans un acide fort et à des températures élevées, par exemple, l'acide perchlorique ( $\text{HClO}_4$ ) à plus de  $100^\circ\text{C}$ , les acides nucléiques sont complètement hydrolysés en leurs constituants : bases, ribose ou désoxyribose et phosphate. Dans un acide minéral plus dilué, par exemple à un pH entre 3-4 les liaisons les plus facilement hydrolysées sont sélectivement fractionnées.

Une chimie plus complexe a été développée dans le but de fractionner spécifiquement des bases et cliver le squelette de l'ADN ou de l'ARN à des bases spécifiques. Cette méthode constitue la base de séquençage chimique de l'ADN développé Maxam et Gilbert à qui elle doit son nom (**Turner et al., 2000**).

### III.3. Effet de l'alcali :

L'augmentation du pH de l'intervalle physique (pH 7-8) produit des effets plus subtils sur la structure de l'ADN. L'effet de l'alcali est de changer l'état tautomère des bases. Cet effet peut être observé en se référant au modèle composé, le cyclohexanone. La molécule est en équilibre entre le cétoautomère et les formes énol. À un pH neutre, le composé prédomine dans la forme cétoautomère. L'augmentation du pH produit un revirement à la forme énole (3) lorsque la molécule perd un proton, car la charge négative est plus stable sur l'atome oxygène électronégatif. De la même façon, la structure de la guanine s'est transformée aussi à la forme énole au pH élevé et des revirements analogues prennent place dans les structures des autres bases. Ceci affecte la liaison hydrogène spécifique entre les paires de bases, en fractionnant la structure de l'ADN à double brin et en le dénaturant (**Turner et al., 2000**).

### III.4. Dénaturation chimique :

Plusieurs agents chimiques peuvent dénaturer l'ADN ou l'ARN à un pH neutre, les exemples les plus connus sont l'urée ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ ) et le formamide ( $\text{HCONH}_2$ ). La concentration relativement élevée de ces agents (plusieurs molaires) fractionne la liaison hydrogène de grosses molécules d'eau cela signifie que la stabilisation énergétique d'une structure secondaire d'un acide nucléique produite par l'élimination de l'eau entre les bases hydrophobes superposées est réduite et que les brins sont dénaturés (**Turner et al., 2000**).

### III.5. La viscosité :

L'ADN cellulaire est très grand et mince; il possède techniquement un rapport axial élevé. L'ADN est d'environ 2nm de diamètre, sa longueur varie de micromètres en millimètres même à plusieurs centimètres dans le cas de chromosomes eucaryotes. De manière savoureuse, si l'ADN possédait le même diamètre qu'un spaghetti. En plus, L'ADN est une molécule relativement rigide. Sa rigidité devrait être similaire à celle des spaghettis à moitié cuits, en utilisant la même analogie. Par conséquent les solutions d'ADN ont une viscosité élevée. Encore plus, les molécules d'ADN longues peuvent facilement être altérées par les forces de cisaillement, ou par la sonication (ultrasons à haute intensité), avec une réduction concomitante de la viscosité. La sensibilité au cisaillement est un problème, si les grosses molécules d'ADN doivent être isolées intactes, bien que la sonication puisse être utilisée pour produire un ADN d'une longueur moyenne spécifique. Noter que ni le cisaillement ni la sonication ne dénaturent l'ADN; ils réduisent simplement la longueur des molécules à double brin dans la solution (**Turner et al., 2000**).

### III.6. La densité de flottabilité :

L'ADN possède une densité d'environ 1,7 g.cm<sup>3</sup>; il peut être analysé et épuré grâce à sa capacité à s'équilibrer en atteignant sa densité de flottabilité dans le gradient de densité du chlorure de césium dans un centrifugeur. La densité exacte de l'ADN est fonction du contenu G+C et cette technique peut être utilisée pour analyser les ADN de différentes compositions (**Turner et al., 2000**).

## IV. Les fonctions de l'ADN :

L'ADN macromolécules polymère de nucléotides (dAMP, dTMP, dGMP, dCMP) dont la structure et les propriétés chimiques lui permettent de remplir les fonctions suivantes :

- Sa fonction principale est de stocker l'information génétique, information qui détermine le développement et le fonctionnement d'un organisme. Cette information est contenue dans l'enchaînement non-aléatoire de nucléotides.
- Une autre fonction essentielle de l'ADN est la transmission de cette information de génération en génération. Cela permet l'hérédité.

• L'information portée par l'ADN peut se modifier au cours du temps. Cela aboutit à une diversité des individus et à une évolution possible des espèces. Cela est dû à des mutations résultant principalement d'erreurs lors de la réplication des séquences de l'ADN (ajout, délétion ou substitution de nucléotides), ou bien à des recombinaisons génétique. L'ADN est donc le support de l'information génétique mais aussi le support de ses variations. En subissant les effets de la sélection naturelle l'ADN permet l'évolution biologique des espèces[05].

## V. Extraction

Toute étude de génétique moléculaire implique la disposition d'échantillons d'acides nucléiques. Les applications médicales actuelles de routine se limitent le plus souvent à l'étude du génome lui-même, c'est-à-dire du DNA. Les techniques d'extraction des acides nucléiques sont relativement simples. Il convient seulement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique. En effet les acides nucléiques, qui sont stables dans la cellule intacte, deviennent très vulnérables à la digestion par les nucléases une fois la cellule lysée. De plus le très long filament de DNA génomique est « cassant » (**Kaplan J.C. et al., 2007**).

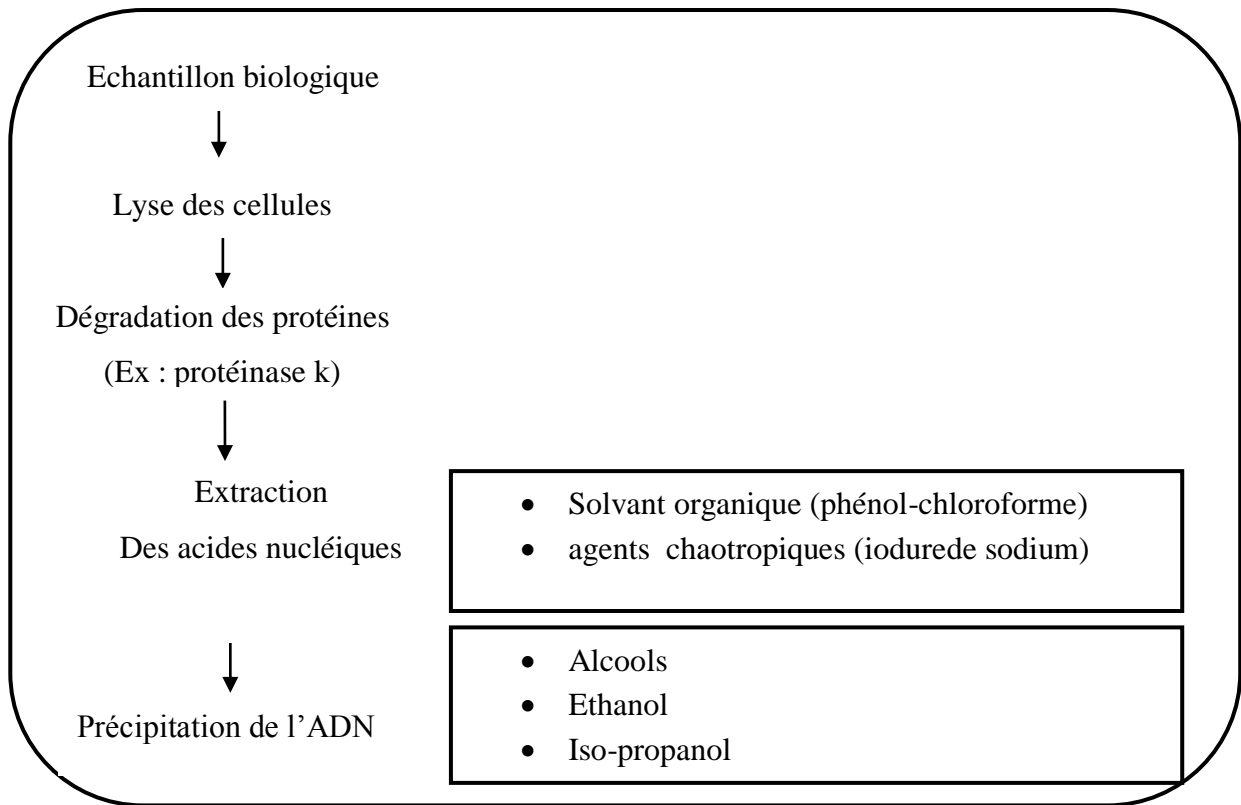
### V.1. Définition :

L'extraction de l'ADN est une technique permettant d'isoler l'ADN de cellules ou de tissu. L'ADN ainsi extrait peut ensuite être utilisé pour des recherches de biologie moléculaire, telles que le séquençage, la PCR ou le clonage. Il existe différents protocoles pour extraire l'ADN [Fig. 14], qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- ✓ Lyse des cellules.
- ✓ Elimination des protéines.
- ✓ Elimination des autres acides nucléiques (ARN, etc.)
- ✓ Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool.

Il existe aujourd'hui des kits commerciaux permettant de réaliser rapidement ces extractions à l'aide de réactifs prêts à l'emploi [05].





**Figure 14** : Procédés couramment utilisés pour extraire les acides nucléiques.

## VI. Les principales étapes de l'extraction de l'ADN

### VI.1. Fragmentation des tissus :

Les morceaux de tissus, prélevés directement sur les spécimens récoltés, doivent dans un premier temps être fragmentés, pour dissocier les tissus, les parois cellulaires, les membranes intracellulaires et les protéines qui entourent l'ADN. Une première étape mécanique peut-être nécessaire, comme dans le cas des arthropodes où les tissus sont à l'intérieur d'une « carapace » chitineuse. Cela peut être réalisé à l'aide d'une machine : un mouvement latéral rapide et répété entraîne le déplacement d'une bille de métal placée dans le tube contenant le tissu, ce qui a pour effet de broyer les tissus. Dans une seconde étape, les tissus sont placés dans une solution tampon qui contient notamment un détergent, qui a pour effet de dissocier les membranes (de nature lipidique, elles sont attaquées de la même façon que la liquide vaisselle attaque les graisses) [06].

## VI.2. Séparation de l'ADN des autres constituants :

L'ADN n'est donc plus maintenant associé aux autres constituants des cellules, mais reste mélangé avec ceux-ci dans le tampon d'extraction. Pour séparer l'ADN :

Différents agents chimiques peuvent permettre de séparer l'ADN des autres constituants, par exemple en obtenant 2 phases par ajout Chloroforme Iso-Amyle (CIA) et centrifugation, une qui contient l'ADN et l'autre les résidus que l'on veut éliminer. L'ADN est ensuite précipité, en ajoutant par exemple du NaCl (Chlorure de Sodium). C'est par ce procédé que l'ADN devient visible sous forme de « méduse » [06].

## VI.3. Récupération de l'ADN :

Après avoir ajouté les différents produits pour nettoyer l'ADN, le tube qui contient la solution et l'ADN est centrifugé. L'ADN se retrouve alors sous la forme d'un culot, c'est-à-dire un précipité solide collé au fond du tube qui contient le tampon. Il suffit ensuite d'évacuer le tampon sans faire tomber le culot, puis de laisser sécher l'ADN, l'ADN séché est ensuite élué dans un tampon adapté pour éviter sa dégradation.

Extraire l'ADN d'une cellule n'est pas évident car ce dernier est protégé par les parois et membranes de nature Lipoprotéiques et polysaccharidiques, qu'il faut dissoudre ou écarter pour pénétrer dans la cellule. Si la traversée du cytoplasme ne pose pas de problème, il faut ensuite pénétrer dans le noyau de la cellule. Mais l'ADN n'est pas isolé. Il est entouré par des protéines qui doivent être éliminées. On appelle ce mécanisme la purification de l'ADN. Enfin, au cours de l'extraction, la solution dans laquelle est plongé l'ADN contient également toutes les substances qui ont servi à l'extraire. Il faut donc trouver une méthode pour séparer l'ADN du milieu liquide (précipitation ou chromatographie). Ce n'est qu'au terme de cette étape que nous aurons isolé l'ADN. En fonction de la nature et de la densité de la cellule, la procédure est plus ou moins complexe ou chère. L'extraction d'ADN à partir de cellules procaryotes présente l'avantage de ne pas posséder d'enveloppe nucléaire : l'ADN est donc facilement accessible. Le problème majeur consiste à obtenir une concentration suffisante de cellules (une culture stérile de plusieurs jours). Par contre, l'extraction d'ADN à partir de cellules eucaryotes peut se faire en quelques heures [06].



# Chapitre II :

# Partie Expérimentale



# Partie I :

# Matériels et Méthode

## I. Présentation des sites

Les individus de *Perinereis cultrifera* ont été récoltés sur le site du littoral méditerranéen au nord-est et nord-ouest d'Alger, ces sites sont situés à El-kala ; plage El-Mordjène à 700 Km à l'Est d'Alger, et le site d'Annaba ; plage La Caroube. Alors que le site de nord-ouest est le site de Tlemcen ; plage de Honaine.

### ❖ Site d'El-Kala « El-Mordjène » :

El-Kala se situe à l'extrême Nord-Est de l'Algérie (Wilaya d'El-Tarf). Elle s'étend sur une superficie de 800 km<sup>2</sup>. Ses coordonnées vont de 36°43 à 36°57 N et de 8°37 à 8°43 E.

Le site d'El-Kala comprend une belle mosaïque d'habitat, zone humide, terrestre et marine; classé réserve de la biosphère par l'UNESCO en 1990. Par sa nature particulièrement généreuse, cet ensemble d'écosystèmes abrite une faune, et une flore très riche en termes de biodiversité.

La plage El-Mordjène (El-Kala) est caractérisé par la dominance du granite dans la composition des roches de la zone intertidale et on trouve des grès numidien (grès: roche sédimentaire à gros grains composée de masses consolidées de sable déposé par le mouvement de l'eau ou du vent) [Fig.15]. Le granite est une roche magmatique de formation et de texture cristalline visible (Allouti, 2011).



**Figure 15** : Site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera* sur le littoral nord-est Algérien à El-Kala prise le 11 avril 2015.

❖ Site d'Annaba « la caroube» [Fig. 16] :



**Figure 16:** Site d'échantillonnage de *Perinereis cultiferas* sur le littoral nord-est Algérien à Annaba « La Caroube » prise le 11 avril 2015.

❖ Site de Tlemcen [Fig. 17] :



**Figure 17 :** Site d'échantillonnage de *Perinereis cultiferas* sur le littoral nord-ouest Algérien à honainetlemcen prise le 01 avril 2015.

## II. Mode de récolte

L'échantillonnage a été réalisée en zone subtidale peu profonde. La méthode de récolte consiste à récolter les algues à la base à la main ou à l'aide d'un grattoir. Ce mode de récolte est difficile, fatigant et demande beaucoup de temps. De plus, il est moins rentable à la mesure où un nombre important de vers est sectionné suite au bris mécaniques. Par conséquent, ce mode de récolte est de plus en plus abandonné par les récoltants et remplacé par d'autres méthodes qui semblent être plus efficaces car elles sont rapides et permettent surtout de prélever des individus entiers et en grande quantité. Ces méthodes consistent à forcer les vers à sortir de leur galerie par l'utilisation de produits chimiques (10% d'eau de javel ou d'alun dilué dans l'eau de mer). Cependant, ce type de procédés entraîne des destructions dramatiques de l'environnement et des ressources biotiques.

## III. Mesure de poids et précision de sexe

Les individus récoltés sont fixés sous formol à 5% et l'éthanol à 96% dans des bouteilles de verre [Fig.18].



**Figure 18** : les bouteilles des échantillons.

Ces individus sont triés au laboratoire et ils ont été individuellement pesés à l'aide d'une balance de précision; après séchage sur papier filtre afin de déterminer le poids frais essuyé et le sexe à l'aide d'une loupe binoculaire [Fig.19].



Les mâles ont été identifiés par la présence d'amas spermatiques et les individus matures par celle de spermatozoïdes. Les femelles ont été identifiées par la présence

d'ovocytes et les individus ne présentant pas de produits génitaux dans leur contenu cœlomique, ont été considérés comme étant des individus sexuellement indifférenciés.



**Figure 19** : La mesure de poids et l'identification de sexe.

On a choisis des individus de chaque catégorie, et on a coupé la partie médiane de chaque individu en 04 parties comme suite [Fig. 20] : (50mg, 100mg, 150mg, 200mg).

<i>Perinereis cultrifera</i>	Partie médiane	Les poids
		50mg
		100mg
		150mg
		200mg

**Figure 20** : Division de la partie médiane de l'individu numéro 01.

#### IV. Relation entre poids frais essuyé et poids partiel formolé

Lors des prélèvements et du tri, les individus sont souvent incomplets. En effet, au cours de la récolte, il est extrêmement difficile de récupérer des individus entiers sur le terrain, les vers s'enfouissent rapidement dans le sédiment et un nombre important d'entre eux sont sectionnés par le bris mécaniques ou par autotomie. Ainsi, afin de pouvoir utiliser l'ensemble des individus récoltés et pour obtenir une meilleure représentation de la



population, nous avons utilisé la méthode du poids partiel formolé essuyé. Cette méthode basée sur le poids d'un nombre déterminé de segments a été décrite par Desrosiers et *al.*, (1988) sur *Nereis virens*. Le rang de cassure a été ainsi déterminé à partir d'un histogramme de distribution de fréquence [Fig. 21] et la relation entre le poids partiel formolé essuyé, des individus sectionnés au 43<sup>ième</sup> sétigère et le poids frais essuyé des individus entiers a été déterminé:

$$Y = 1.4573 \times x + 0.0588$$

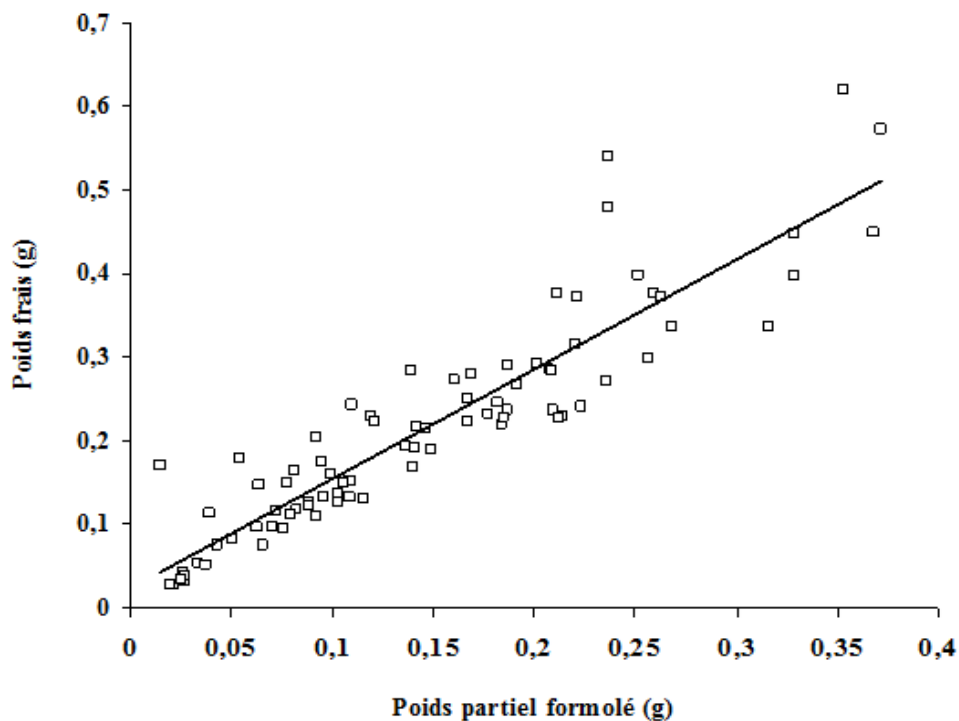
$$(n = 83 \quad r^2 = 0.881)$$

**Y** : Poids frais essuyé.

**x** : Poids partiel formolé essuyé.

**n** : Nombre d'individus.

**r<sup>2</sup>** : Coefficient de détermination de la courbe.

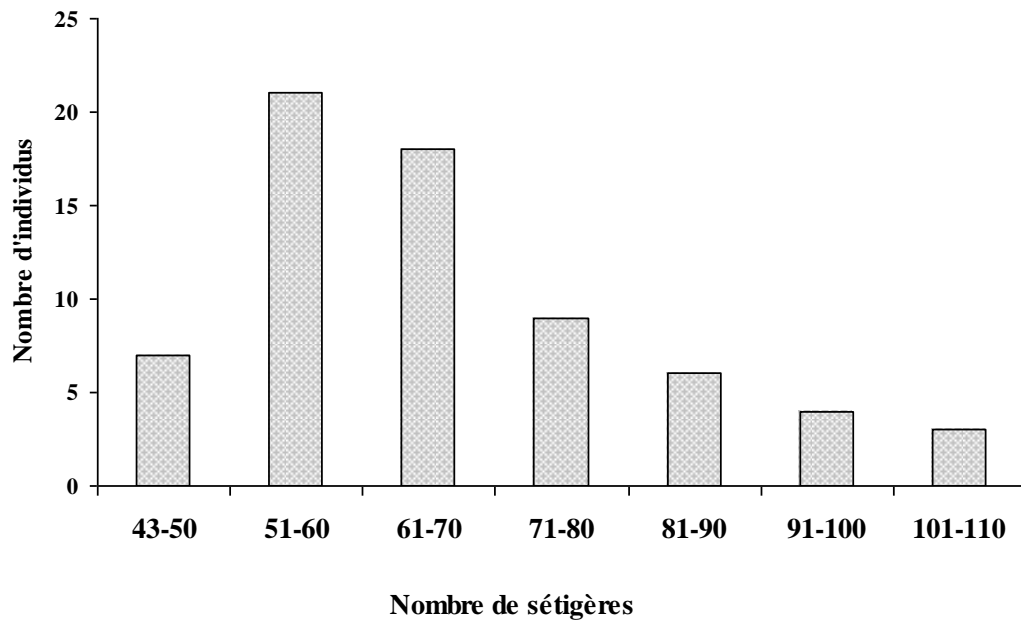


**Figure. 21** : Relation entre poids partiel formolé essuyé et poids frais essuyé.

## V. Distribution de fréquence de taille

Afin d'étudier la structure dimensionnelle de la population, nous avons retenu comme critère de taille le poids frais essuyé des individus. Pour tracer les histogrammes de distribution de fréquence [Fig.22], les vers ont été répartis dans un domaine de poids

compris entre 0,15 et 0,750 g avec un intervalle de classe de 0,05 g. Le choix de l'intervalle de classe a été effectué selon les recommandations de Scherrer (1984).



**Figure 22 :** Histogramme de distribution de fréquence du rang de cassure.

## VI. Extraction d'ADN à partir de la partie médiane de *Perinereis cultrifera*

### Préparation du tampon d'Extraction :

La préparation de 40 ml de tampon se fait par la préparation des produits suivant et mélanger le tous avec l'ajustement de PH = 8 [Fig. 23].

- SDS 1%

$$\begin{array}{l} \text{➤ } 1 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ \text{X} \longrightarrow 40 \text{ ml} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \text{➤ } 1 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ \text{X} \longrightarrow 40 \text{ ml} \end{array}} \right\} \begin{array}{l} X = 40 \cdot 2 / 100 \\ X = 0.4 \text{ g} \end{array}$$

- NaCl 1.4M

$$\begin{array}{l} \text{➤ } m = V \cdot C \cdot M \\ m = 0.04 \cdot 58.44 \cdot 1.4 \end{array}$$

$$m = 3.26 \text{ g}$$

- éthanol (95%) 0.2%
  - $0.2 \text{ ml} \longrightarrow 100 \text{ ml}$
  - $X \longrightarrow 40 \text{ ml}$
$$X = 20 * 0.2 / 100$$
$$X = 0.08 \text{ ml}$$
- EDTA 20Mm
  - $20 \text{ mM} = 0.02 \text{ M}$
  - $m = 0.04 * 372.23 * 0.02$
  - $m = 0.298 \text{ g}$
- Tris HCl ph 8.0 100mM
  - $100 \text{ mM} = 0.1 \text{ M}$
  - $m = 0.04 * 121.14 * 0.1$
  - $m = 0.484 \text{ g}$



**Figure 23 :** Préparation du tampon d'Extraction.

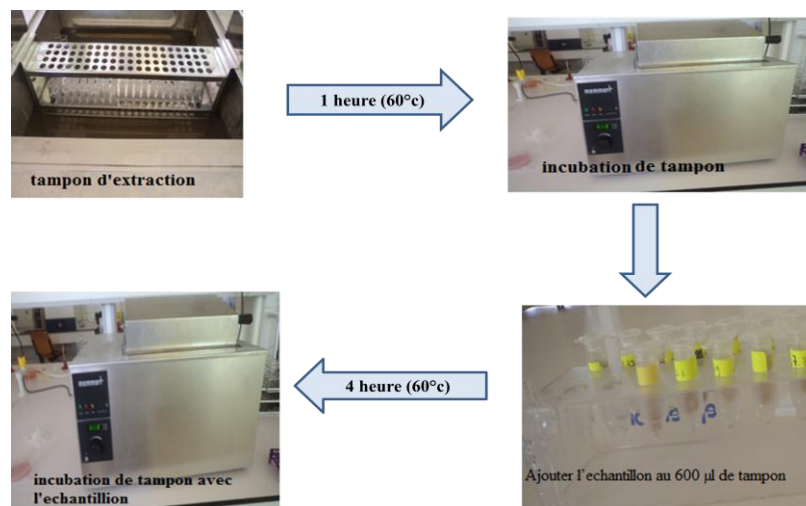
Il faut mélanger bien le tampon par l'intermédiaire d'un agitateur pour l'obtention d'un mélange homogène sans cristaux [Fig. 24].



**Figure 24** : Agitation du tampon.

**Jour 1 : Incubation du tampon et les échantillons [Fig. 25]:**

- Incuber le tampon d'Extraction à 60°C pendant une heure de temps sans échantillons (600 microlitres par tube epindorf).
- Après une heure, ajouter l'échantillon au 600 microlitres de solution déjà chaud et incuber à 60°C pendant 4 heures.



**Figure 25** : Incubation du tampon et les échantillons.

**Jour 2 : Les différentes étapes d'Extraction d'ADN [Fig. 26] :**

- Passer au vortex les epindorfs.
- Centrifuger à 3800rpm pendant 20 min et transférer dans un epindorf de 1.5 ml.

- Ajouter un volume égale de (Chloroforme + Éthanol, 4 ; 96 / 0.08 ml et 1.92 ml) et bien mélanger par renversement pendant 3 Minutes.
- Centrifuger à 3800rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Récupère le surnageant et le transférer dans un epindorf propre.
- Ajouter  $\frac{2}{3}$  de volume de propanol.
- Laisser précipiter pendant 1 heure à 4°C.
- Centrifuger 10 minutes à 3800rpm à 4°C.
- Laver le culot avec 500 microlitre d'éthanol 75%.
- Centrifuger 10 minutes à 3800rpm à 4°C.
- Sécher le culot à l'aire libre pendant 10 minutes et reprendre dans 50 microlitres d'H<sub>2</sub>O incubant à 37°C resuspendre l'ADN.
- Conserver à 4°C.

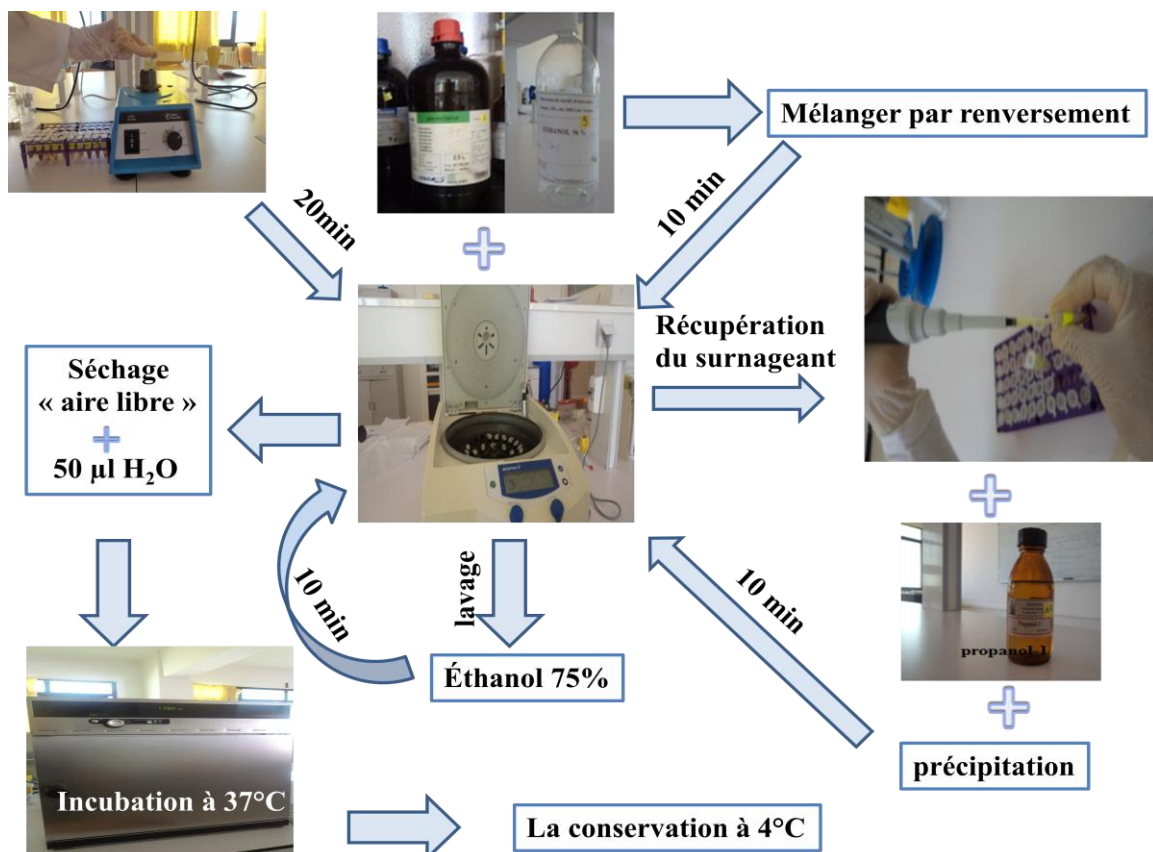


Figure 26 : Les étapes d'Extraction.

## VII. Quantification de l'ADN par spectrophotométrie

L'ADN, l'ARN, les oligonucléotides et même les mononucléotides peuvent être mesurés directement dans des solutions aqueuses sous forme diluée ou non diluée en mesurant l'absorption  $A$  (également définie comme étant la densité optique,  $DO$ ) en lumière ultraviolette. Si l'échantillon est pur (autrement dit, s'il ne contient pas de quantité significative de contaminants tels que des protéines, du phénol), la mesure spectrophotométrique de la quantité de rayons ultraviolets absorbés par les bases est une opération facile et précise. L'idéal pour cette méthode est des tampons aqueux à faibles concentrations ioniques. La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm contre un échantillon appelé « blanc ». L'interférence par des contaminants se reconnaît par calcul d'un « ratio ». Les protéines absorbant à 280 nm, le ratio  $A_{260}/A_{280}$  est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8, tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. L'absorption à 230 nm reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillons purs, le ratio  $A_{260}/A_{230}$  devrait être d'environ 2,2.

Sur une longueur de parcours de 10 mm avec une longueur d'onde de 260 nm, l'absorption  $A = 1$  correspond à environ 50  $\mu\text{g/ml}$  de dsADN, environ 37  $\mu\text{g/ml}$  de ssADN, 40  $\mu\text{g/ml}$  d'ARN ou environ 30  $\mu\text{g/ml}$  d'oligonucléotides. En cas de contamination par une protéine, le rapport  $A_{260}/A_{280}$  sera nettement inférieur à 1.8 tandis qu'un rapport supérieur à 1.8 indique la présence d'ARN.

Nous avons effectué notre lecture des échantillons contre un blanc d'eau et nous avons utilisé le spectrophotomètre : « Jenway 6305 » calibré et étalonné.



# Partie II :

# Résultats et Discussion

Notre but étant d'avoir la meilleure qualité (pureté d'ADN) avec le meilleur rendement dans l'intervalle de temps le plus court possible, en sachant qu'il n'existe pas de protocole d'extraction d'ADN typique à l'espèce *Perinereis cultrifera*.

Comme l'extraction d'ADN est au cœur de tout travail de biologie moléculaire, nous souhaitant pouvoir optimisé ce protocole et maîtriser les éléments qui peuvent l'influence dans le but d'une robotisation de la méthode et ainsi pouvoir lancer une PCR des gènes marqueur et aussi séquencer ces gènes pour arriver à une comparaison phylogénétique.

### I. Relation entre la quantité d'ADN et le sexe des individus

*Perinereis cultrifera* est caractérisé par un cycle de vie de trois ans au niveau du littoral Est-Algérien (Younsi, 2006) et une durée du cycle de reproduction de 16 mois où les individus atteignent à sa fin une maturité sexuel pour pouvoir se reproduire. Pendant le cycle de cette espèce, trois classes de l'état sexuelles des individus sont observés : les mâles, les femelles et les individus indifférenciés qui ne présentant pas de produits génitaux dans leur contenu cœlomique. La comparaison de la quantité d'ADN issue des différentes classes sexuelles ne présente aucune relation qui a pu être établie [Fig. 27]. Le sexe des individus n'a aucun effet sur les la quantité d'ADN.

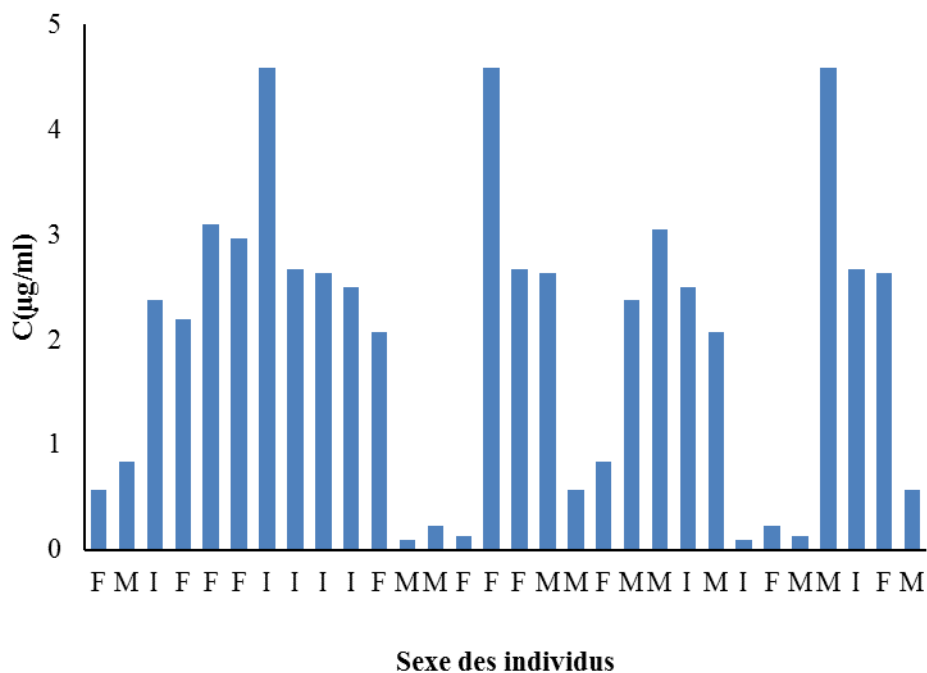
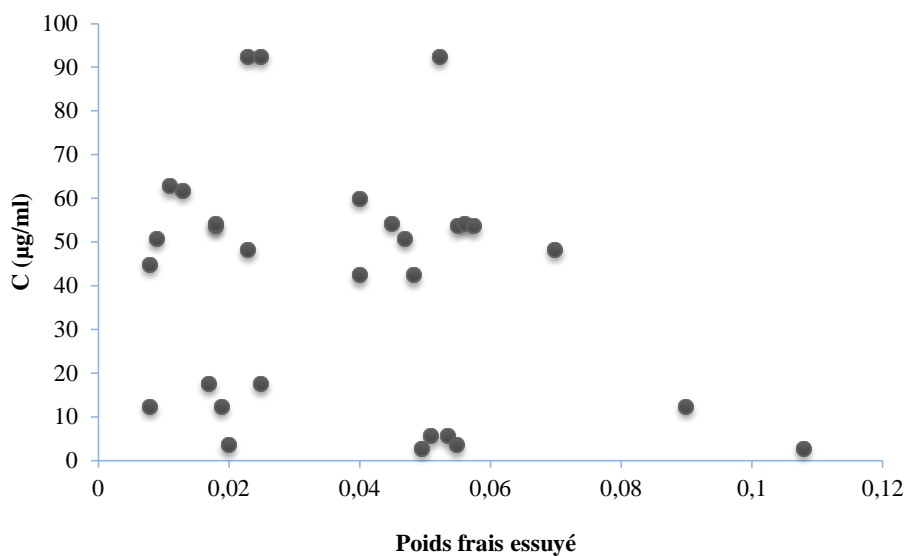


Figure 27 : Histogramme de la quantité d'ADN selon le sexe des individus



## II. Relation d'allométrie entre la quantité d'ADN et le poids des individus

Le poids frais essuyés des individus de *Perinereis cultrifera* provenant des quatre méthodes de récolte est différent. Ce dernier varie fortement selon le sexe et le cycle de développement. Cependant aucune relation d'allométrie n'a pu être mise en évidence entre le poids frais essuyés et la quantité d'ADN [Fig. 28]. Le poids des individus n'a aucune influence sur les transformations intra-individuelles dans la quantité d'ADN extraite.

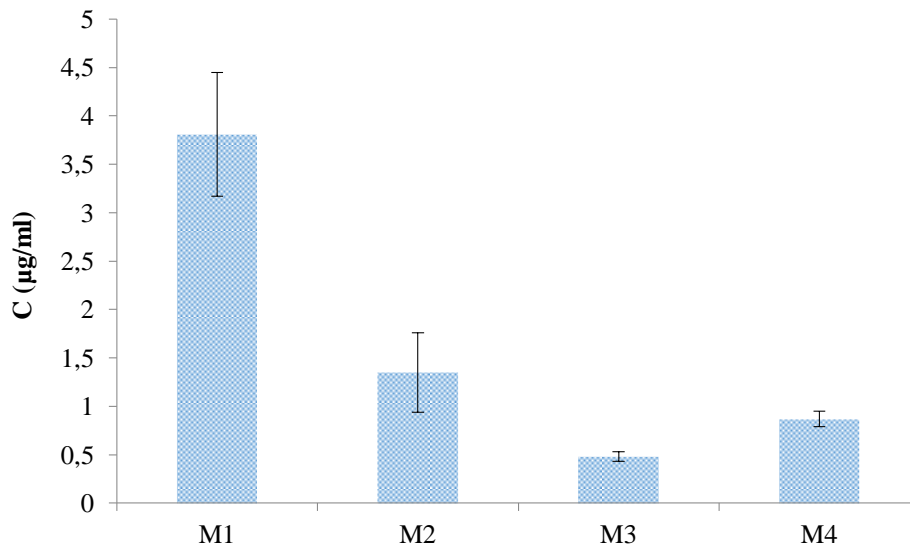


**Figure 28 :** Courbes de corrélation entre la quantité d'ADN et le poids des individus.

## III. Efficacité de la méthode de récolte

Le mode de récolte de nos individus (*Perinereis cultrifera*) et les méthodes de conditionnement influence énormément la qualité et la quantité des individus à cause du bris mécaniques suite au stress de la récolte, qui nous fait perdre une quantité importante de la biomasse.

Comme signalé auparavant, deux modes de récolte et deux méthodes de conditionnement ont été utilisés et nous voulions savoir les effets de chacune d'entre elles selon les produits utilisés et de montrer quelle sera la plus rentable pour notre extraction [Fig. 29].



M1 : Vers récolté à la main et conservé dans l'alcool 96%.

M2 : Vers récolté à l'eau de javel et conservé dans l'alcool 96%.

M3 : Vers récolté à la main et conservé dans du formol.

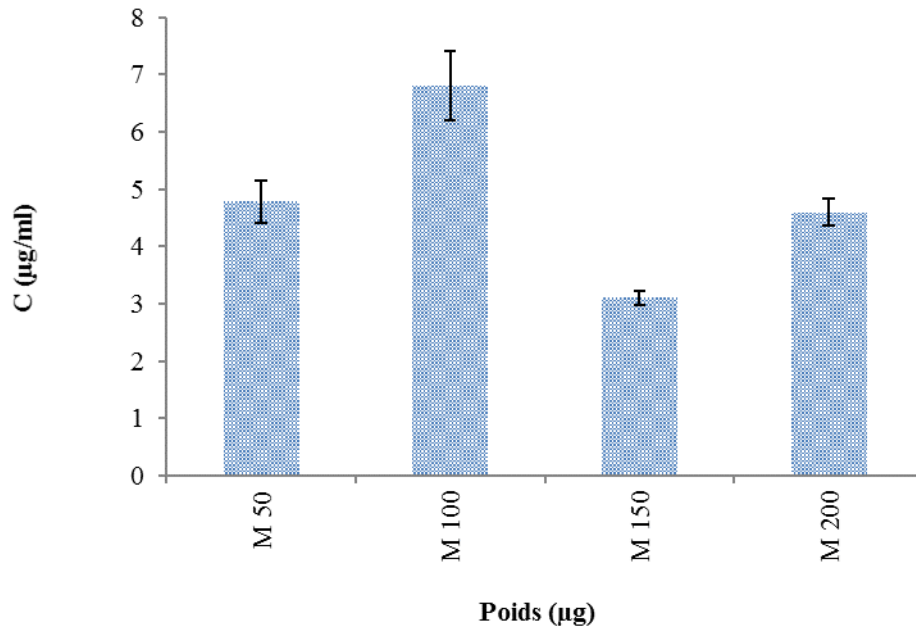
M4 : Vers récolté à l'eau de javel et conservé dans du formol.

**Figure 29 :** Histogramme de la quantité d'ADN selon mode de récolte et conditionnement.

La quantité d'ADN issue de chaque mode de récolte montre que la récolte à la main ou à l'aide d'un grattoir et la conservation dans l'alcool 96% donne les meilleurs résultats. Ceci est dû au fait que les individus sont moins stressés et peu d'individus coupés. Contrairement à l'utilisation de l'eau de javel pour forcer les vers de sortir de leurs galeries diminue énormément la quantité d'ADN et augmente le stress. La conservation dans l'alcool 96% préserve mieux notre ADN.

#### IV. Poids des échantillons et quantité d'ADN

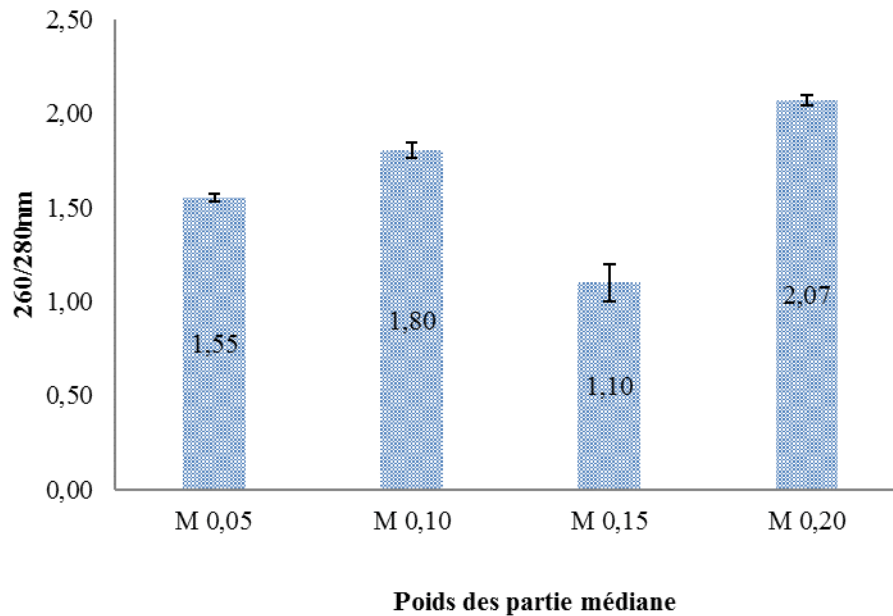
Les échantillons analysés de la partie médiane du corps des individus de *Perinereis cultrifera* ont été divisés en quatre catégories de poids : 50mg, 100mg, 150mg et 200mg et la comparaison des moyennes selon la figure 24 souligne que l'ADN issue des parties médianes dont le poids est entre 50 à 100mg nous a permis d'avoir la quantité d'ADN la plus élevée, ce qui confirme les résultats précédents [Fig.30].



**Figure 30 :** Histogramme de la quantité d'ADN selon les poids des échantillons.

## V. Pureté d'ADN

La concentration d'acides nucléiques est déterminée par une mesure effectuée à 260 nm et les protéines à 280 nm, le ratio  $A_{260}/A_{280}$  est utilisé pour estimer la pureté de l'acide nucléique. L'ADN pur devrait avoir un ratio d'environ 1,8 tandis que l'ARN pur devrait avoir une valeur d'environ 2,0. Dans cette optique nous avons calculé le rapport 260/280nm des échantillons issus de la région médiane et les résultats sont exprimés dans la figure 25. Nos valeurs sont comprises entre 1,55 et 2,07 et les échantillons dont le poids est de 100mg présente la meilleure pureté obtenue [Fig. 31].



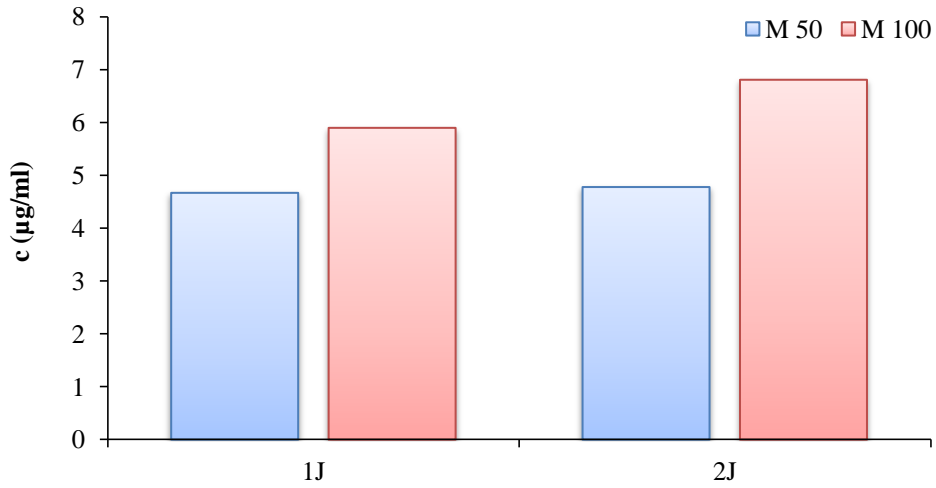
**Figure 31 :** Histogramme de pureté d'ADN selon les poids des échantillons des régions médiane.

## VI. La durée du protocole

Nous avons essayé de diminuer le temps d'incubation par moitié ce qui nous a permis de réduire le temps du protocole à une journée. En sachant que le protocole initial était sur deux jours [Fig.32].

- Incuber le tampon d'Extraction à 60°C pendant une heure de temps sans échantillons (600 microlitres par tube ependorf).
- Après une heure, ajouter l'échantillon au 600 microlitres de solution déjà chaud et incuber à 60°C pendant 2 heures.
- Passer au vortex les ependorfs.
- Centrifuger à 3800rpm pendant 20 min et transférer dans un ependorf de 1.5 ml.
- Ajouter un volume égale de (Chloroforme + Éthanol, 4 ; 96 / 0.08 ml et 1.92 ml) et bien mélanger par renversement pendant 3 Minutes.
- Centrifuger à 3800rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Récupère le surnageant et le transférer dans un ependorf propre.
- Ajouter  $\frac{2}{3}$  de volume de propanol.
- Laisser précipiter pendant 1 heure à 4°C.
- Centrifuger 10 minutes à 3800rpm à 4°C.
- Laver le culot avec 500 microlitre d'éthanol 75%.

- Centrifuger 10 minutes à 3800rpm à 4°C.
- Sécher le culot à l'aire libre pendant 10 minutes et reprendre dans 50 microlitres d'H<sub>2</sub>O incubant à 37°C resuspendre l'ADN.
- Conserver à 4°C.



**Figure 32** : Histogramme de quantité d'ADN selon la durée du protocole.



# Conclusion Et Perspective

L'extraction d'ADN chez *Perinereis cultrifera* est l'étape ultime et la plus importante pour entamer le processus de séquençage des gènes marqueurs, ce qui va nous permettre d'effectuer une comparaison phylogénétique et pouvoir répondre au complexe de cette espèce d'une façon moléculaire.

L'ensemble des résultats démontre que la récolte à la main avec une conservation à l'éthanol 96% et des échantillons compris entre 50 et 100mg provenant des régions médiane des individus de *Perinereis cultrifera* peuvent nettement améliorer la quantité et la qualité de l'ADN extraite.

Pour essayer d'apporter d'autres améliorations nous pensant que le remplacement du SDS par la protéinase K et espacé le protocole sur trois jours pourra donner plus de temps pour la précipitation de l'ADN et protocole sera comme ci-dessous :

**Tampon CTAB :**

CTAB 2%

PVP 1%

NaCl 1.4M

b-mercaptoethanol 0.2%

EDTA 20mM

Tris HCL ph 8.0 100mM

(Normalement, le mélange doit être homogène sans cristaux)

A mettre séparément Protéinase K 0.1 mg/ml.

**Jour 1 :** (2ml du tampon CTAB)

- Incuber le tampon (600 microlitres par tube epindorf) à 60°C pendant une heure sans échantillon et sans protéinase K.

\*tissus : couper en fine lamelles pour un poids de 50 mg et épongé le surplus d'alcool.

- Après une heure, ajouter l'échantillon au 600 microlitres de solution CTAB déjà chaud et incuber à 60°C pendant une nuit après avoir ajouté la protéinase K.

**Jour 2 :**

Passer au vortex les epindorfs.

- Centrifuger à 14000 rpm pendant 25 min et transférer dans un epindorf de 1.5 mL.

- Ajouter un volume égal de CIA (Chloroforme + Alcool isoamylique, 96 :4 / 1.92ml et 0.08 ml ) et bien mélanger par renversement pendant 3 minutes.
- Centrifuger 15 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Récupérer le surnageant et le transférer dans un epindorf propre.
- Ajouter 1 microlitre de RNase /epindorf puis incuber à 37°C pendant 1 heure.
- Ajouter 2/3 de volume d'isopropanol glacé.
- Laisser précipiter pendant une nuit à -20°C.

**Jour 3 :**

- Centrifuger 10 minutes à 15 000 rpm à 4°C.
- Laver le culot avec 500 microlitre d'éthanol 75%.
- Centrifuger 10 minutes à 15000 rpm à 4°C.
- Sécher le culot à l'aire libre pendant 10 min (3 minutes speedvac) et reprendre dans 50 microlitres d'H<sub>2</sub>O incubant à 37°C resuspendre l'ADN. 3fois à 1 minute.
- Conserver à -20°C.
- Préparation pour la lecture 45 µL d'H<sub>2</sub>O pure et 5µL de notre solution ADN.





# Références Bibliographique

**Référence bibliographique :****Livre :**

- Beaumont A., Cassier P., biologie animale des protozoaires épithélienneuriens .Tome 1.3<sup>e</sup> ed .paris: dunode, 2004,459P.
- Beaumont A., Cassier P. travaux pratiques de biologie animale .zoologie embryologie histologie .3<sup>e</sup> ed. Lieu d'édition : dunode, 2010, 502P. ISBN : 978-2-10-053711-2.
- Beaumont S., Biologie moléculaire. Paris : dunod, 2007, 299P. ISBN : 978-2-10-051041-2.
- Chapin F. S., Zavaleta E. S., Eviner V. T., Naylor R. L., Vitousek P. M., Reynolds B. L., Booper D. U., Sala O. E., Bobbie S. E., Mack M. C., Diaz S., Consequences of changing biodiversity. *Nature*, 2000.405P.
- Claude C., Principes de zoologie :(structure-fonction et évolution). Paris : dunode, 1999,203P.ISBN : 2100070088.
- Étienne J., et Clauser É., Biochimie, biologie moléculaire. 8<sup>eme</sup> ed .paris :masson, 2004,409P.ISBN : 2-294-01357-3.
- Henri T., Philippe R., Bournd M., et Philippe U., Invertébré d'eau douce .systématique, biologie, écologie. Paris : éditeur, 2010, 607P. ISBN : 978-2271-06945-0.
- Housset C. et Raisonier A.,Biologie Moléculaire. Paris : faculté de médecine (pierre et marcurie) : 2006, 204p.
- Kolb et Whishaw, Cerveau &Comortement, *Dunod*, Espagne, 2002, 633P.
- Maftah A., petit J. et julien R., Biologie moléculaire. Paris : dunod, 2007, 222P. ISBN : 978-2-10-050556-9.
- McKinney M. L., On predicting biotic homogenization: species-area patterns in marine biota. *Global Ecology and Biogeography Letters*,1998, 7 (4): 297 - 301.
- Moussard C., biologie moléculaire biochimie des communications cellulaires. Belgique : de boeck, 2005, 311p.ISBN : 978-2-8041-3488-4.
- Pierre P., Grassé, Raymond A., poisson, Odette Tuzet. Zoologie. I invertébrés. 2<sup>eme</sup> ed. paris : masson et C<sup>ie</sup> éditeurs, 1970.935P.

- Porchet M., 1996. Transitions écologiques chez les annélides. *Bull. Soc. Zool., Fr.*, 121 (2) : 223-229.
- Raven, Johnson, Mason, Losos and Singer. *biologie*. 3<sup>ème</sup>ed. france: de boeck, 2014, 1279p. ISBN:978-2-8041-8458-2.
- Scaps P., Retière C., Desrosiers G. & Miron G., 1992. Dynamique d'une population de *Perinereis cultrifera* de la côte nord bretagne. *Cah. Biol. Mar.*, 33 : 477-494.
- Taleb M.Z., Boutiba Z., La moule *Mytilusgalloprovincialis*: Bioindicatrice de pollution marine- cas du port d'Oran. *Sciences & Technologie*, 2007.25C : 59-64.
- Turner P.C., Clennan M., Dates A.D., et White M.R.H., L'essentiel en biologie moléculaire. berti. lieu d'édition : port royal livres, 2000,345P.
- Véronique Gilliquet, *Biologie 6<sup>e</sup> édition- sciences générales, de boeck*, Belgique, 2009 356P.
- Walther G. R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T. J. C., Fromentin J.M., Hoegh-Guldberg O., Bairlein F., 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416: 389 - 39.
- Watson J., Taria B., stephenbell, alexandergann, michellevine et richard losick. *Biologie moléculaire du gene*. 6<sup>ème</sup>ed. France: pearson (education), 2009, 688P.
- Werner M., *biochimie et biologie moléculaire*. paris : dunod, 2007, 654p.

**Sites internet :**

[01] [http://www.bibliomer.com/documents/fiches/fiche\\_ensavoirplus\\_lien\\_extraction\\_ADN\\_vf.pdf](http://www.bibliomer.com/documents/fiches/fiche_ensavoirplus_lien_extraction_ADN_vf.pdf) Consulté le 22/02/2015.

[02] <http://www.perso.univ-rennes1.fr/sebastien.dugravot/CM1%20J%20Russo> Consulté le 12 /02/2015.

[03] [www.afo.ulg.ac.be/fb/ens/2012-2013/.../ZooloSemin2012.pdf](http://www.afo.ulg.ac.be/fb/ens/2012-2013/.../ZooloSemin2012.pdf) Consulté le 18/02/2015.

[04] [www.lptmc.jussieu.fr/user/barbi/ENSEIGNEMENT/.../cours-séquences](http://www.lptmc.jussieu.fr/user/barbi/ENSEIGNEMENT/.../cours-séquences) Consulté le 18/02/2015.

[05] [www.rna.igmors.u-psud.fr/gautheret/cours/L2-ADN1.pdf](http://www.rna.igmors.u-psud.fr/gautheret/cours/L2-ADN1.pdf) Consulté le 17/02/2015.

[06] [www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BMbioch/bmbioch.pdf](http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BMbioch/bmbioch.pdf) Consulté le 10/01/2015.

**Articles :**

- Lopez G.R. et Levinton J.S., 1987 • Ecology of deposit-feeding animals in marine sediments. *Quart. Rev. Biol.*, 62: 235-259.
- Rouabah A. et L. Rouabah, (2007), Biodiversité et complexe d'espèces *perinereis cultrifera*: un exemple de spéciation, *Sciences & Technologie*, 25 : pp.79-87.
- Robert manaranghe « annélides », *encyclopediauniversalis* [en ligne], consulté le 6 janvier 2015, disponible sur : <http://www.universalis.fr/encyclopedia/annélides/>.
- Somma. M, (2002), Analyse d'échantillons alimentaires pour la présence d'organismes génétiquement modifiés -Extraction et purification de l'ADN-, *Institute for Health and Consumer Protection*, 19: 3-18.

**Mémoires :**

- Allouti N., Étude écotoxicologique de deux Néréidés : *Pernereis cultrifera* et *Neriesfalsa* (annélides, polychètes) dans l'Est Algérien (El-Kala, Skikda) : Cycle de reproduction, activité biochimique et enzymatique, Annaba : université Badji Mokhtar, 2011, 94p.
- Caner F., 1981. Contribution à l'étude biochimique de l'ovogenèse de *Perinereis cultrifera* (Annélide Polychète). Mémoire, Université de Lille, N° 906.
- Rouabah A., 2003. Comparaison au plan biochimique et génétique de population de l'annélide polychète *Perinereis cultrifera* du littoral français et algérien: précision des liens de parenté. *Thèse de doctorat, Université de Mentouri Constantine*.
- Scaps P, Bases Biologiques de l'élevage de deux espèces d'Annélides polychètes *Nereis diversicolor* (O.F. Müller) et *Perinereis cultrifera* (Grübe), Université de Rennes, 1992, 171P.
- Younsi M., Contribution à l'étude de la position taxonomique de *Perinereis cultrifera* au niveau du bassin méditerranéen- Littoral Nord Est Algérien -, Constantine : Université Mentouri, 2006, 139P.



# Annexe

Les produits	Composition chimique	Rôles
<b>Chloroforme</b>	$\text{CHCl}_3$ « Trichlorométhane »	◆ précipitation de l'ADN.
<b>EDTA</b>	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ « Acide Éthylène Diamine Tétracétique »	◆ permet de chélater la majorité des cations bivalents ( $\text{Mg}^{2+}$ ). ◆ cofacteur de nombreuses DNAses.
<b>Ethanol 75%</b>	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	◆ Lavage de l'ADN.
<b>Ethanol 95%</b>	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	◆ La conservation des échantillons.
<b>Formol</b>	$\text{CH}_2\text{O}$	◆ La conservation des échantillons.
<b>Ethanol 96%</b>	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	◆ Elimination des sels et précipitation de l'ADN.
<b>Propanol-1</b>	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$	◆ Précipitation de l'ADN.
<b>NaCl</b>	Chlorure de Sodium	◆ limite les dénaturations partielles possibles de l'ADN à 70°C. ◆ libère de nombreuses interactions ADN – protéines.
<b>SDS</b>	$\text{NaSO}_4(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$ « Dodécyl Sulfate de Sodium »	◆ La lyse des cellules. ◆ La dénaturation des protéines.
<b>Tris- HCl</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol « trishydroxyméthylaminométhane »</li> <li>• l'acide chlorhydrique</li> </ul>	◆ Rôle tamponneur à pH8.



# Glossaire

## A

**Adénine** : base azotée purique (base A) qui s'apparie par deux liaisons hydrogène à la thymine (base T) dans un ADN bicaténaire ou à l'uracyle (base U) dans un ARN bicaténaire. On trouve cette base dans différentes molécules comme l'ADN, l'ARN, l'ATP, l'AMPc, le NAD ou le FAD.

**Algues** : Organismes essentiellement aquatiques, les algues constituent un ensemble de végétaux très variés, souvent groupés avec des champignons sous le nom de thallophytes (présence d'un appareil végétatif, le thalle et absence de racines, de tiges et de feuilles). A la différence des champignons, les algues possèdent des chloroplastes et sont donc photosynthétiques. Leurs dimensions varient depuis la formes unicellulaire jusqu'aux formes filamenteuses atteignant un mètre de longueur.

## B

**Base azotée** : (base nucléotidique) composant moléculaire d'un acide nucléique ; il existe des bases à un seul cycle (bases pyrimidiques : la cytosine, l'uracile et la thymine) et d'autres à deux cycles (bases puriques : l'adénine et la guanine). Des liaisons hydrogènes relient entre elles les bases complémentaires d'un acide nucléique bicaténaire.

## C

**Carte de restriction** (*restriction map*) : représentation graphique des sites de restriction (emplacement des sites de coupures reconnus par des endonucléases de restriction) sur une molécule d'ADN.

**Clonage d'ADN** (clonage de gène ; DNA cloning) : réplique d'un fragment d'ADN (gène d'intérêt ou transgène) intégré (gène recombiné) dans une molécule d'ADN vecteur ; cette réplique a lieu dans un organisme ou un microorganisme (cellule hôte) ayant incorporé le vecteur contenant le gène recombiné. On parle de gène cloné quand on obtient, par cette méthode, de nombreux exemplaires de ce gène de départ. On peut cloner indifféremment des fragments d'ADNc (construction de banques d'ADN génomique).

**Cytosine (C)** : base azotée pyrimidique participant à la construction des molécules d'ADN et d'ARN ; s'apparie à la guanine (G) par trois ponts hydrogènes (liaisons H).

## E

**Electrophorèse** (*electrophoresis*) : technique de séparation de molécule (acides nucléiques ou protéines) dans un gel (formé d'agarose ou de polyacrylamide) sous l'effet d'un champ électrique ; cette séparation se fait en fonction de leur masse moléculaire (en



Kilobases pour les ADN et les ARN ; en KDA pour les protéines) quand ces molécules sont toutes chargées de la même manière.

**Espèce** : groupe d'organismes se reproduisant naturellement entre eux par voie sexuée. La notion d'espèce chez les microorganismes est plus difficile à définir ; on la remplace souvent par celle de souche.

C'est un groupe d'individus présentant des caractères morphologiques, physiologique et écologiques identiques, et qui sont effectivement ou potentiellement interféconds, isolés par rapport aux groupes similaires au plan de la reproduction.

## F

**Fécondation** : Mécanisme par lequel deux cellules reproductrices sexuelles (gamètes), l'une mâle, l'autre femelle, s'unissent pour constituer la cellule-œuf (zygote), d'où un nouvel être prendra vie. Le rôle de la fécondation dans la transmission des caractères héréditaires est primordial, car la fécondation est concrétisée par le fait que la cellule œuf (et l'individu qui en provient) a reçu des deux gamètes qui l'ont constitué une hérédité biparentale.

## G

**Gamète** (*gamete*): cellule germinale spécialisée (issue de la gamétogenèse), contenant un nombre de chromosomes haploïde, qui permet aux organismes de se reproduire (reproduction sexuée), en fusionnant avec un autre gamète de type sexuel opposé ; on distingue les gamètes mâles (spermatozoïdes ou grain de pollen) des gamètes femelles (ovules) ; la fusion de deux gamètes donne un œuf (zygote) diploïde.

**Gène** (*gene*): unité fonctionnelle de l'hérédité ; c'est la région d'une molécule d'ADN qui porte l'information nécessaire à la production d'une chaîne polypeptidique ou d'une molécule d'ARN (ARNr ou ARNt, par exemple). Les différentes formes d'un gène sont les allèles.

**Genre** : Rang de la classification systématique qui regroupe des espèces ayant des caractères communs. Le genre se situe au-dessous de la famille et au-dessous de l'espèce.

**Guanine (G)** : base azotée purique participant à la construction des molécules d'ADN et d'ARN ; elle s'apparie à la cytosine (C).

## L

**Liaison hydrogène** (liaison H ; pont hydrogène ; *hydrogen bond*) : liaison faible (non covalente) dans laquelle un atome partage un électron avec un atome d'hydrogène. Ces

liaisons sont particulièrement importante dans l'appariement des bases azotées d'un acide nucléique bicaténaire.

**Liaison phosphodiéstères** (*Phosphodiester bond*): liaison covalente entre deux nucléotides adjacent sur une même chaîne d'acide nucléique ; cette liaison se forme entre le groupement 5'-phosphate (5'-P) d'un nucléotide et le groupement 3'-hydroxyle (3'-OH) du nucléotide voisin (dans le squelette sucre-phosphate de l'ADN ou de l'ARN).

## M

**Mâle** : Qui est de sexe masculin. Qui appartient au sexe fécondant, porteur de cellules reproductrices plus nombreuses, plus petites et plus mobiles que celles du sexe féminin.

## P

**Protozoaire** : Être unicellulaire à noyau distinct, sans chlorophylle, souvent muni d'une bouche, et le plus souvent mobiles. On distingue quatre groupes principaux : Rhizopodes (amibes), flagellés (trypanosome), ciliés (paramécie), sporozoaires (plasmodies).

## R

**Reproduction** : Fonction par laquelle les êtres vivants perpétuent leur espèce. On distingue la reproduction sexuée, où interviennent des cellules haploïdes des deux sexes, les gamètes, dont l'union est la fécondation, et la reproduction intervention de gamètes. (Bourgeoisement et scissiparité des animaux ; bouturage et greffage des végétaux).

## S

**Sexe** : Ensemble des caractères qui permettent de distinguer, dans toutes les espèces animales et végétales, à l'exception des organismes inférieurs, deux genres, mâle et femelle, dont l'union permet la reproduction.

**Stérilisation** (stérile : Exempt de tout germe microbien) : Action de détruire les microbes existant dans une substance ou sur un objet par des procédés physiques (chaleur, radiations ultraviolettes) ou chimiques (antiseptiques).

## T

**Tampon** (solution tamponnée) : solution saline capable de stabiliser la valeur du PH dans une certaine gamme ; elle interagit avec les ions hydrogène ( $H^+$ ) ou hydroxyle ( $OH^-$ ) libres.

**Thymine (T)** : base azotée purique participant à la construction des molécules d'ADN ; s'associe de manière spécifique à l'adénine (A) par deux liaisons hydrogène (liaison H ou pont hydrogène).

## Résumé :

L'évaluation de la diversité génétique des invertébrés (annélides) est une étape indispensable à la définition des stratégies de leur développement ou leur amélioration génétique. L'application de la biologie moléculaire pour étudier la variabilité génétique des animaux restée pendant longtemps limitée par les difficultés d'extraction de l'ADN, notamment chez les annélides polychètes telle que *Perinereis cultrifera*. Cette espèce est un ver marin très répandu sur toutes nos côtes.

C'est pour cette raison nous avons porté des améliorations sur le protocole d'extraction d'ADN. Ces ajustements nous ont permis de mettre au point une méthode plus efficace pour l'extraction de l'ADN de très bonne qualité à partir des *Perinereis cultrifera* de la région de Annaba, El-Taref et Tlemcen.

**Mots clés :** Annélides, *Perinereis cultrifera*, extraction, ADN, diversité génétique.

## Abstract:

Evaluation of the genetic diversity of invertebrates (annelids) is an essential step in defining strategies for their development or genetic improvement. The application of molecular biology to study the genetic variability of animals long remained limited by DNA extraction difficulties, especially among polychaete annelids as *Perinereis cultrifera*. This species is a very common marine worm on all our coasts.

That is why we have brought improvements in DNA extraction protocol. These adjustments allow us to develop a more effective method for the extraction of high quality DNA from *Perinereis cultrifera* the Annaba region, El-Tarf and Tlemcen.

**Keywords:** Annelids, *Perinereis cultrifera*, extraction, DNA, Genetic diversity.

## ملخص :

تقييم التنوع الجيني لللافقاريات (الحلقيات) هو خطوة أساسية في تحديد استراتيجيات لتطويرها أو التحسين الوراثي. تطبيق البيولوجيا الجزيئية لدراسة التباين الوراثي للحيوانات ظلت لفترة طويلة محدودة لصعوبات استخراج الحمض النووي، وخصوصا بين الحلقيات المتعددة الأشواك كما عند *Perinereis cultrifera*. هذا النوع هو دودة البحرية الشائعة جدا في جميع سواحلنا.

هذا هو السبب الذي حققناه تحسينات في بروتوكول استخراج الحمض النووي. هذه التعديلات تسمح لنا بتطوير طريقة أكثر فعالية لاستخراج ADN

ذات جودة عالية من *Perinereis cultrifera* من منطقة عنابة، الطارف وتلمسان

**كلمات البحث:** الحلقيات، *Perinereis cultrifera*، الاستخراج، DNA، والتنوع الوراثي.