

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

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



Mémoire de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie / **Filière** : Biologie

Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Biologie Moléculaire des Procaryotes

Optimisation d'un protocole d'extraction d'ADN d'un annélide polychète « *Perinereis cultrifera* »

Présenté par :

- HAMPLAOUI HANANE
- LAZEZIA NADIA
- ZEDADRA KARIMA

Devant le jury composé de :

- Promoteur : YOUNSI. M. (M.A.B.Univ de Guelma)
- Président : BENOUARETH. D. E (Pr.Univ de Guelma)
- Examineur : ADRAR. N. (M.A.B.Univ de Guelma)

Juin 2013

Remerciements

Ce mémoire doit beaucoup aux nombreuses personnes qui nous ont encouragé, soutenu et conforté au long de toutes ces années. Qu'elles trouvent dans ce travail l'expression de nos plus sincères remerciements.

Nous remercions tout particulièrement :

- *Monsieur YOUNSI MOURAD pour avoir proposé, accepté et encadré ce mémoire.*
- *Les membres du jury Monsieur BENWARETH. D et Monsieur ADRAR. N pour avoir accepté de participer à notre jury de mémoire.*
- *Nos familles pour leurs patiences, leurs soutiens permanents et leurs encouragements.*
- *Nos collègues du master pour leur enthousiasme et leur solidarité.*
- *L'équipe pédagogique et administrative pour la richesse de ses apports et sa disponibilité.*

Merci 

DEDICACE

A mes parents HAMPLAOUI TAHER et CHEGHIBE DJAHIDA.

A mes frères et sœurs MAHDI (et sa femme KHAWLA), DJALLEL, WIDED et MANEL.

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et
chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

A mes grands pères, grandes mères, oncles, tantes, cousins et cousines.

Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

Affectueuse reconnaissance.

A mes amis MAJDA, MERYEM, MERYEM KHADIJA, SOUAD et ZEINEB

et à leurs familles.

A mes camarades d'auditoires et tous ceux de la faculté de biologie de

l'Université 08 MAI 1945 GUELMA et à leurs familles.

Je dédie ce travail.

HANANE

DEDICACE

A mes parents ZEDADRA SAID et ZEDADRA ZOUHRA.

A mon frère et sœurs SOUFIAN (sa femme NAZIHA et ses enfants MERYEM et ABD ELRAHMAN), FOUAD, SABRINA (son mari TAOUFIK et ses enfants ARIDJ et RAID AHMED IEAD), DALLEL et WAHIBA (ADO).

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines.

Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

Affectueuse reconnaissance

A mes amis RIMA et ZAHRA.

et à leurs familles.

A mes camarades d'auditoires et tous ceux de la faculté de biologie de

l'Université 08 MAI 1945 GUELMA et à leurs familles.

Je dédie ce travail.

KARIMA

DEDICACE

A mes parents LAZEZIA MESSAOUD et TOUAHRI YAMINA.

A mon frère et sœurs AMMAR, AMEL (et son mari RIDAH et ses enfants RANIM NOUR IMAN et MOUHAMED RAMY), AMIRA et AMANI.

Vous vous êtes dépensés pour moi sans compter.

En reconnaissance de tous les sacrifices consentis par tous et chacun pour me permettre d'atteindre cette étape de ma vie.

Avec toute ma tendresse.

A mes oncles, tantes, cousins et cousines SALAH EDDINE, SAFA, SEIF et SANA.

Vous avez de près ou de loin contribué à ma formation.

Affectueuse reconnaissance

A mes amis ASMA, RABIE, RIMA et SOUAD.

et à leurs familles.

A mes camarades d'auditoires et tous ceux de la faculté de biologie de

l'Université 08 MAI 1945 GUELMA et à leurs familles.

Je dédie ce travail.

NADIA

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Introduction.....01

Chapitre I : Généralité

I - Partie 01 : Les Annélides

1. Les Annélides.....	04
2. Embranchement des Annélides	05
2.1. Classe des Oligochètes.....	05
2.2. Classe des Hirudinées.....	05
2.3. Classe des Polychètes.....	06
3. <i>Perinereis cultrifera</i>	07
3.1. Taxonomie.....	09

II - Partie 02 : ADN

4. L'ADN.....	11
5. La structure de l'ADN.....	14

Chapitre II : Partie pratique

I - Matériels et méthodes

1. Présentation du site d'étude.....	16
2. Mode de récolte et traitement des individus.....	18
3. Relation entre poids frais essuyé et poids partiel formolé.....	19

4. Distribution de fréquence de taille.....	21
5. Extraction d'ADN.....	22
5.1. Préparation du Tampon et Protocole d'extraction (D.Jolivet).....	22
5.2. Quantification de l'ADN par spectrophotométrie.....	25

II- Résultats et discussion

1. Relation d'allométrie entre la quantité d'ADN et le poids des individus.....	26
2. Relation entre la quantité d'ADN et le sexe des individus.....	27
3. Efficacité de la méthode de récolte	27
4. Segmentation du ver et quantité d'ADN.....	28
5. Poids des échantillons et quantité d'ADN.....	29
6. Pureté d'ADN.....	30
Conclusion.....	31

Bibliographie

Annexe

Glossaire

Résumé

Liste des abréviations

° : degré

°C : degré celsius

% : pourcent

µg : micro-gramme

µL : micro-litre

A : absorption

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

C : cytosine

CTAB : cetyltriméthylammonium bromide

DO : densité optique

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

etc. : etcetera

exp. : exemple

F : femelle

Fig. : figure

G : guanine

g : gramme

H₂O : eau

HCl : chlorure d'hydrogène

Km : kilomètre

KMnO₄ : permanganate de potassium

L : litre

M : molaire

M. : male

min : minute

Mg : milligramme

ml : millimètre

mM : millimolaire

mm : millimètre

n° : numéro

NaCl : chlorure de sodium

nm. : nanomètre

P.cultrifera : *Perinereis cultrifera*

rpm : rotations par minute

sb : double brins

SDS :sodium dodecyl sulfate

ss : simple brin

T : thymine

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

Liste des figures

Figure01 :Structure générale de <i>Perinereis cultrifer</i>	08
Figure02 : Coupe transversale d'un segment moyen du corps de <i>Perinereis cultrifera</i>	09
Figure03 :Détail de la partie antérieure dorsal de <i>Perinereis cultrifera</i>	10
Figure04 :Le nucléotide.....	12
Figure05 : L'acide phosphorique.....	13
Figure06 : Le désoxyribose.....	13
Figure07 : Les bases azotées.....	14
Figure08 :Les différentes structures de l'ADN.....	15
Figure09 : localisation du site d'échantillonnage de <i>Perinereis cultrifera</i> Sur le littoral Nord Est Algérien à Elkala.....	16
Figure10 : site d'échantillonnage de <i>Perinereis cultrifera</i> Sur le littoral Nord Est Algérien àElkala.....	17
Figure11 : Les bouteilles comprend les échantillons.....	18
Figure12 :Division de l'individu <i>Perinereis cultrifera</i>	19
Figure13 : Relation entre poids partiel formolé essuyé et poids frais essuyé.....	20
Figure14 : Histogramme de distribution de fréquence du rang de cassure.....	21
Figure15 : Préparation du tampon CTAB.....	22
Figure16 : Agitation du tampon.....	23
Figure17 : L'incubation du tampon et des échantillons.....	23
Figure18 :Les étapes d'extraction d'ADN.....	24

Figure19 : Courbes de corrélation entre la quantité d'ADN et le poids des individus.....	26
Figure20 : Histogramme de la quantité d'ADN selon le sexe des individus.....	27
Figure21 : Histogramme de la quantité d'ADN selon mode de récolte et conditionnement.....	28
Figure22 : Histogramme de la quantité d'ADN selon la segmentation du ver.....	29
Figure23 : Histogramme de la quantité d'ADN selon les poids des échantillons.....	29
Figure24 : Histogramme de pureté d'ADN selon les poids des échantillons de régions médiane.....	30

INTRODUCTION

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 [01]. 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).

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 Wishaw, 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^e 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

aves les espèces voisines et un adjectif ou substantif qui la qualifie (Véronique Gilliquet, 2009).

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.

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 phylogénétique, 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 phylogénétique 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. M, 2002). L’extraction de l’ADN est une technique qui isole de l’ADN à partir d’une cellule en quantité et en quantité suffisante pour permettre son analyse [2].

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). Ainsi, selon Knox (1977), les polychètes constituent 35 à 50% des espèces macrobenthiques. De par la diversité des milieux marins qu’ils ont colonisés, depuis la zone de balancement des marées jusqu’aux grands fonds abyssaux sur les fonds durs comme sur les fonds meubles, la variété de leur régime alimentaire (Fauchald et Jumard, 1979) et leur forte biomasse, les polychètes jouent un rôle majeur dans le fonctionnement des communautés benthiques.

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-Algerien 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)

Les quelques études entreprises sur *Perinereis cultrifera* ont surtout été d'ordre écologique et éthologique (Marcel, 1962 ; Boisseau, 1962) et moins d'ordre génétique. Or, comme l'ont déjà signalé de nombreux auteurs, il est fondamental de bien préciser le statut taxonomique des espèces d'importance commerciale et/ou écologique.

Les données de la littérature indiquent que *Perinereis cultrifera* peut être considérée comme une espèce à répartition cosmopolite. Cependant, le statut taxonomique de nombreuses espèces d'annélides polychètes demeure à ce jour peu développé et celui de certaines espèces n'est toujours pas résolu.

La synthèse des données portant sur *Perinereis cultrifera*, révèle que la période et le mode de reproduction (atoque ou épitoque), l'âge à maturité et les paramètres biométriques varient fortement selon la localisation géographique des populations (Rouabah, 2003). Ainsi, l'ensemble de ces constatations permet de soulever la question suivante : est-ce que l'existence de deux stratégies de reproduction et de différents morphotypes est le résultat de conditions écologiques différentes agissant sur les modalités de reproduction et de la croissance ou est-elle d'ordre génétique ?

Afin de répondre à cette question, 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 qui porte sur l'optimisation d'une 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.

Notre objectif actuel est d'obtenir une quantité d'ADN suffisante avec une bonne qualité non contaminé par l'ARN ou des protéines.

CHAPITRE I :

GÉNÉRALITÉS

PARTIE 01 : LES ANNELIDES

Les annélides participent de façon importante dans l'équilibre et le recyclage des matières organiques à l'intérieur des sédiments (Hutchings, 1998). Ainsi certaines espèces, de par leur intense activité galéicole et tubicole exercent une action sur l'environnement sédimentaire marin et sur les populations qui y vivent.

De plus, leur faible capacité à se défendre et surtout leur grande valeur nutritive, conséquence d'un corps mou facilement assimilable par d'autres organismes, les Annélides Polychètes servent de proies à une grande variété d'espèces animales, pélagiques ou présentes dans ou à la surface des sédiments, mais aussi, en milieu intertidal, aux oiseaux limicoles.

L'extension récente de la pêche récréative, le développement de l'aquariologie et la nécessité de trouver une nourriture d'appoint pour les stades larvaires des espèces de poissons et de crustacés ayant une valeur économique, entraînent à l'heure actuelle une demande de plus en plus importante des annélides polychètes, ce qui explique leur place prépondérante dans les chaînes alimentaires (Scaps, 1992).

1. Les annelides

Les Annélides (vers annelés) sont des Métazoaires triploblastique coelomates. Avec ce groupe un pas évolutif décisif est fait : le troisième feuillet embryonnaire ; le mésoderme, présente un développement conséquent et se creuse de deux cavités par segment qui constituent le coelome. Leur corps est constitué d'unités anatomique disposées les unes à la suite des autres ; cette multiplication des parties est aussi un critère fondamental d'évolution. Chaque partie est appelée métamère ou segment. Deux métamères consécutifs sont séparés par une cloison.

Les Annélides sont organisés selon une symétrie bilatérale sans ambiguïté, ce sont des Artiozoaire. Le développement embryonnaire passe par une segmentation caractéristique de l'œuf, la segmentation spirale, qui aboutit, après gastrulation, à une larve nageuse typique, la larve trochophore. (James Maissiat et *al.*, 2005).

Les Annélides sont les seuls Animaux sans vertèbres qui aient le sang rouge, Il circule dans un double système de vaisseaux compliqués. (Annie Mamecier, 2006)

2. Embranchement des annelides

On distingue trois classes différentes chez les Annélides, selon l'importance, la discrétion ou l'absence de soies :

2.1. Classe des Oligochètes

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.

Chez les Oligochètes l'hermaphrodisme est de règle, leur développement est directe et s'effectue à l'intérieur d'un cocon. (James Maissiat et *al.* 2005; Jean-pierre Cornec et André Gilles. 2006).

2.2. Classe des Achètes

Les achètes (sangsues) environ 300 espèces, majoritairement dulcicoles comme les sangsues, mais dont certaines formes sont marines ou terrestres, ils n'ont ni parapodes, ni soies. Les sangsues sont hermaphrodites, il n'y a pas de stade larvaire libre, le développement a lieu dans un cocon.

Les achètes sont des annélides très évoluées ; ce sont pour la plupart des vers ectoparasites qui se nourrissent de sang des vertébrés et d'invertébrés. On les rencontre communément en eau douce ou dans la mer. (James Maissiat et *al.*, 2005).

2.3. Classe des Polychètes

Vers marins ; ce sont des Annélides dont les segments portent des expansions latérales ou parapodes sur lesquels sont implantées de nombreuses soies de nature chitineuse. Ces parapodes permettent à l'animal de nager, creuser ou ramper ; ceux des polychètes vivent dans des terriers ou des tubes qui aident à ancrer le ver, les parapodes jouent également fortement la surface du corps (James Maissiat et *al.*, 2005; Georges B. Johnson et *al.*, 2011).

Les Annélides polychètes, au nombre de 5000 espèces environ, sont presque tous marins et présentent deux modes de vie assez différents : les unes mènent une vie nomade, les autres, emprisonnées dans des habitacles variés, ont une vie sédentaire, et les sexes sont séparés.

Les polychètes constituent fréquemment une partie cruciales des chaînes alimentaires marines, et sont extrêmement abondants dans certains habitats certains de ces vers sont beaux, arborant des formes inhabituelles et souvent de couleurs chatoyantes (Georges B. Johnson et *al.*, 2011).

En se fondant sur les caractères de classification, il est possible de regrouper les nombreux ordres de polychètes en deux sous-classes : les Polychètes errantes, les polychètes sédentaires et un nouveau petit groupe des Archiannélides est actuellement séparé.

2.3.1. Les polychètes errants : sont caractérisées par leur corps allongé dont tous les métamères sont construits sur le même plan (métamère homonome) et par la présence de parapodes biramés (exceptionnellement uniramés) bien développé. La tête parfaitement individualisée porte, en relation avec la vie mobile et active, de nombreux organes sensoriels et la trompe est volumineuse, chez les formes prédatrices et carnassières elle est pourvue de mâchoire puissante.

2.3.2. Les polychètes sédentaires : tubicoles ou fouisseurs, sont caractérisés par l'apparition d'une division fonctionnelle des différentes parties du corps (région branchiale, thoracique, abdominale, caudale) et une altération plus ou moins profonde de la métamérie primitive. La tête est en générale bien développé, les parapodes sont simples, la trompe inerme, les organes sensoriels réduits ou hypertrophiés et annexés à la fonction alimentaire. Soies simples, en crochets, ou unciné.

2.3.3. Les Archiannélides : parmi les formes actuelles des Annélides Polychètes le groupe des Archiannélides (exp : *Polygorduis*) peut être séparé car il est présente un certain nombre de caractère considérés comme primitifs (métamérie régulière, sexes séparé, soies absentes ou simples, parapodes nuls ou réduits à des moignons) (André Beaumont et Pierre Cassier, 2004).

3. *Perinereis cultrifera*

L'annélide polychète *Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840) fait partie de la famille des *Nereididae*. Elle est connue en France sous l'appellation vernaculaire de « ver de roche » ou « esque semi-dure ». Ses populations naturelles sont déjà exploitées de façon régulière sur le littoral italien. De par sa répartition géographique, elle intéresse les pays de la façade atlantique (France, Grande-Bretagne, Portugal) et du pourtour méditerranéen (Algérie, Espagne, France, Italie, Tunisie) ; de plus, elle résiste très bien au conditionnement et tient parfaitement à l'hameçon. Compte tenu de sa taille, elle pourrait être substituée aux autres espèces appartenant au genre *Perinereis* qui sont importées en Europe. L'élevage industriel de cette espèce en cycle complet semble donc prometteur et doit être sérieusement envisagé (Scaps, 1992).

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.

Perinereis cultrifera est un ver qui mesure quelques centimètres de long et 4 à 5 mm de large. Le corps est divisé en une centaine de métamères, tous semblables, à l'exception des deux segments les plus antérieurs constituant la tête, et du dernier segment ou pygidium. A la tête font suite un grand nombre de segments munis latéralement de parapodes portant des faisceaux de soies chitineuses (Fig. 1).

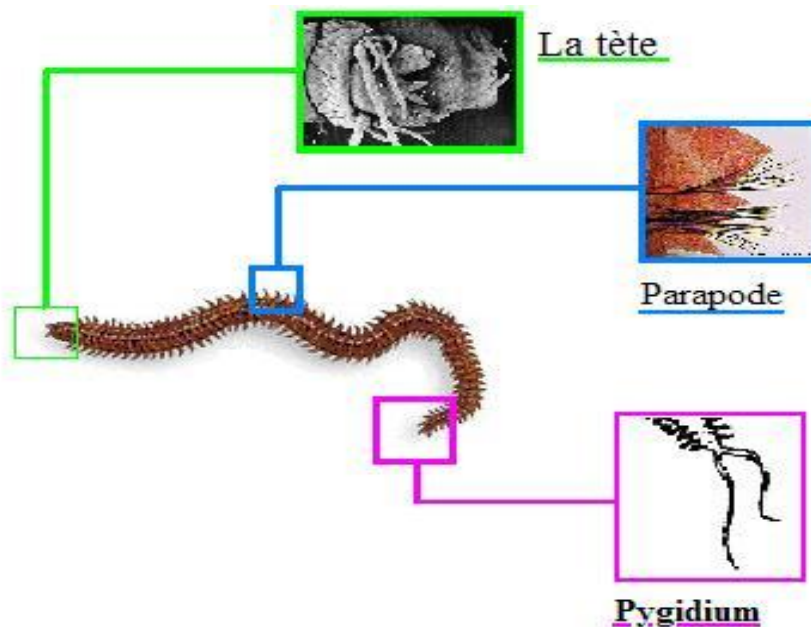


Figure 1 : Structure générale de *Perinereis cultrifera* (in Maltagliati, 2005).

Une coupe transversale pratiquée dans un segment moyen permet de situer les différents organes. Sous l'épiderme se trouve une couche de muscles circulaires transversaux et quatre muscles longitudinaux (Fig.2). Dans l'espace laissé libre par la masse musculaire, chaque segment comporte une paire de sacs coelomiques. Le tube digestif s'étend en ligne droite dans l'axe longitudinal du corps et se différencie dans sa partie antérieure en une trompe garnie de denticules cornés ou paragnathes et portant deux mâchoires. Le système circulatoire est entièrement clos et est constitué d'un vaisseau ventral et d'un vaisseau dorsal reliés entre eux au niveau de chaque segment par une paire de canaux vasculaires se ramifiant dans les parapodes. Les produits génitaux sont situés dans le coelome et flottent librement dans le liquide coelomique où ils poursuivent leur développement. Arrivés à maturité, les produits génitaux seront libérés dans l'eau de mer où s'effectuera la fécondation. Les animaux ne survivent pas à l'émission des produits sexuels (M.Younsi, 2006).

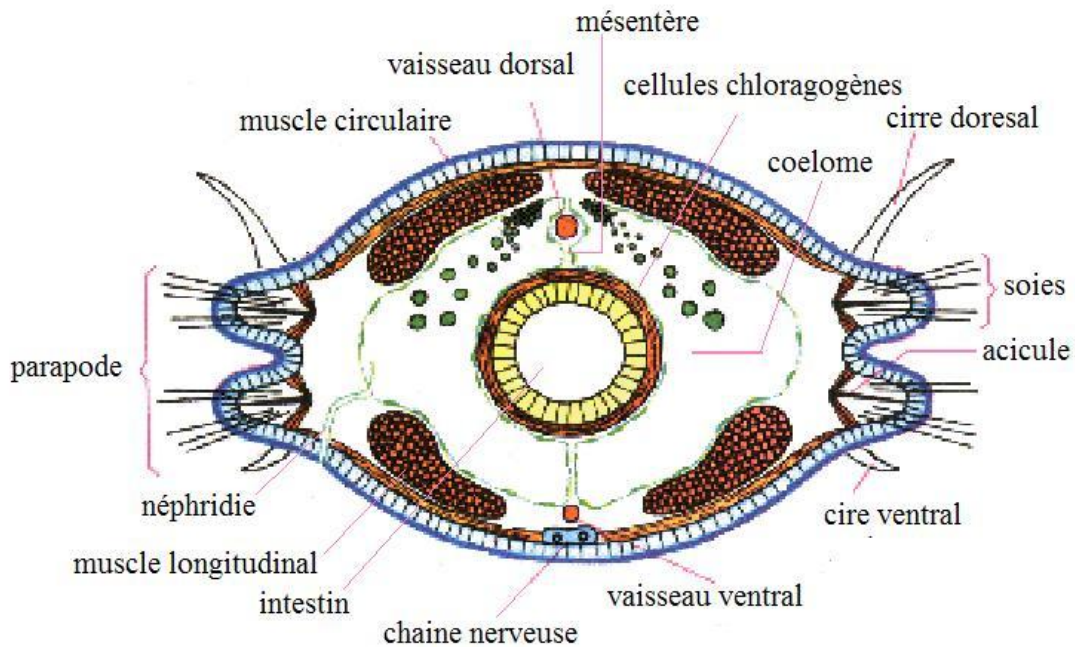


Figure 2 : Coupe transversale d'un segment moyen du corps de *Perinereis cultrifera* (Rouabah , 2003).

3.1. Taxonomie

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 (Fig.3).

Taxonomie : (NODC, 1996)

Royaume : Animalia (animaux)
Règne : Annelida (annélides)
Classe : Polychaeta (polychètes)
Sous classe : Palpata
Ordre : Aciculata
Sous ordre : Phyllodocida
Famille : Nereididae Johnston, 1865
Genre : *Perinereis* Kinberg, 1866
Espèce : *Perinereis cultrifera*, Grube 1840

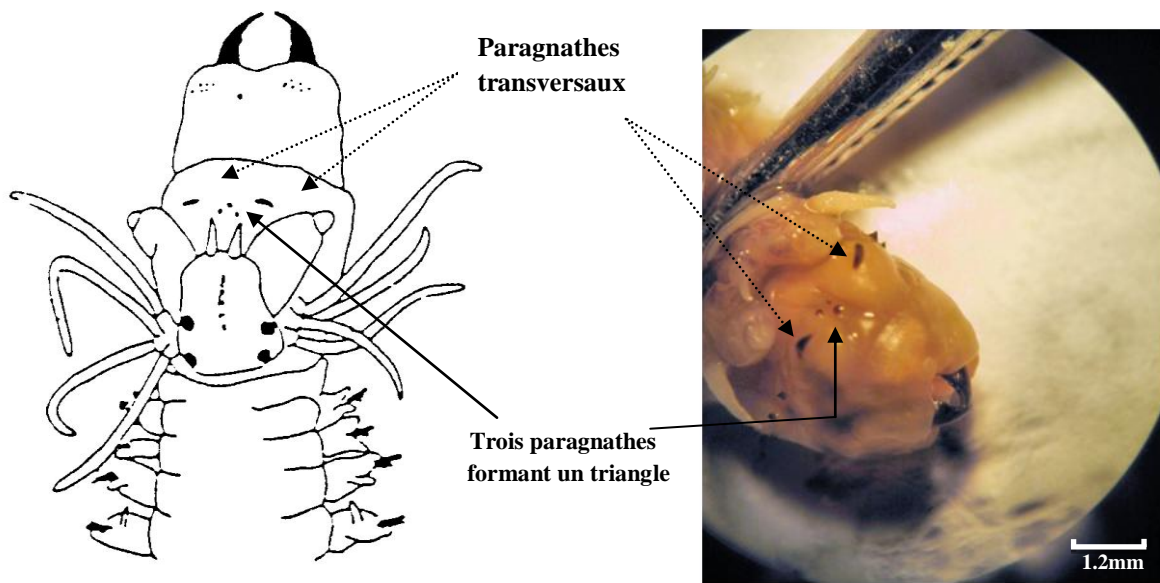


Figure 3: Détail de la partie antérieure dorsal de *Perinereis cultrifera* (M.Younsi, 2006)

Partie 02 : ADN

Les acides nucléiques sont des composés d'importance biologique considérable, comme en témoignent les nombreux articles que la presse de vulgarisation leur consacre et qui n'ont certainement pas manqué de retenir votre attention.

Cette molécule a été découverte par un biologiste allemand, F. Miescher, qui entre 1868 et 1872, durant la guerre Franco-Allemande notamment, isolait les noyaux des cellules du pus des blessés ; à partir de ces organites dont il cherchait à extraire les peptides, il isola des substances nouvelles qu'il appela d'abord substances nucléique, puis nucléines, ensuite acides nucléiques.

Il apparut très rapidement que ces constituants, représentant 10 à 20% du poids sec des tissus, devaient être répartis en deux catégories, d'une part l'acide désoxyribonucléique, l'ADN (ou DNA si l'on emploie la terminologie anglo-saxonne), essentiellement localisé dans le noyau cellulaire. D'autre part l'acide ribonucléique, l'ARN (ou RNA des anglo-saxons), trouvé dans le noyau et le cytoplasme, mais plus abondant dans ce dernier.

Dans les cellules, ces acides nucléiques sont souvent associés à des protéines formant ce que l'on nomme des nucléoprotéines (Robert. D et Vian. B, 2004). Et grace aux travaux d'Oswald Avery en 1944 et de James Watson et Francis Crick en 1953, on a découvert que le code génétique était véhiculé par les molécules d'ADN (David Mcfarland, 2001).

4. L'ADN

L'acide désoxyribonucléique est un polymère de désoxyribonucléotides. L'association de deux brins complémentaires d'ADN enroulés en doubles hélice constitue le génome de la plupart des organismes. L'ADN est le fameux Acide Désoxyribonucléique, une partie de son nom provient de sa localisation dans un compartiment particulier de la cellule que l'on appelle le noyau. Il est le support de l'information génétique, au même titre qu'une bande magnétique est le support d'un enregistrement. L'ADN est en fait, une «simple» molécule comme les protéines, formée de chaînes, mais dont les maillons s'appellent cette fois des nucléotides (Ch. Samieet *al.*, 1991; Franco Taroni et Raphael Coquoz, 2006)

Un nucléotide est une structure chimique constituée d'une base azotée, d'un phosphate et d'un sucre (Fig. 4), en toute rigueur, on devrait parler de désoxynucléotide. La différence entre les 4 désoxynucléotides composant l'ADN provient des bases qui peuvent être les suivantes : adénine, cytosine, guanine ou thymine. Chaque carbone de la molécule de sucre est numéroté 1',2',.....à 5'. C'est une numérotation en « prime » qui est utilisée parce que la numérotation simple (1,2,.....) concerne les positions sur les hétérocycles des bases (Georges B. Johnson, et *al.*, 2007).

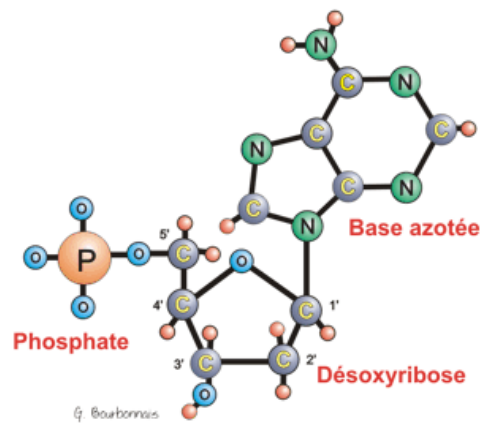


Figure 4 : Le nucléotide [3].

- **Le groupe phosphate :**

Le groupe phosphate d'un nucléotide réagit avec un groupe hydroxyle de l'autre pour former une liaison phosphodiester accompagnée de la libération d'une molécule d'eau (Georges B. Johnson, et *al.*, 2011) (Fig.5).

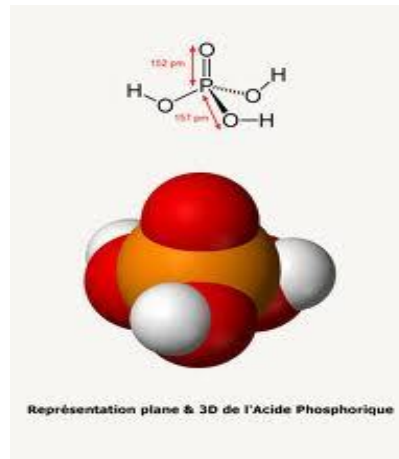


Figure 5 : L'acide phosphorique [4].

- **Un sucre :**

Le sucre de nucléotide de l'ADN est le désoxyribose, qui porte un atome d'hydrogène sur le deuxième carbone au lieu de groupement hydroxyle (Gerald Karp, 2010) (Fig.6).

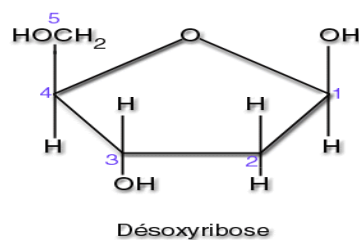


Figure 6 : Le désoxyribose [5].

- **Une base azotée :**

A l'époque des travaux de Watson et Crick, on savait que l'ADN était un polymère composé de quatre type de bases, deux purines, l'adénine (A) et la guanine (G) et deux pyrimidines, la cytosine (C) et la thymine(T) attachées à des sucres phosphorylés (Geoffrey M. Cooper, 1999) (Fig.7).

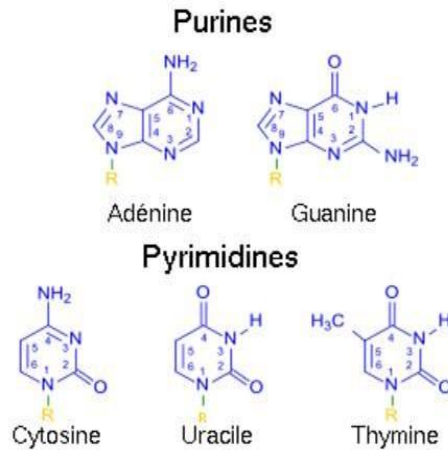


Figure 7: Les bases azotées [6].

5. LA STRUCTURE DE L'ADN :

Quand on découvrit que l'ADN était le matériel génétique, une compétition féroce se déclencha pour en déterminer la structure précise.

Les molécules d'ADN sont très grandes et généralement composées de deux chaînes polynucléotidiques, enroulées l'une autour de l'autre pour former une double hélice d'un diamètre de 2,0 nm. Chaque chaîne est constituée de désoxyribonucléosides puriques et pyrimidiques reliés par des liaisons phosphodiester. C'est-à-dire qu'une molécule d'acide phosphorique forme un pont entre le groupe 3'-hydroxyle d'un sucre et le groupe 5'-hydroxyle d'un sucre adjacent. Les bases puriques et pyrimidiques sont attachées au carbone 1' des désoxyriboses et s'étendent vers l'intérieur du cylindre formé par les deux chaînes. Elles sont empilées les unes sur les autres, au centre, une paire de bases tous les 0,34 nm.

L'adénine (A) d'un brin est toujours appariée avec la thymine (T) du brin opposé, par deux liaisons hydrogène. La guanine (G) s'apparie avec la cytosine (C) par trois liaisons hydrogène. Cet appariement de bases AT et GC signifie que, dans une double hélice d'ADN, les deux brins sont complémentaires. En d'autres mots, les bases d'un brin correspondent à celles de l'autre brin, selon les règles spécifiques de l'appariement des bases. Comme les séquences des bases dans ces brins codent pour l'information génétique, un effort considérable a été consacré à déterminer la séquence en base de l'ADN et de l'ARN chez de nombreux organismes, y compris divers micro-organismes.

Les deux brins polynucléotidiques s'adaptent l'un à l'autre comme les pièces d'un puzzle, grâce à l'appariement des bases complémentaires

La figure 8, qui représente l'ADN de conformation B (probablement la plus commune dans les cellules), montre que les deux brins ne sont pas positionnés à l'opposé direct l'un de l'autre dans le cylindre de l'hélice. Par conséquent, lorsque les brins s'enroulent l'un autour de l'autre, le squelette forme un grand sillon, et un petit sillon plus étroit. Chaque paire de bases présente une rotation de 36° autour du cylindre par rapport aux paires adjacentes, de sorte qu'il y a 10 paires de bases par tour d'hélice. Chaque tour d'hélice a une longueur verticale de 3,4 nm. L'hélice est de pas droit c'est-à-dire que les chaînes tournent dans le sens antihorlogique, si on les regarde vers le bas dans l'axe longitudinal.

Les deux squelettes sont antiparallèles : ils vont dans des directions opposées par rapport à l'orientation de leurs sucres. Une extrémité de chaque brin expose un 5'-hydroxyle, souvent lié à des phosphates, tandis que l'autre extrémité a un groupe 3'-hydroxyle libre. Si on regarde la fin d'une double hélice, on peut voir l'extrémité 5' d'un brin et l'extrémité 3' de l'autre. Dans une direction donnée, un brin est orienté de 5' vers 3' et l'autre de 3' vers 5' (Harley, et *al.*, 2010).

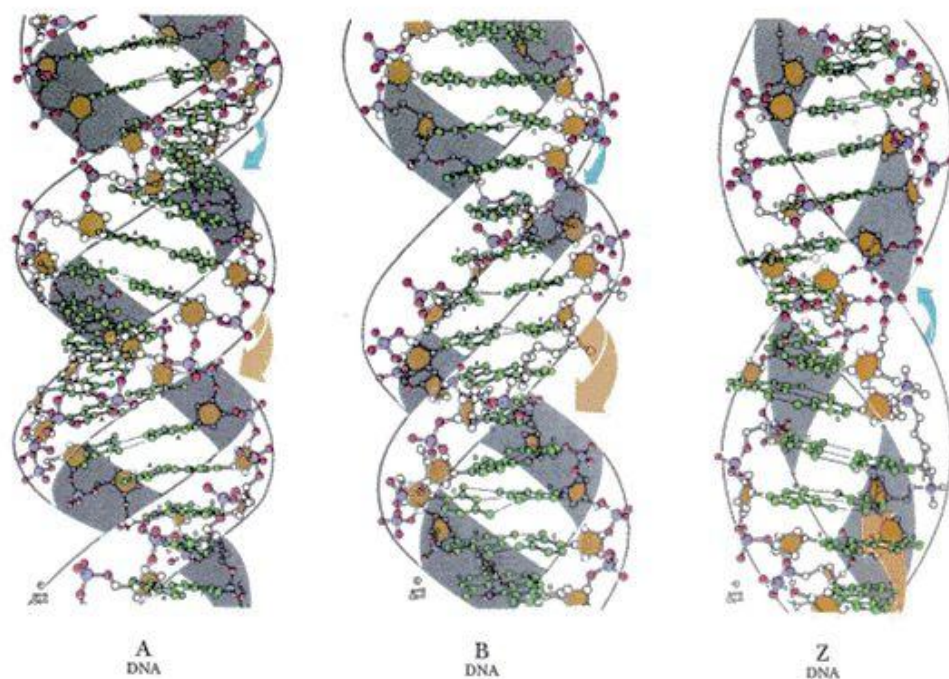


Figure 8: Les différentes structures de l'ADN [7].

CHAPITRE II :
PARTIE
PRATIQUE

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Présentation des sites d'étude

Les individus de *Perinereis cultrifera* ont été récoltés sur le site du littoral méditerranéen au Nord-Est d'Alger, ce site est situé à Elkala, plage Elmordjène à 700 km à l'Est d'Alger (fig.09).

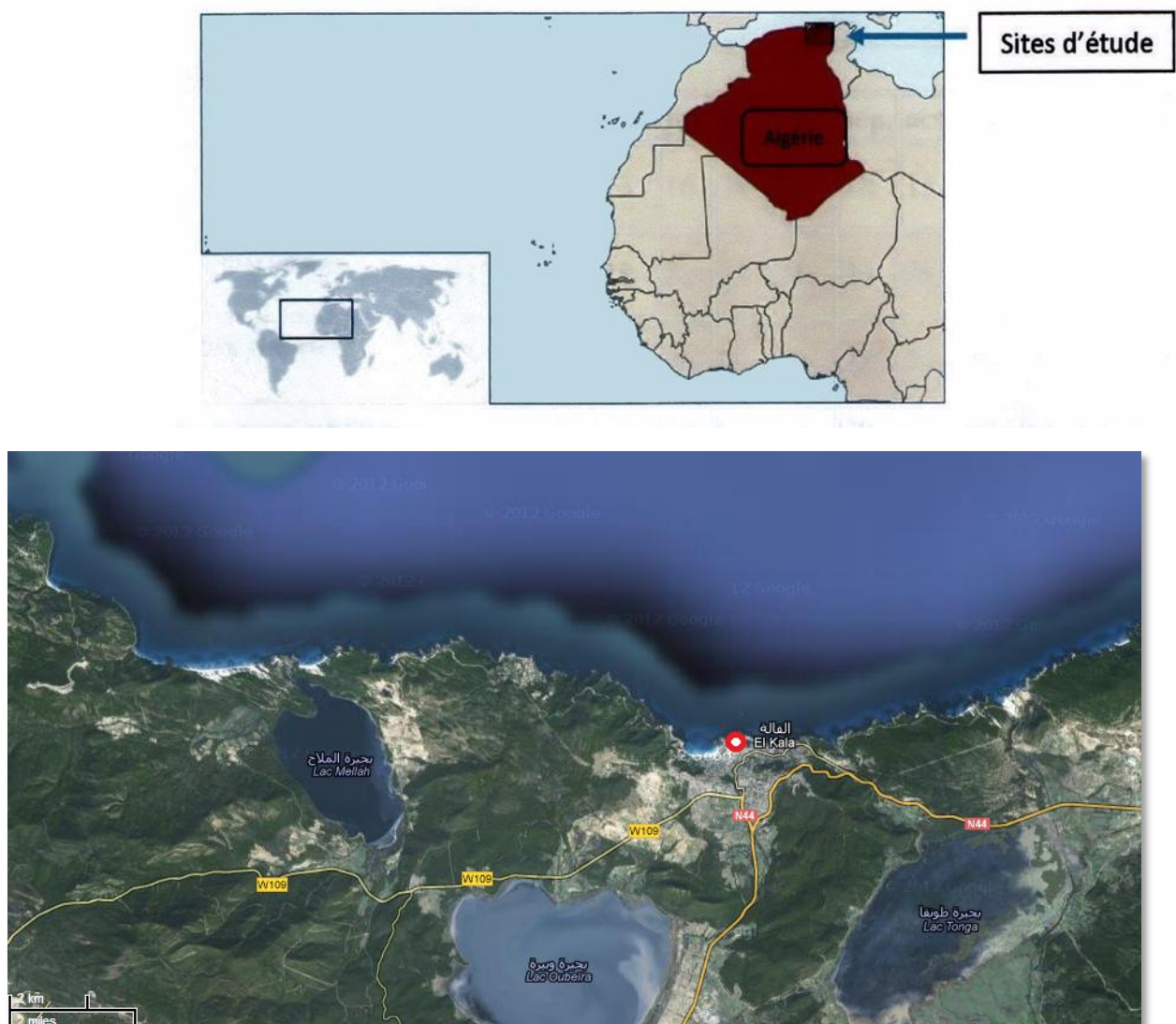


Figure 9 : localisation du site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera* Sur le littoral Nord Est Algérien à El-kala.

On trouve les vers parmi les Rhodophycées, algues rouges meublant les trottoirs et banquettes constitués de différents types de roches selon la région.

Le site Elmordjène à El-kala (Fig.10) est caractérisé par la dominance du granite dans la composition des roches de la zone intertidal 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). Le granite est une roche magmatique de formation et de texture cristalline visible. Le granite se compose de feldspath (généralement potasse de feldspath et oligoclase), et de quartz, avec une petite quantité de mica (biotite ou muscovite) et de minéraux accessoires mineurs, tels que le zircon, l'apatite, la magnétite, l'ilménite et le sphène. Le granite est habituellement blanchâtre ou gris, avec des taches dues à des cristaux plus foncés. La potasse de feldspath donne à la roche une couleur rouge ou chair. (Baoult, 1974).



Figure 10 : site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera* Sur le littoral Nord Est Algérien à El-kala.

2. Mode de récolte et traitement des individus

Une récolte a été effectuée en date du 27 Mars 2013. L'échantillonnage a été réalisé 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, fatiguant et demande beaucoup de temps. De plus, il est moins rentable dans 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 efficace 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 (eau de Javel diluée à 10% ou du KMnO_4 en solution diluée de 0,5% à 1% dans l'eau de mer). Cependant, ce type de procédés entraîne des destructions dramatiques de l'environnement et des ressources biotiques.

Les 96 individus récoltes sont triées au laboratoire et ils ont été individuellement pesés au dixième de mg, après séchage sur papier filtre, afin de déterminer le poids frais essuyé et le sexe. Le nombre de sétigères a été compté et les vers ont été par la suite fixés dans 4 bouteilles de verre (Fig.11), la première bouteille contient de l'éthanol à 96% et les vers ont été récoltés en utilisant l'eau de javel, la deuxième bouteille renferme aussi de l'éthanol à 96% mais les vers ont été collectés à l'aide d'un grattoir, la troisième bouteille comprend du formol à 5% et les vers ont été ramasser ont les forçant avec l'eau de javel, la quatrième et la dernière bouteille renferme du formol à 5% et les vers sont récoltes avec un grattoir.



Figure 11 : les bouteilles des échantillons.

On a choisis dix individus avec un poids similaire de chaque catégorie, et nous avons coupé chaque individu en 12 parties comme suit (Fig. 12) :

- La tête en quatre parties : 50µg, 100µg, 150µg et 200µg.
- La région médiane en quatre parties : 50µg, 100µg, 150µg et 200µg.
- La région postérieure en quatre parties : 50µg, 100µg, 150µg et 200µg.

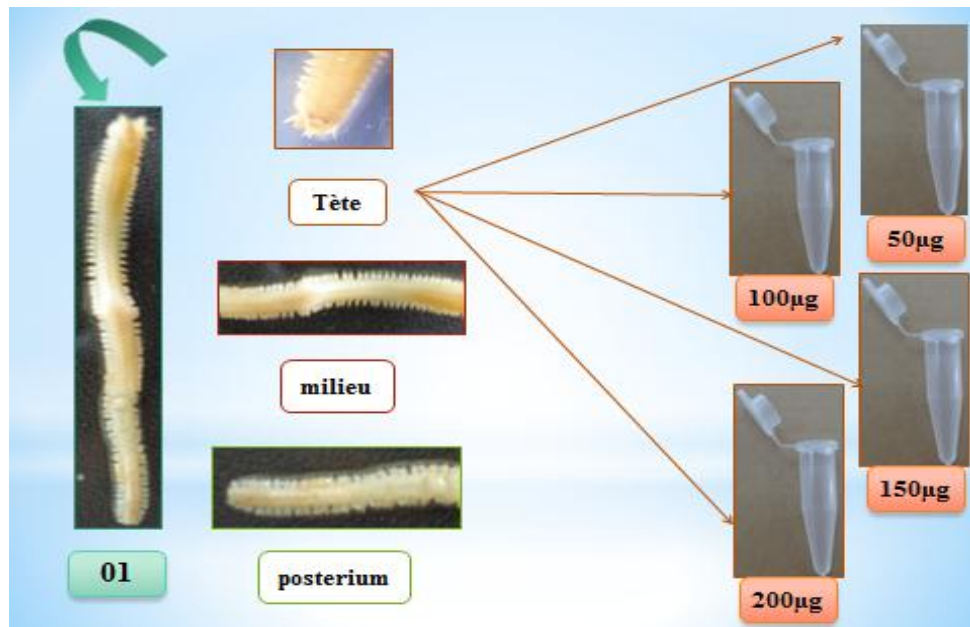


Figure 12 : Division de l'individu *Perinereis cultrifera*.

3. 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 Désrosiers en 1988 (M.Younsi, 2006) sur *Nereis virens*. Le rang de cassure a été ainsi déterminé à partir d'un

histogramme de distribution de fréquence (Fig. 13) et la relation entre le poids partiel formolé essuyé, des individus sectionnés au 43^{ième} sétigère et le poids frais essuyé des individus entiers a été déterminé (Fig. 14) :

$$Y = 1.4573 \times n + 0.0588$$
$$(n = 83 \quad r^2 = 0.881)$$

Y : Poids frais essuyé

x : Poids partiel formolé essuyé

n : Nombre d'individus

r² : Coefficient de détermination de la courbe

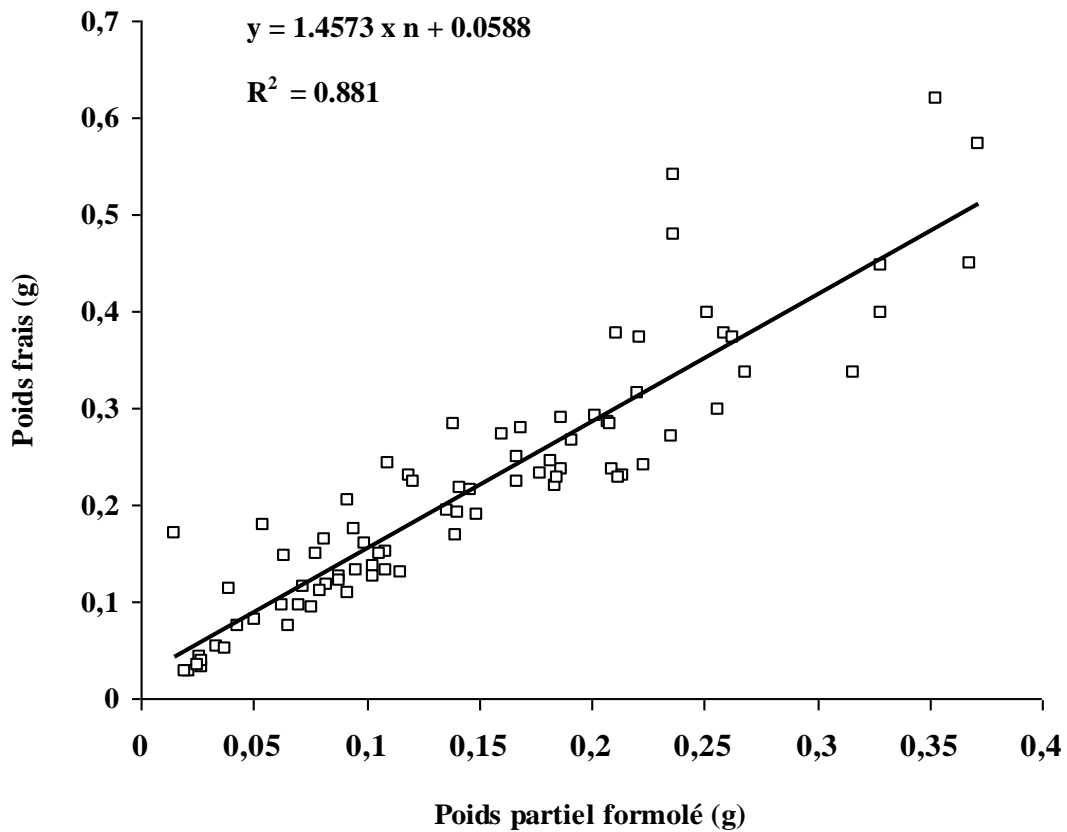


Figure 13 : Relation entre poids partiel formolé essuyé et poids frais essuyé

4. 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, 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).

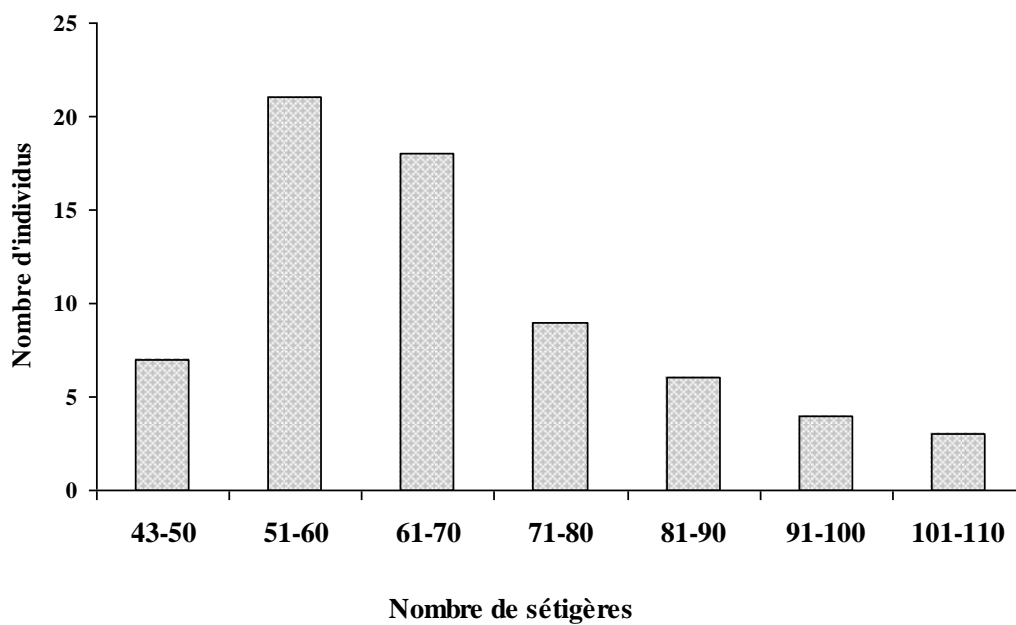


Figure 14 : Histogramme de distribution de fréquence du rang de cassure.

5 .Extraction d'ADN

5.1. Préparation du Tampon et Protocole d'extraction (D.Jolivet)

Tampon CTAB : (Fig.15)

CTAB 2%

NaCl 1.4M

b-mercaptoethanol 0.2%

EDTA 20mM

Tris HCL ph 8.0 100mM

(Normalement, le mélange doit être homogène sans cristaux. Fig.16)

A mettre séparément : SDS 0.2 mg/ml

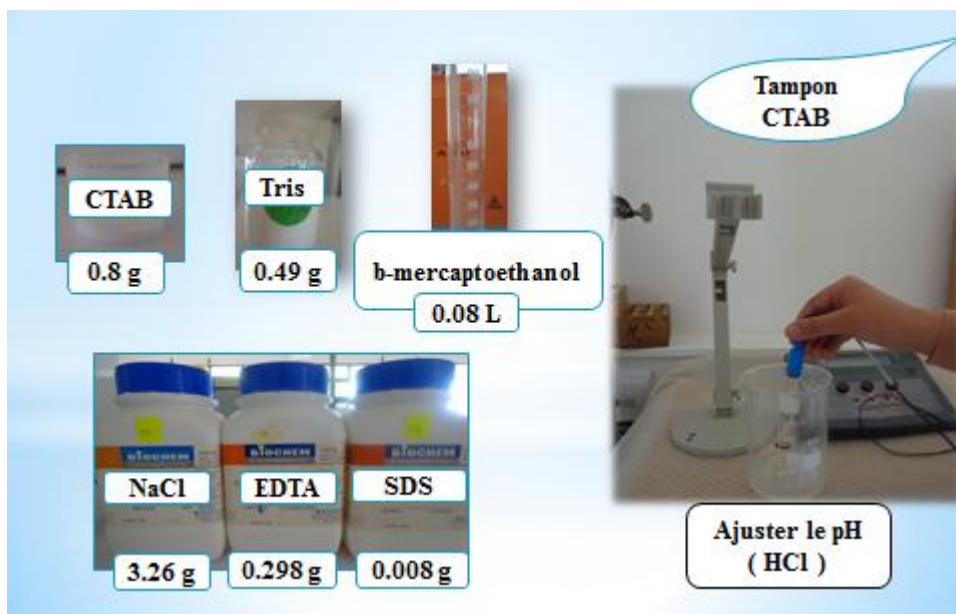


Figure 15 : préparation du tampon CTAB.



Figure 16 : Agitation du tampon.

Jour 1 :

- Incuber le tampon CTAB (600 microlitres par tube epindorf) à 60°C pendant une heure sans échantillon.
- Après une heure, ajouter l'échantillon au 600 microlitres de solution CTAB déjà chaud et incuber à 60°C pendant 4 heures (Fig.17).

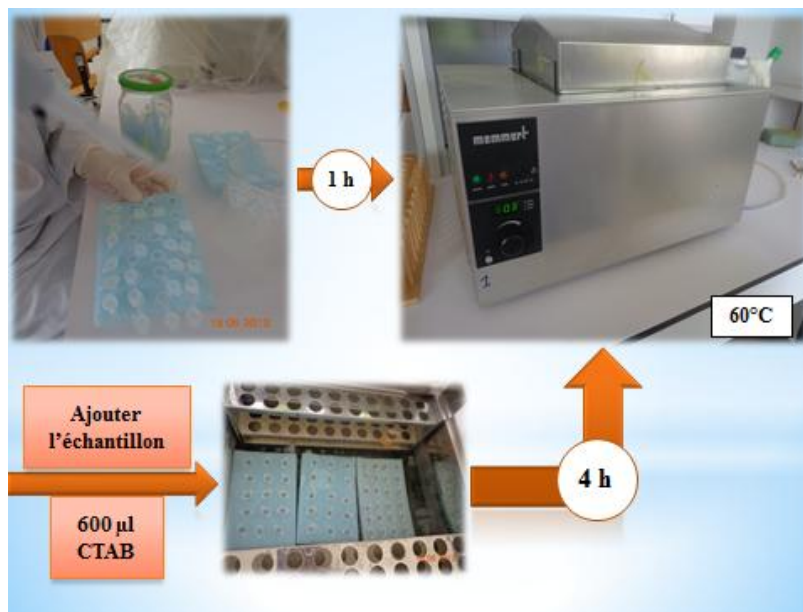


Figure 17 : L'incubation du tampon et des échantillons.

Jour 2 : (Fig.18)

- Passer au vortex les epindorfs.
- Centrifuger à 3800 rpm pendant 20 min et transférer dans un epindorf de 1.5 mL.
- Ajouter un volume égal de (Chloroforme + alcool isoamylique, 96 :4 / 1.92ml et 0.08 ml) et bien mélanger par renversement pendant 3 minutes.
- Centrifuger 3800 rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Récupérer le surnageant et le transférer dans un epindorf propre.
- Ajouter 2/3 de volume d'isopropanol glacé.
- Laisser précipiter pendant 1 heure à 4°C.
- Centrifuger 10 minutes à 3800 rpm à 4°C.
- Laver le culot avec 500 microlitre d'éthanol 75%.
- Centrifuger 10 minutes à 3800 rpm à 4°C.
- Sécher le culot à l'aire libre pendant 10 min et reprendre dans 50 microlitres d'H₂O incubant à 37°C resuspendre l'ADN.
- Conserver à 4°C.

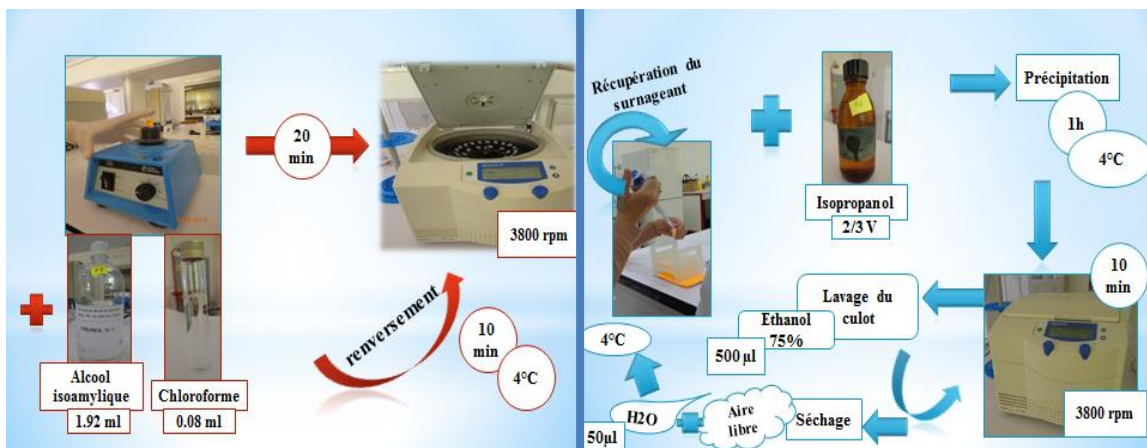


Figure 18 : les étapes d'extraction d'ADN.

- ❖ Préparation pour la lecture 45 µL d'H₂O pure et 5µL de notre solution ADN.

5.2. 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 sont 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.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

Notre objectif étant d'avoir le meilleur rendement avec la meilleure qualité (pureté d'ADN) en sachant qu'il n'existe pas de protocole d'extraction d'ADN spécifique à l'espèce *Perinereis cultrifera*.

Comme l'extraction d'ADN est la base 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 et tranché sur ce complexe d'espèce.

1. 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 entre Le poids frais essuyés des individus et la quantité d'ADN n'a été mise en évidence (Fig. 19). Le poids des vers n'a donc aucune influence sur les variations intra-individuelles dans la quantité d'ADN extraite.

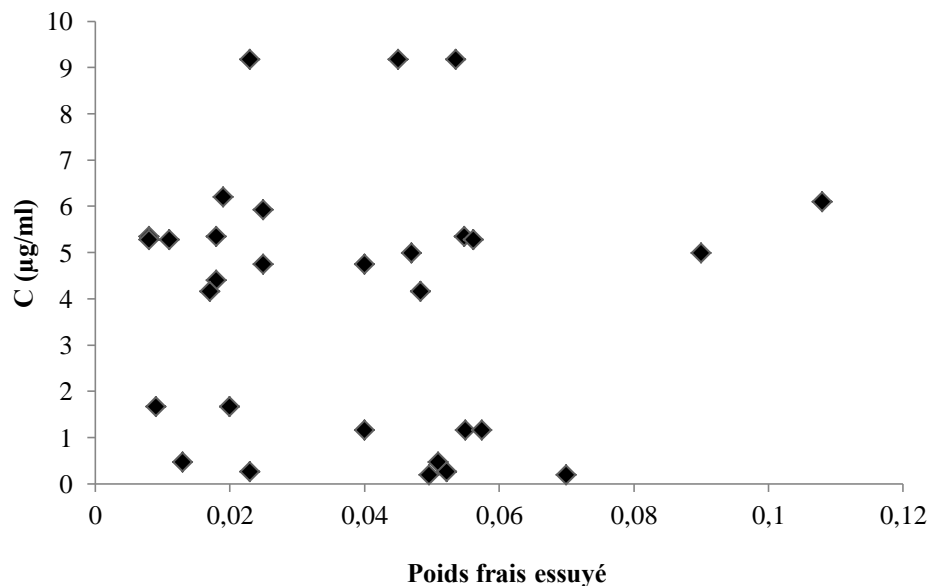


Figure 19 : Courbes de corrélation entre la quantité d'ADN et le poids des individus.

2. 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 (M.Younsi, 2006) et une durée du cycle de reproduction de 16 mois où les individus atteignent à sa fin une maturité sexuelle pour pouvoir se reproduire. Pendant le cycle de vie *Perinereis cultrifera* trois classes sexuelles sont soulignées : les mâles, les femelles et les individus indifférenciés qui ne présentant pas de produits génitaux dans leur contenu cœlomique. On comparant la quantité d'ADN issue des différentes classes sexuelles, aucune relation n'a pu être établie (Fig. 20). Le sexe des individus n'a aucun effet sur la quantité d'ADN.

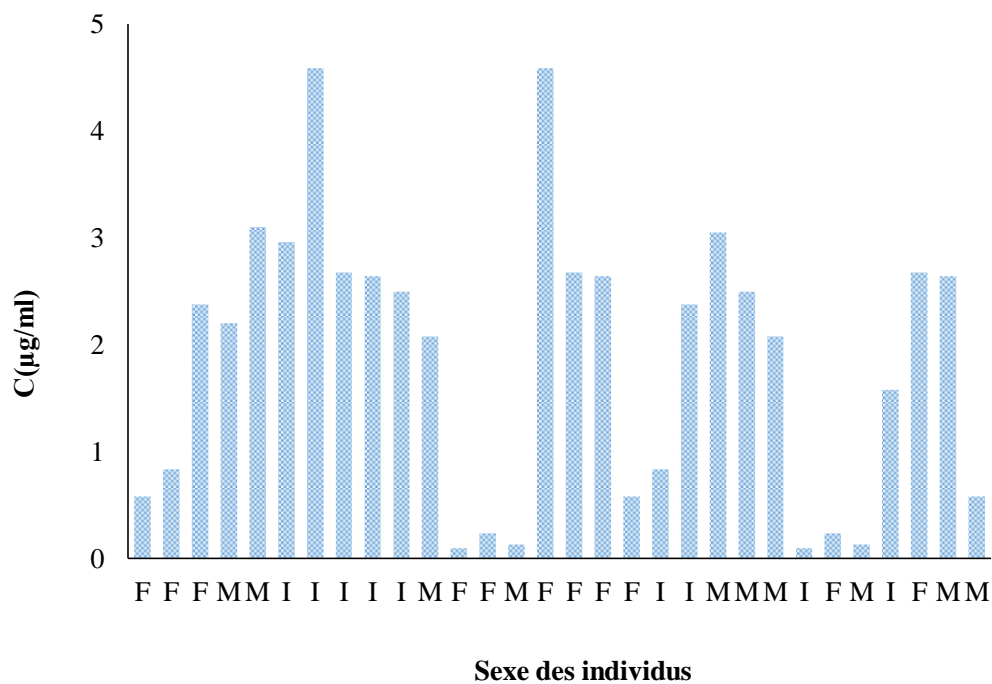


Figure 20 : Histogramme de la quantité d'ADN selon le sexe des individus.

3. Efficacité de la méthode de récolte

Le mode de récolte de *Perinereis cultrifera* ainsi que les méthodes de conditionnement influence énormément la qualité et la quantité des individus, du point de vue du stress provoqué et aussi le bris mécaniques qui nous fait perdre une grande quantité de la biomasse.

Comme nous l'avant déjà signalé auparavant, deux modes de récolte et deux méthodes de conditionnement ont été utilisé et nous voulions savoir les effets de chacune d'entre elle selon les produits utilisé et de montrer quelle sera la plus rentable pour notre extraction.

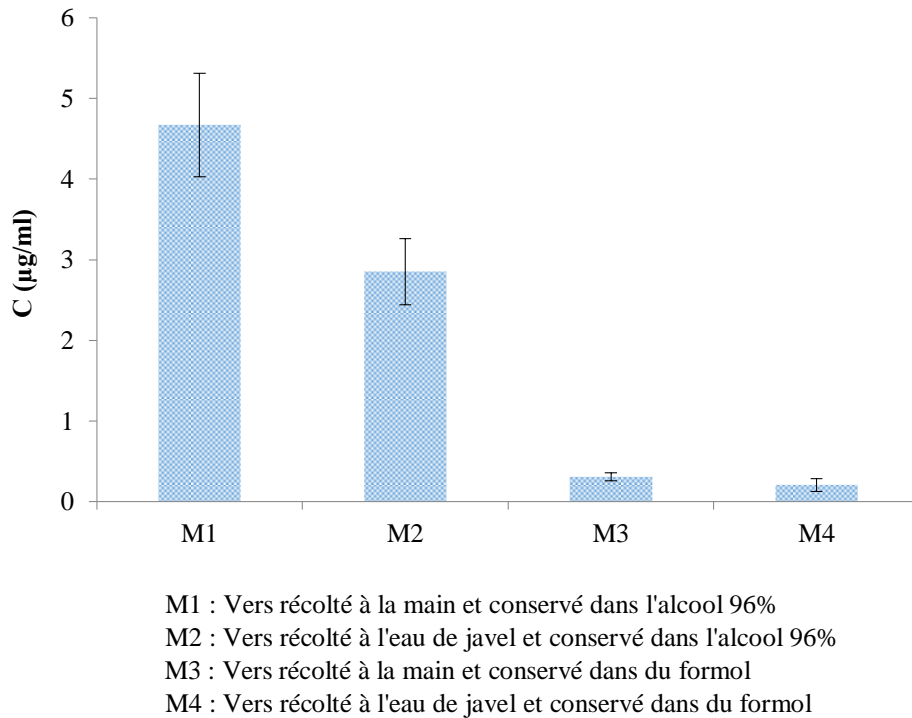


Figure 21 : Histogramme de la quantité d'ADN selon mode de récolte et conditionnement.

La Figure 21 représente la quantité d'ADN issue de chaque mode de récolte et elle montre clairement que la récolte à la main ou à l'aide d'un grattoir ainsi que la conservation dans l'alcool 96% donne les meilleurs résultats. Ceci est du fait que les individus sont moins stressés et moins 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 et le nombre de vers sectionnés. La conservation dans l'alcool 96% préserve mieux notre ADN que le formol.

4. Segmentation du ver et quantité d'ADN

L'ADN moléculaire est présente dans tous les corps vivants. Le corps de *Perinereis cultrifera* est divisé en trois régions : la tête, la région médiane et la région postérieure ou pygidium. En comparant les moyennes des quantités d'ADN extraites selon l'origine des tissus analysés, nous avons remarqué que la partie médiane permet d'avoir un meilleur rendement que le pygidium et aussi mieux que la tête qui contient les mâchoires et la paragnathes car ceux sont des parties difficiles à hydrolyser (Fig.22).

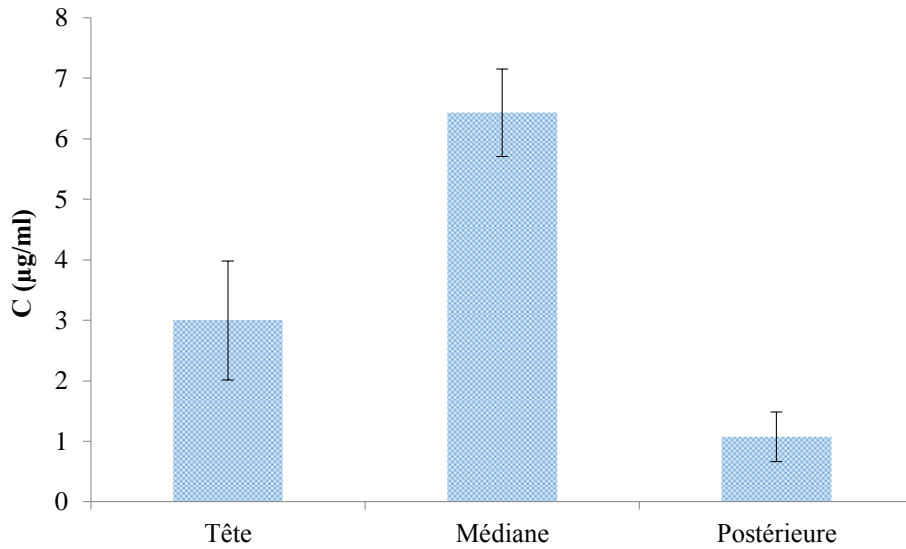


Figure 22 : Histogramme de la quantité d'ADN selon la segmentation du ver

5. Poids des échantillons et quantité d'ADN

Les échantillons analysés des différentes régions du corps des individus de *Perinereis cultrifera* ont été divisés en quatre catégories de poids : 50µg, 100µg, 150µg et 200µg et la comparaison des moyennes selon la figure 23 souligne que l'ADN issue des parties médiane dont le poids est entre 50 à 100µg nous permis d'avoir la quantité d'ADN la plus élevée, ce qui confirme les résultats précédents (Fig.22).

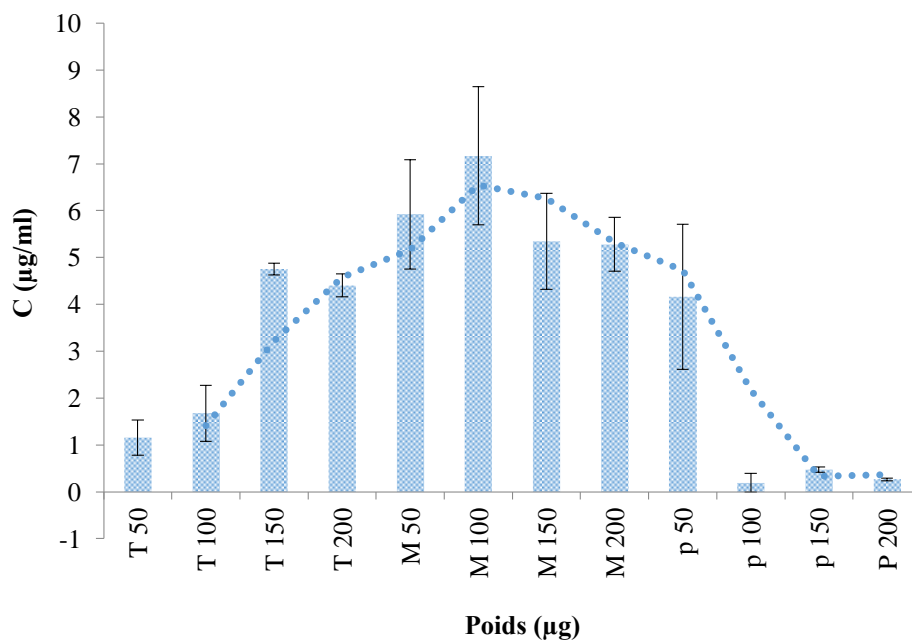


Figure 23 : Histogramme de la quantité d'ADN selon les poids des échantillons.

6. Pureté d'ADN

La concentration d'acides nucléiques est généralement déterminée par une mesure effectuée à 260 nm et 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. 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 24. Nos valeurs sont comprises entre 1,69 et 2,16 et les échantillons dont le poids est de 100µg présente la meilleure pureté obtenue.

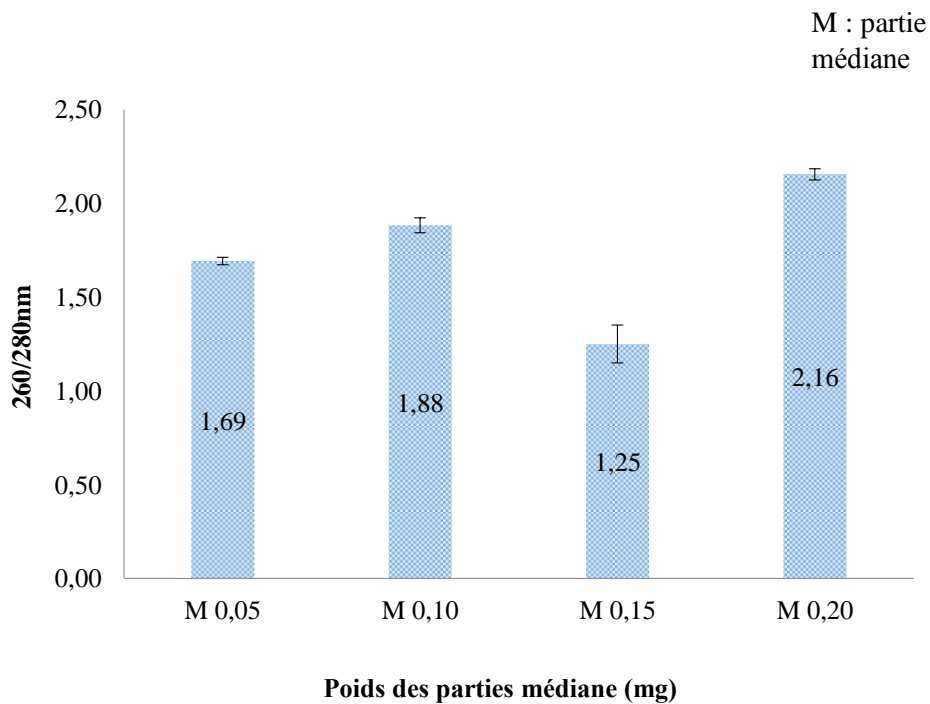


Figure 24 : Histogramme de pureté d'ADN selon les poids des échantillons des régions médiane.

CONCLUSION

L'extraction d'ADN chez *Perinereis cultrifera* est l'étape ultime et la plus importante dans le processus de séquençage des gènes marqueur pour l'étude phylogénétique et pouvoir répondre au complexe de cette espèce d'une vision moléculaire.

Le croisement des résultats montre que la récolté à la main avec une conservation à l'éthanol 96% et en choisissant des échantillons dont le poids est compris entre 50 et 100µg provenant des régions médiane des individus de *Perinereis cultrifera* peuvent nettement améliorer la quantité et la qualité de l'ADN extrait.

Pour essayer d'apporter d'autre amélioration 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 le 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 µg 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 13400 rpm pendant 20 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'H₂O incubant à 37°C resuspendre l'ADN. 3fois à 1 minute
- Conserver à -20°C

- Préparation pour la lecture 45 µL d'H₂O pure et 5µL de notre solution ADN

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

Les sites web

[1] : <http://www.cegep-ste>

foyc.gc.ca/profs/gbourbonnais/pascal/nya/genetique/notesadn/adn3.htm Consulté le 15/03/2013.

[2]:http://www.bibliomer.com/documents/fiches/fiche_ensavoirplus_lien_extraction_ADN_vf.pdf Consulté le 22/02/2013.

[3] : <http://www.mon-droguiste.com/acide-phosphorique-phosphate-hydrogene,fr,4,ACIPHO75CRN.cfm> Consulté le 19 /03/2013.

[4] : <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/DNAID30001FS.html> Consulté le 19 /03/2013.

[5] :<http://www.linternaute.com/science/biologie/dossiers/06/0609-adn/adn1/3.shtml>

Consulté le 22 /03/2013.

[6] : http://www-lemm.univ-lille1.fr/biologie/biochim/co/ch5_06.html Consulté le 02 /04/2013.

[7] : <http://www.linternaute.com/science/biologie/dossiers/06/0609-adn/adn1/3.shtml>

Consulté le 22 /03/2013.

Livres

- André Beaumont et Pierre Cassier, 2004, biologie animal des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens 3^e édition, *Dunod*, paris, 459P.
- André Gilles et Jean-pierre Cornec, 2006, biologie et physiologie animale et cellulaire, *ellipses*, paris, 457P.
- Annie Mamecier, 2006, le règne animal, *de boeck*, Belgique, 313P.
- Benzecri .J. P, 1973, L'analyse des données et la taxonomie numérique, *Dunod*, Paris, 200 P.
- Brémaud. C, Thibaolt. E et Ulrich. E, 2012, environnement, alimentation, santé, *educagri*, Paris, 209 P.
- Bruno Scherrer, 1984, Biostatistique, 1^{ère} édition, *Chicoutimi Gaëtan Morin*, France, 850 p.

- Ch. Samie, D. Payen, M. Hallaire, P. Broche et S. Mériaux, 1991, Glossaire De Génétique, *INR*, paris, 21P.
- David Mcfarland, 2001, Le Comportement Animal Psychobiologie, éthologie Et évolution, *de boeck*, Paris, 613P.
- Franco Taroni et Raphael Coquoz, 2006, Preuve Par L'ADN la génétique au service de la justice 2^e édition, *PPUR*, Italie, 355P.
- Geoffrey M. Cooper, 1999, La cellule: Une approche moléculaire, *de boeck*, Belgique ,674P.
- Georges B. Johnson, Jonathan B. Losos, Peter H. Raven et Susan S. Singer, 2011, Biologie - Version luxe, *de boeck*, France, 1280P.
- Gerald Karp, 2010, Biologie Cellulaire et Moléculaire 3^e édition, *de boeck*, Paris, 816P.
- Griffiths, Gelbart, Miller et Lewontin, 2001, Analyse Génétique Moderne 1^e édition, *de boeck*, Italie, 659P.
- Jean_Claude Baehr, Jean_Louis Picaud et James Maissiat, 2005, biologie animale invertébrés 2^e édition, *Dunod*, paris, 239 P.
- Kolb et Wishaw, 2002, Cerveau & Comortement, *Dunod*, Espagne, 633P.
- Prescott, Harley, Klein, Wiley, Sherwood et Woolverton, 2010, Microbiologie 3^e édition, *de boeck*, Paris, 1108P.
- Robert. D et Vian. B, 2004, Éléments de biologie cellulaire, 3^e édition, *Doin*, France, 410P.
- Véronique Gilliquet, 2009, Biologie 6^e édition- sciences générales, *de boeck*, Belgique, 356P.

Articles

- A. Claudine de vroey, (2002), Extraction d'ADN, *Université Libre de Bruxelles pour la publication en ligne*, 9: 2-9.
- B. Fauchald K. et Jumars P.A. (1979), The diet of worms a study of polychaetes feeding guilds. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 17: 193-284.
- C. Hutchinge P, (1998), Biodiversity and functioning of polychaetes in benthic sediments. *Biodiversity and conservation*, 7: 1133-1145.

- D. Rouabah et L. Rouabah, (2007), Biodiversite et complexe d'espèces *perinereis cultrifera*: un exemple de speciation, Sciences & Technologie, 25 : pp.79-87,
- E. Rouabah A. et Scaps, P. (2003), life cycle and population dynamic of polychaete *Perinereis cultrifera* from the Algerian Mediterranean coast. P.S.Z.N. Marine Ecology., 24(2): 58-99.
- F. 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.

Mémoire

- Jean François baoult, (1974) - La thèse de villa.
- 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 mourad, 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

Annexe

Le produit	Composition chimique	Rôle
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide ou $(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3\text{Br}$	CTAB est un détergent cationique, soluble dans H_2O et facilement soluble dans l'alcool. CTAB est couramment utilisé dans la préparation et la purification d'ADN génomique
Chloroforme	<ul style="list-style-type: none"> • Trichlorométhane • CHCl_3 	Fréquemment utilisé comme solvant, le chloroforme tend à être remplacé actuellement par le dichlorométhane, aux propriétés similaires mais moins toxique. Le chloroforme a été jadis utilisé comme anesthésique dans les blocs opératoires et comme conservateur pour la viande.
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$.	l'EDTA est un chélateur des ions En biochimie ; il est utilisé comme inhibiteur des métallo-enzymes. Son utilisation est très fréquente dans la purification des acides nucléiques (ADN ou ARN) et des protéines . En séquestrant en particulier les ions magnésium Mg^{2+} , il bloque l'activité de nombreuses nucléases qui sont dépendantes de cet

		ion. L'EDTA est également un inhibiteur des métalloprotéases à zinc et limite ainsi l'hydrolyse des protéines dans les extraits cellulaires. En génie biologique, l'EDTA est utilisé en routine pour stopper l'activité de polymérase, la chélation des ions calcium modifiant la conformation des enzymes.
Ethanol 75%	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	Pour Lavage
Ethanol 95%	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	Elimination des sels et précipitation de l'ADN
Formol	CH_2O	La conservation des échantillons
HCl	l'acide chlorhydrique,	Ajuster le pH
Isopropanol	$\text{CH}_3\text{CH(OH)-CH}_3$	Précipité et amélioré considérablement la qualité d'ADN
Mercaptoéthanol	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$	Mercaptoéthanol est souvent inclus dans des tampons d'extraction conçus pour l'extraction d'ADN
NaCl	Le chlorure de sodium	L'addition de NaCl à une concentration

		<p>supérieure à 0,5 M avec le CTAB est connue pour éliminer les polysaccharides</p> <p>Les sels comme NaCl sont ajoutés pour moduler la concentration des cations dans le tampon d'extraction et éclater des compartiments par osmose</p>
Protéinase K		<p>Elle est communément utilisée en biologie moléculaire pour digérer des protéines et enlever des contaminants de préparation d'acides nucléiques. Elle permet de digérer des cellules et d'extraire des acides nucléiques (ADN ou ARN) à partir de cellules de mammifères ou de micro-organismes. Elle inactive les ADNases et ARNases et peut modifier les protéines de surface des cellules. La protéinase K est une endopeptidase qui coupe les liaisons peptidiques de préférence au niveau du carboxyle d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe ou aromatique. Son activité est stimulée par agents dénaturants comme le SDS.</p>
PVP	<p>Polyvinylpyrrolidone</p> <p>$(C_6H_9NO)_n$</p>	<p>Utiliser pour l'adsorption des composés phénoliques à pH bas.</p> <p>le PVP co-précipite avec l'ADN</p>

<p>RNase</p>	<p>ribonuclease</p>	<p>Est un type de nucléase qui catalyse la dégradation de l'ARN en éléments plus petits.</p>
<p>SDS</p>	<p>dodécylsulfate de sodium $\text{NaSO}_4(\text{CH}_2)_{11}\text{CH}_3$</p>	<ul style="list-style-type: none"> • est un détergent et tensioactif ionique fort, couramment utilisé en biochimie et biologie moléculaire. • solubilisation des lipides.
<p>Tris</p>	<ul style="list-style-type: none"> • trishydroxyméthylamino méthane • 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol 	<p>Il est largement utilisé comme tampon en biochimie, particulièrement pour travailler avec des acides nucléiques avec un intervalle de pH entre 6.5 et 9.7.</p>

Glossaire

Adénine : une base de type purique qui s'apparie avec la thymine dans la double hélice d'ADN.

ADN (acide désoxyribonucléique) : long polymère non ramifié composé de 4 types de nucléotides à désoxyribose, unis par des liaisons phosphodiester ; l'ADN est le dépositaire de l'information génétique. A l'état naturel, la molécule d'ADN est une hélice double formée de deux brins antiparallèles.

ARN (acide ribonucléique) : long polymère non ramifié, monocaténaire, composé de nucléotides ribosidiques unis par des liaisons phosphodiester ; il est issu de la transcription d'un ADN et, chez certains virus, par copie d'un ARN. Les trois types d'ARN cellulaire ARNm, ARNt, ARNr jouent chacun un rôle propre dans la synthèse des protéines.

ARNase (ribonucléase) : enzyme qui découpe un brin d'ARN, éventuellement jusqu'à hydrolyse complète, en donnant des ribonucléotides.

Centrifugation : application de forces centrifuges élevées à la préparation ou la séparation de molécules, particules ou cellules en solution/suspension, basée sur une différence de masse, de forme ou de densité.

Double hélice : la structure de l'ADN, proposée pour la première fois par Watson et Crick, constituée de deux hélices entrelacées liées par des liaisons hydrogène entre les bases appariées.

Eucaryote : un organisme qui possède des cellules eucaryote.

Liaison phosphodiester : une liaison entre un groupement sucré et un groupement phosphate ; ce type de liaison se forme dans le squelette sucre-phosphate de l'ADN.

Nucléotide : une molécule composée d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate. L'unité élémentaire de construction des acides nucléiques.

pH : échelle d'acidité ou de basicité d'une solution ; c'est le cologarithme de la concentration d'ions H⁺ exprimée en mol / litre ; une solution de pH=7 est neutre, en dessous, elle est acide, au-dessus, elle est basique.

Purine : composé basique à deux noyaux hétérocycliques fusionnés présent dans les acides nucléiques. Les purines habituellement présentes dans l'ADN et l'ARN sont l'adénine et la guanine.

Pyrimidine : composé basique à un noyau hétérocyclique fusionné présent dans les acides nucléiques. Les pyrimidines courantes de l'ADN sont la cytosine et la thymine ; dans l'ARN, la thymine est remplacée par l'uracile.

Tampon : mélange des formes acide (HA) et basique (A-) d'une substance chimique choisie pour que le pH de la solution se modifie à peine quand on y'ajoute une petite quantité d'acide fort ou de base forte.

Thymine : une base pyrimidique qui s'apparie avec l'Adénine.

Résumé

Les Annélides Polychètes sont l'un des taxons les plus abondants dans les communautés benthiques en termes de richesse numérique et biodiversité. L'annélide polychète *Perinereis cultrifera* fait partie de la famille des *Nereididae* et cette dernière présente un réel complexe d'espèce. D'où la nécessité d'une comparaison au plan moléculaire pour pouvoir confirmer la parenté entre les différentes formes de *Perinereis cultrifera* en utilisant les techniques de phylogénétique et de la taxonomie numérique.

Dans ce but s'inscrit notre travail qui a pour but d'optimiser et de personnaliser un protocole d'extraction d'ADN et d'avoir le meilleur rendement en prenant compte tous les paramètres qui peuvent influencer notre qualité d'ADN. Les résultats montrent que la partie médiane ainsi que le conditionnement dans l'alcool et le poids des échantillons peuvent nettement améliorer notre rendement.

Mots clés : Annélides Polychètes, phylogénétique, extraction d'ADN, *Perinereis cultrifera*.

Summary

Annelides Polychets are one of tax most abundant in the benthic communities in terms with numerical richness and biodiversity. The Annelide Polychet *Perinereis cultrifera* belonged to the family of *Nereididae* and she presents a real complex of species. From where the need for a comparison in the molecular plan to be able to confirm the relationship between the various forms of *Perinereis cultrifera* by using the techniques of phylogenetic and numerical taxonomy.

In this target is registered our work who the purpose of which is of optimized and of personalized a protocol of extraction of DNA and to have the best output by taking account all parameters which can influence our quality of DNA. The results show that the median part as well as conditioning in alcohol and the weight of the samples can clearly improve our output.

Key words: Annelides Polychetes, phylogenetic, extraction of DNA, *Perinereis cultrifera*.

المخلص

الحلقيات متعددة الأشواك هي واحدة من الأصناف الأكثر وفرة في المجتمعات و الوسائط الفقيرة من الأكسجين من حيث الثروة الرقمية والتنوع البيولوجي. والدودة (*Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840) التي تنتمي الى عائلة الحلقيات *Nereididae* وهذه الأخيرة قضية معقدة في حد ذاتها . ومن هنا جاءت الحاجة إلى إجراء مقارنة على المستوى الجزيئي من أجل تأكيد العلاقة بين أشكال مختلفة من *Perinereis cultrifera* باستخدام تقنيات ، علم التقاربات الوراثية و التصنيف العددي.

تحقيقاً لهذه الغاية هدف عملنا هو إيجاد بروتوكول أمثل لاستخراج الحمض النووي والحصول على أفضل مردود مع الأخذ بعين الاعتبار جميع العوامل التي يمكن أن تؤثر على نوعية الحمض النووي. وقد أظهرت النتائج أن الجزء المتوسط والتعبئة في الكحول وأوزان العينات يمكن أن تحسن المردود بشكل ملحوظ.

الكلمات المفتاحية : الديدان الحلقيه المتعددة الأشواك، علم التقاربات الوراثية، استخراج الحمض النووي ، *Perinereis cultrifera*

Résumé

Les Annélides Polychètes sont l'un des taxons les plus abondants dans les communautés benthiques en termes de richesse numérique et biodiversité. L'annélide polychète *Perinereis cultrifera* fait partie de la famille des *Nereididae* et cette dernière présente un réel complexe d'espèce. D'où la nécessité d'une comparaison au plan moléculaire pour pouvoir confirmer la parenté entre les différentes formes de *Perinereis cultrifera* en utilisant les techniques de phyllogénétique et de la taxonomie numérique.

Dans ce but s'inscrit notre travail qui a pour but d'optimisé et de personnalisé un protocole d'extraction d'ADN et d'avoir le meilleur rendement en prenant compte tous les paramètres qui peuvent influence notre qualité d'ADN. Les résultats montrent que la partie médiane ainsi que le conditionnement dans d'alcool et le poids des échantillons peuvent nettement améliorer notre rendement.

Mots clés : Annélides Polychètes, phyllogénétique, extraction d'ADN, *Perinereis cultrifera*.

Summary

Annelides Polychets are one of tax most abundant in the benthic communities in terms with numerical richness and biodiversity. The Annelide Polychet *Perinereis cultrifera* belonged to the family of *Nereididae* and she presents a real complex of species. From where the need for a comparison in the molecular plan to be able to confirm the relationship between the various forms of *Perinereis cultrifera* by using the techniques of phylogenetic and numerical taxonomy.

In this target is registered our work who the purpose of which is of optimized and of personalized a protocol of extraction of DNA and to have the best output by taking account all parameters which can influence our quality of DNA. The results show that the median part as well as conditioning in alcohol and the weight of the samples can clearly improve our output.

Key words: Annelides Polychetes, phylogenetic, extraction of DNA, *Perinereis cultrifera*.

الملخص

الحلقيات متعددة الأشواك هي واحدة من الأصناف الأكثر وفرة في المجتمعات و الوسائط الفقيرة من الأكسجين من حيث الثروة الرقمية والتنوع البيولوجي. والدودة (*Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840) التي تنتمي الى عائلة الحلقيات *Nereididae* وهذه الأخيرة قضية معقدة في حد ذاتها . ومن هنا جاءت الحاجة إلى إجراء مقارنة على المستوى الجزيئي من أجل تأكيد العلاقة بين أشكال مختلفة من *Perinereis cultrifera* باستخدام تقنيات ، علم التقاربات الوراثية و التصنيف العددي.

تحقيقا لهذه الغاية هدف عملنا هو إيجاد بروتوكول أمثل لاستخراج الحمض النووي والحصول على أفضل مردود مع الأخذ بعين الاعتبار جميع العوامل التي يمكن أن تؤثر على نوعية الحمض النووي. وقد أظهرت النتائج أن الجزء المتوسط والتعبئة في الكحول وأوزان العينات يمكن أن تحسن المردود بشكل ملحوظ.

الكلمات المفتاحية : الديدان الحلقية المتعددة الأشواك، علم التقاربات الوراثية، استخراج الحمض النووي،

. *Perinereis cultrifera*