

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة 8 ماي 1945 قالمة

Université 8 Mai 1945 Guelma

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière: Sciences Biologiques

Spécialité/Option: Biologie moléculaire de procaryotes

Département de biologie

**Thème : Amélioration d'une technique d'extraction d'ADN  
d'un annélide polychète «Perinereis cultrifera »**

**Présenté par :**

- BAHLOULI Hadjer
- BENGRAIT Hadjer
- BOUCHEMELLA Nesrin

**Devant le jury composé de :**

Présidente: Mme. MERABET Rym	(M.A.A)	Université de Guelma
Examineur : Mr. ADRAR Nassim	(M.A.A)	Université de Guelma
Encadreur : Mr. YOUNSI Mourad	(M.C.B)	Université de Guelma

Juin 2016

<b>Remerciment</b>	
<b>Listes des figures</b>	
<b>Listes des tableaux</b>	
<b>Listes des abréviations</b>	
<b>Introduction</b> .....	01
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre I : Généralités</b>	
I. Définition des annélides.....	04
II. Caractères généraux des annélides.....	04
III. Classes des annélides.....	04
III.1. Classe des oligochètes.....	05
III.1.1. Définition.....	05
III.1.2. Morphologie.....	05
III.1.3. Biologie.....	06
III.2. Classe des achètes ou hirudinées.....	06
III.2.1. Définition.....	06
III.2.2- Morphologie.....	06
III.2.3. Biologie.....	07
III.3. Classe des polychètes.....	08
III.3.1. Définition.....	09
III.3.2. Morphologie.....	09
III.3.3. Reproduction.....	09
IV: Perinereiscultrifera.....	10
IV.1. Morphologie de Perinereiscultrifera.....	12
IV.1.1. La tête.....	12
IV.1.2. Le prostomium.....	12

IV.1.3. Le peristomium.....	12
IV.1.4. Le tronc.....	13
IV.1.5. Parapode.....	13
IV.1.6. Le pygidium.....	14
I. Reproduction.....	15
II Cycle de développement.....	17
I. Définition de L'ADN :.....	20
II. Structure de L'ADN :.....	21
II.1. Structure primaire :.....	21
II.2. Structure secondaire.....	21
III. Constituants de L'ADN :.....	22
III.1. Les bases.....	22
III.2. Les nucléotides :.....	22
III.3. Les nucléosides :.....	23
III.4. Liaisons phosphodiesters :.....	24
IV. Propriétés de la molécule d'ADN :.....	24
IV.1. Complémentarité.....	24
IV.2. Antiparallélisme :.....	25
IV.3. Dénaturation et renaturation (hybridation) :.....	25
IV.4. Absorption des UV :.....	25
IV.5. Formation de sillon :.....	25
V. Les fonctions de l'ADN :.....	27
V.1. Stockage de l'information génétique.....	27
V.2. Réplication et hérédité.....	27
V.3. Expression du message génétique :.....	28
VI. Extraction :.....	28
VI.1. Principe.....	28
VI.2. Définition :.....	28

VI.3. Les principales étapes de l'extraction de l'ADN .....	29
VI.3.1. Fragmentation des tissus : .....	29
VI.3.2. Séparation de l'ADN des autres constituants .....	30
VI.3.3. Récupération de l'ADN.....	30

## Chapitre II

### Matériel et Méthodes

I. Présentation des sites.....	32
II. Mode de récolte.....	36
III. Mesure de poids et détermination des sexes.....	37
IV. Relation entre poids frais essuyé et poids partiel formolé.....	39
V. Distribution de fréquence de taille.....	40
V.1. Indices écologiques .....	40
V.2. L'équitabilité ou équipartition.....	42
V.I. Extraction d'ADN à partir de la partie médiane de <i>Perinereis cultrifera</i> .....	43
VII : Quantification de l'ADN par spectrophotométrie : .....	46

### Résultats et discussion

1. Indices écologiques .....	54
2. Relation d'allométrie entre la quantité d'ADN et le poids des individus.....	55
3. Relation entre la quantité d'ADN et le sexe des individus.....	56
4. Efficacité de la méthode de récolte.....	57
5. Segmentation du ver et quantité d'ADN.....	59
6. Poids des échantillons et quantité d'ADN.....	59
7. Pureté d'ADN .....	60
VI : La durée du protocole :.....	61
<b>Conclusion</b> .....	63

**Références bibliographiques**

**Annexe**

**Glossaire**

**Résumé**

Produced with ScanTOPDF

## **Remerciement**

*En préambule à ce mémoire nous remercions **ALLAH** qui nous aide et nous donne la patience et le courage durant ces longues années d'étude.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont apporté leur aide et qui nous ont contribué à l'élaboration de ce mémoire, ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.*

*Nous tenons à saisir cette occasion et adresser nos sincères remerciements et nos profondes reconnaissances à :*

*Monsieur **Younsi Mourad**, notre encadreur de mémoire de fin d'étude, pour ses précieux conseils et son orientation ficelée tout au long de notre recherche. Sans oublier le membre de jury qui ont pris la peine d'évaluer notre travail.*

*A nos familles et, à tous nos proches amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.*

*Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce modeste travail.*

*Merci à tous et à toutes.*

**Hadjer, Hadjer, Nesrine.**

Figures	Titres	Pages
Figure n°1	photographie représente la structure générale de verre de terre	05
Figure n°2	photographie représente la structure générale des hirudinoïdes	07
Figure n°3	photographie de <i>perinereiscultrifera</i>	11
Figure n°4	Région antérieure de <i>P. cultrifera</i> : vue dorsale (trompe dévaginée) (x 10).	13
Figure n°5	Région antérieure et médiane de <i>P. cultrifera</i> : vue dorsale: montrant la métamérisation du corps (x 2.5).	13
Figure n°6	Organisation d'un parapode de <i>P. cultrifera</i> (x 16).	14
Figure n°7	Partie postérieure de <i>P. cultrifera</i> : vue dorsale: montrant le pygidium (x 8.5).	14
Figure n°8	Dimorphisme sexuel chez <i>P. cultrifera</i> : Femelle (A) et mâle (B) (x 10).	16
Figure n°9	La transformation somatique chez <i>P. cultrifera</i> lors de la reproduction. B: coupe transversale d'un métamère, C: développement des parapodes).	17
Figure n°10	cycle de vie de <i>P. cultrifera</i> d'après	18
Figure n°11	Site d'échantillonnage de <i>Perinereiscultrifera</i> sur le littoral Est Algérien à El-Kala	20
Figure n°12	Site d'échantillonnage de <i>perinereiscultrifera</i> le littoral nord-Est Algérien à Annaba « saint claude »	21
Figure n°13	Site d'échantillonnage de <i>Perinereiscultrifera</i> sur le littoral Est Algérien à Skikda	21
Figure n°14	Site d'échantillonnage de <i>Perinereiscultrifera</i> (A : Bône / B : saint Michel)	22
Figure n°15	Site d'échantillonnage de <i>Perinereiscultrifera</i>	23
Figure n°16	Méthode d'échantillonnage (A : chimique et B : par raclage)	26
Figure n°17	Les bouteilles des échantillons.	28
Figure n°18	la mesure de poids et l'identification de sexe.	31
Figure n°19	division de la partie médiane de l'individu numéro 01.	32
Figure n°20	Relation entre poids partiel formolé essuyé et poids frais essuyé	33

Figure n°21	Histogramme de distribution de fréquence du rang de cassure	34
Figure n°22	Représentation schématique de la méthode de mesure de la densité	34
Figure n°23	Préparation du tampon d'Extraction	35
Figure n°24	Agitation du tampon	36
Figure n°25	Incubation du tampon et les échantillons	37
Figure n°26	Les étapes d'Extraction	37
Figure n°27	Relation entre poids partiel formale essuyé et poids frais essuyé	38
Figure n°28	Histogramme de distribution de fréquence du rang de cassure	39
Figure n°29	Représentation schématique de la méthode de mesure de la densité	41
Figure n°30	Préparation du tampon d'Extraction	43
Figure n°31	Agitation du tampon	43
Figure n°32	Incubation du tampon et les échantillons	43
Figure n°33	Les étapes d'Extraction	45
Figure n°34	Espèces identifiées de la faune au niveau des sites d'étude	49
Figure n°35	Espèces identifiées de la flore au niveau des sites d'étude	51
Figure n°36	Courbes de corrélation entre la quantité d'ADN et le poids des individus	55
Figure n°37	Histogramme de la quantité d'ADN selon le sexe des individus	56
Figure n°38	Histogramme de la quantité d'ADN selon mode de récolte et conditionnement	57
Figure n°39	Histogramme de la quantité d'ADN selon la segmentation du ver	58
Figure n°40	Histogramme de la quantité d'ADN selon les poids des échantillons	59
Figure n°41	Histogramme de pureté d'ADN selon les poids des échantillons des régions médiane	60
Figure n°42	Histogramme de quantité d'ADN selon la durée du protocole	61

Tableaux	Titres	Pages
Tableau 1	Les espèces identifiées et recensées au niveau des sites d'étude (Faune)	48
Tableau 2	Nombre d'individus (ni) des différentes espèces du peuplement	53
Tableau 3	Caractéristiques du peuplement des trois sites par la richesse spécifique et l'abondance	54

Produced with Scantopdf

**A**

**A** : Adénine.

**ADN** : acide désoxyribonucléique.

**ARN** : acide ribonucléique.

**C**

**C** : Cytosine.

**CIA** : chloroforme Iso-Amyle.

**E**

**EDTA** : Ethylène Diamine Tétra Acétate ; chélateur (fixateur) d'ions  $Ca^{2+}$

**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.

# **Partie bibliographique**

Produced with [www.scantopdf.eu](http://www.scantopdf.eu)

# Introduction

Produced with ScanTOPDF

Le monde vivant peut être considéré comme une suite de niveaux d'organisation de complexité croissante. Le premier niveau, le plus bas, est représenté par les molécules essentielles à la vie à savoir, le matériel héréditaire ; porteur de l'information génétique qui contrôle le déroulement de l'horloge du cycle de vie ainsi que le développement de l'individu, le plus complexe correspond aux écosystèmes. La diversité biologique est présente à chacun de ces niveaux. La notion de biodiversité recouvre donc un grand nombre de concepts à des échelles et à des niveaux différents qu'il est impossible de la réduire à une seule unité de mesure.

La biodiversité et les problèmes de conservation des espèces vivantes comme patrimoine et ressources pour l'humanité sont des thèmes d'actualité par excellence surtout dans le monde marin. 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. (Younsi 2006)

Les Annélides polychètes constituent avec les Mollusques bivalves, les Crustacés et les Echinodermes les groupes dominant de la macrofaune des substrats meubles. Elles sont utilisées dans la majorité des études écologiques des communautés benthiques étant donné qu'elles apportent des renseignements tout à fait indispensables pour comprendre, dans une première phase, les changements profonds que subissent actuellement les écosystèmes marins, et agir en conséquence pour limiter les dégâts.

Ainsi, les communautés benthiques intègrent les perturbations et répondent par des fluctuations de leurs paramètres de structure, tels que le nombre d'espèces et l'abondance.

De ce fait, les polychètes sont largement utilisés comme des indicateurs des conditions écologiques des écosystèmes marins et côtiers.

D'une manière générale, ces organismes relativement sédentaires, ont des cycles vitaux longs qui leur permettent d'intégrer les effets des perturbations tant accidentelles que chroniques et présentent différents degrés de tolérance au stress.

La classe Polychaeta qui fait partie du Phylum Annelida, important groupe d'animaux fréquemment nommés « vers segmentés », représente la plupart de la diversité des annélides. Les polychètes sont probablement le groupe les plus abondant et le plus divers dans les sédiments marins. Ils colonisent une grande diversité d'habitats marins, des substrats meubles aux substrats durs, depuis la zone intertidale à la zone hadale et sont considérés comme des indicateurs permettant d'identifier les principales conditions qui contrôlent la structure et le fonctionnement des communautés benthiques. Avec plus de 10000 espèces décrites dans le monde, sur le plateau continental et dans les zones profondes, les polychètes représentent entre 40 et 80% de l'endofaune. Ces organismes ont développé différentes stratégies de vie pour s'adapter à un grand nombre d'habitats, particulièrement sur les substrats durs et les sédiments sableux et vaseux ; ces stratégies incluent une grande variabilité morphologique, de types d'alimentation et de modes de reproduction. Les polychètes sont un des groupes les plus caractéristiques des communautés benthiques des fonds meubles et un des plus riches taxons benthiques en ce qui concerne la richesse spécifique. Ce groupe domine souvent la macrofaune benthique et peut être considéré comme un bon « proxy » pour décrire la distribution des communautés macrobenthiques quand il est le composant principal de la macrofaune. Ils comprennent la majorité (60-70%) des individus macrozoobenthiques des fonds marins meubles et peuvent être utilisés comme marqueurs de différentes conditions écologiques. Ils représentent jusqu'à 90-100% des peuplements zoobenthiques dans les sédiments meubles perturbés.

La présence/absence de certaines espèces peut refléter les changements environnementaux tels que pollutions, enrichissements en nutriments. Dans les eaux peu profondes et profondes, la composition spécifique, la diversité et l'abondance sont aussi influencées par les perturbations environnementales. Dans les systèmes marins, les polychètes comme « proies » de la biodiversité benthique peuvent être très informatifs pour évaluer les conditions ou santé des environnements benthiques.

Dans la plupart des cas, les assemblages des polychètes montrent les mêmes patrons de distribution que la totalité de la faune benthique et peuvent donc être considérés comme représentants de la biodiversité marine.

De plus, les polychètes sont considérés comme appropriés aux études biogéographiques car, contrairement à d'autres taxons, leur taxonomie est relativement bien décrite.

Cependant ont mentionne que la systematique des polychetes est encore instable principalement en raison de nombreuses synonymies, ils englobent aussi plusieurs niveaux trophiques et histoires de vie et sont très souvent très bien représentés par un bon nombre d'espèces et de familles dans les échantillons. (Meghlaoui, 2015)

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, 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 .

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. (Somma 2002) .

# Chapitre I :

# Généralités

Produced with Scantopdf

Les Annélides sont l'un des embranchements actuellement les plus diversifiés (le 7ème) et possèdent plusieurs adaptations importantes qui ont assuré leur succès. À l'image des membres de l'embranchement des Arthropodes, le plus diversifié actuellement, ils dérivent d'un ver plat. Leur caractéristique la plus évidente c'est leur anatomie externe et leur segmentations (ou métamérisation). (1)

### **I. Définition des annélides :**

L'embranchement des annélides regroupe un ensemble d'animaux de milieu et mode de vie variés : aquatiques et libres (Nereis, Sabelle, Arénicole), dulçaquicoles et parasites (sangsues), Terrestres et libres (lombric).

Les annélides sont des organismes vermiformes protostomiens de taille variable de quelque centimètre à quelque mètre. Ils possèdent un corps de section cylindrique, doté d'une symétrie bilatérale et métamérisé c'est-à-dire qui semble composé d'une série d'anneaux identiques. (2)

### **II. Caractères généraux des annélides :**

- Corps segmenté tube digestif complet développement d'un système circulaire fermé.
- Squelette hydrostatique segmenté
- Segment antérieur spécialisé formé d'anneaux ou métamères.
- Cavité à l'intérieur de leur corps contient les différents organes (cœlome ou coelome)
- Un œuf présentant une segmentation de type spiral. (3)

### **III. Classes des annélides:**

Les annélides forment un embranchement très ancien. Les paléontologistes ont trouvé les premières traces dans des sédiments âgés de 700 million d'années. La métamérisation serait plus récente environ 570 million d'années. L'embranchement des annélides se subdivise en 3 classes : (4)

### III.1. Classe des oligochètes :

#### III.1.1. Définition :

C'est une sous-classe de l'embranchement des annélides essentiellement terrestres ou dulcicoles. Le groupe compte environ 3000 espèces (*Lumbricus terrestris*) il s'agit de vers hermaphrodites au corps métamérisé et dont les segments qui le composent portent chacun 4 paires de soies : deux ventrales et deux latéro-ventrales. (5)

#### III.1.2. Morphologie :

Le corps va le plus souvent du rose au marron, parfois irisé avec des reflets violets.

Quelques espèces sont très colorées (orange ou turquoise, notamment chez certains *Trigaster* d'Amérique centrale). Du fait d'une respiration cutanée (les vers de terre ne possèdent pas des poumons), le corps est recouvert de mucus pour maintenir la peau humide.

Le corps est annelé c'est-à-dire composé d'anneaux ou segments. Certains segments ont un rôle particulier : pointe pour le premier, bouche située ventralement pour le deuxième et anus pour le dernier. Le premier segment est appelé prostomium, le second peristomium et le dernier pygidium. (6)

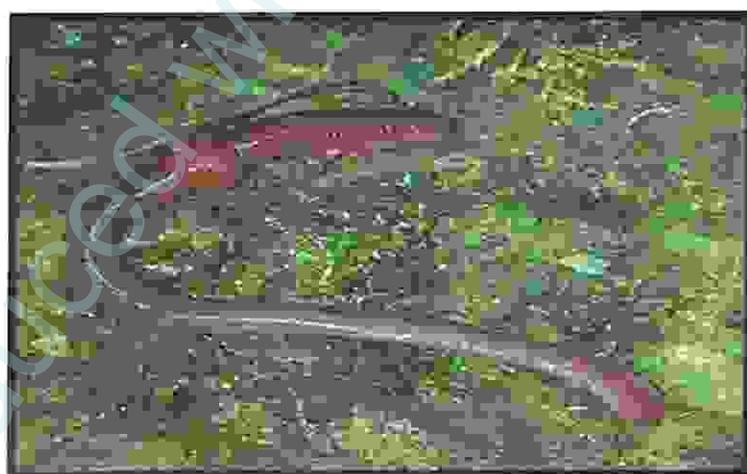


Figure 1 : Photographie représente la structure générale de ver de terre.

### III.1.3. Biologie :

#### Locomotion :

Le lombric se déplace grâce à la contraction de nombreux muscles contenus dans chaque anneau. Il rampe : c'est le rampement. Ce mode de déplacement est à différencier de la reptation qui correspond à l'ondulation du corps de certains vertébrés. Il s'accroche aux aspérités du sol par les soies de la face ventrale. (6)

#### Alimentation :

Le ver de terre vit dans le sol pendant la journée et remonte en surface la nuit. Il explore la litière, choisit ces aliments, les mange sur place ou les met en réserve dans les galeries, en les tirant grâce à sa bouche qui fonctionne comme une ventouse. (6)

#### Reproduction :

Les lombrics sont hermaphrodites, c'est-à-dire à la fois mâle et femelle. Ils pondent leurs œufs dans une sorte de cocon de mucus, après un accouplement au cours duquel se fait un échange de spermatozoïdes. (6)

## III.2. Classe des achètes ou hirudinées :

### III.2.1. Définition :

Les Hirudinées (sangues) sont des animaux aquatiques ou terrestres, fréquemment ectoparasites des vertébrés. En adaptation au mode de nutrition particulier, qui consiste à sucer le sang d'un animal, les sangues ont développé des structures uniques, telles que des ventouses ventrales (antérieure et postérieure) pour se cramponner à leurs hôtes, et des diverticules du jabot, pour le stockage du sang. Environ 300 espèces connues.

Les Hirudinées diffèrent des autres Annélides par :

- L'absence de parapodes et de soies.
- Un nombre fixe de segments, avec une annulation externe secondaire.
- Des ventouses ventrales, aux deux extrémités du corps.
- Un cœlome réduit, rempli pour la plupart de mésenchyme. (7)

### III.2.2. Morphologie :

Le corps vermiforme sub-cylindrique est aplati ventralement. Souvent de couleur grisâtre à noir suivant l'âge et/ou l'espèce. La morphologie extérieure peu aussi varié suivant la quantité de sang accumulée dans le tube digestif. Les hirudinées ont 33 segments non clairement définis en raison d'absence de soies et de parapodes. La distinction des segments est essentiellement basée sur la distribution des paires de ganglion de la chaîne ventrale. Les ventouses sont dissemblables. L'antérieure qui entoure la bouche étant généralement plus petite que la ventouse postérieure. (8)



**Figure 2 :** Photographie représente la structure générale des hirudinées.

Le corps est divisé en 5 régions :

- La région céphalique de 4 segments portant la ventouse orale, la bouche, les yeux et les mâchoires.
- Le préclitellum de 4 segments
- Le clitellum de 3 segments (en général ce sont les segments 9, 10, 11)
- La région moyenne de 15 segments
- La région terminale de 7 segments, modifiée pour former la ventouse postérieure.

### III.2.3. Biologie :

#### Locomotion et mouvements :

Les sangsues peuvent nager ou se déplacer par ondulation de leur corps ou se promener à la manière des chenilles. C'est-à-dire en plaçant la partie postérieure de leur corps contre la partie avant en formant une sorte de boucle (en forme d'Omega). (7)

#### Nutrition :

Certaines espèces sont des parasites qui sucent le sang des poissons et gros invertébrés. D'autres espèces sont des charognards se nourrissant de cadavres.

Dans le cas où une sangsue se fixe au corps d'un poisson pour se nourrir en suçant son sang, la sangsue est appelée parasite du poisson car elle tire sa subsistance mais sans le faire mourir. Dans cette relation on dit que le poisson est l'hôte et la sangsue le parasite. La sangsue en se nourrissant peut prendre de 20 à 50 fois leur volume. (7)

#### Reproduction :

Les Hirudinées sont des hermaphrodites avec une seule paire d'ovaires et de nombreux testicules. L'appareil mâle est généralement muni d'un pénis. Si celui-ci manque se sont des spermatophores qui seront déposés contre la paroi de l'autre individu ; le sperme migre à travers la paroi du corps pour aller féconder les œufs dans les ovisacs qui contiennent les ovaires. Un cocon est sécrété pour recueillir les œufs. Les cocons sont ensuite déposés sur le sol humide ou sur des végétaux. Les œufs sont ovales et foncés, ils mettent entre 13 à 80 jours pour éclore suivant la température de l'eau. (7)

#### Importance médicale :

Les sangsues sont utilisées pour stimuler la circulation sanguine. En effet lorsqu'une cicatrice se forme, il arrive que des vaisseaux sanguins se bloquent. En se frayant un passage sous la peau, la sangsue libère des anticoagulants en grande quantité. Cela permet aux caillots de se dissoudre, ce qui rétablit la circulation. (7)

### III.3. Classe des polychètes

#### III.3.1. Définition :

Il s'agit du plus grand groupe d'Annélides, qui compte plus de 10'000 espèces actuelles, la plupart marines. La taille présente de grandes variations, de quelques cm jusqu'à 3 m de longueur. Beaucoup de formes sont vivement colorées. (7)

#### III.3.2. Morphologie :

Typiquement, un ver polychète comprend :

- Une tête ou **prostomium**, pouvant porter des ocellés, des antennes, des cirrhes et une paire de palpes.
- Le premier segment ou **peristomium**, portant la bouche et parfois des soies, le panache de tentacules ou des palpes.
- Le **tronc**, qui consiste en un nombre défini ou indéfini de segments, tous semblables, ou modifiés au niveau de régions spécialisées.
- Le dernier segment ou **pygidium**.

La plupart des segments du tronc portent une paire d'expansions du corps, les **parapodes**. Chaque parapode peut être simple ou double, dans ce dernier cas composé d'un notopodium dorsal et d'un neuropodium ventral. Les deux parties du parapode peuvent aussi porter des lobes, des plis, des tentacules ou des cirrhes. Typiquement, les parapodes portent des **soies** abondantes, d'où le nom du groupe. Les soies ont des fonctions dans la natation, l'adhésion, la respiration, la reproduction, la défense, et fonctionnent aussi en tant qu'organes sensoriels. (7)

### III.3.3. Reproduction :

#### Sexuée :

Cette reproduction nécessite l'émission de gamètes (les polychètes sont des organismes à sexes séparés, les produits sexuels sont émis dans l'eau où se déroule la fécondation qui conduit à la formation d'une larve planctonique).

#### Asexuée :

Peut se faire par bourgeonnement ou par segmentation simple. (9)

### Classification des polychètes :

Une classification traditionnelle, fondée sur l'écologie, subdivise les Polychètes en deux groupes :

#### Polychètes errante :

(Nereis, Aphroditéa) ce sont prédateurs ou détritivores et se déplacent en rampant sur le substrat ou en creusant le sédiment. Ces vers « errants » possèdent une tête bien visible et souvent pourvue de crochets qui servent de mâchoire. Ce sont des prédateurs ayant une mâchoire robuste (ou trompe) qui peuvent nager et ramper grâce à leurs parapodes, ils se nourrissent de proies proportionnelles à leur taille et peuvent être nécrophages. (9)

#### Polychètes sédentaires :

Ces vers sédentaires demeurent toujours au même endroit et ont une petite tête, peu différenciée du reste de leur corps. La plupart vivent dans des tubes à la surface du sédiment ou encore dans des tunnels qu'ils creusent. Certains polychètes sédentaires se nourrissent de vase d'où ils extraient les éléments nutritifs. D'autres portent des cils qui leur permettent de capter leur nourriture.

Généralement abondants sur les fonds marins, les polychètes constituent la base de l'alimentation de plusieurs espèces de poissons et d'oiseaux et sont très importants dans la chaîne alimentaire (tubicole ou limicole). (9)

**Tubicole (spirographe, serpule) :**

Leurs branchies s'ouvrent en panache à l'extrémité d'un tube qui sert à filtrer l'O<sub>2</sub> de l'eau mais aussi la nourriture. Ce tube se rétracte au moindre danger. (9)

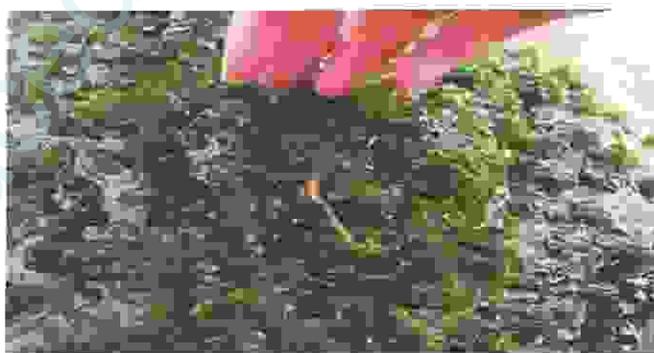
**Limicole (vers fousseurs) :**

Ces vers possèdent des tentacules pour prendre la nourriture, une trompe pour broyer les proies et creuser leur terriers et leurs filaments plumeux le long du corps servent à capter l'oxygène. Ils se nourrissent en filtrant le sable pour en extraire la matière organique, le sable propre est ensuite excrété. (9)

**IV : *Perinereis cultrifera* :**

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)

*Perinereis cultrifera* est comme les Polychètes Errantes, plutôt carnassière, elle dévore de petits crustacés, des mollusques, des vers, grâce à sa trompe garnie de dents. (Francois Caner.1981)



**Figure 3:** Photographie de *perinereis cultrifera*

#### IV.1.Morphologie de *Perinereis cultrifera* :

En général le corps d'un Annelide Polychète comprend trois parties (Fauvel, 1923), il est très allongé, légèrement aplati dans le sens dorso-ventral, présente trois régions présentées comme suite :

##### IV.1.1.La tête :

Ou région céphalique, caractérisé par la présence de la bouche et des organes sensoriels. Elle est formée du prostomium, en avant de la bouche ventrale, et du péristomium, qui porte cette bouche. (Allouti, 2011)

##### IV.1.2.Le prostomium :

Ou acron, triangulaire, porte dorsalement deux paires d'yeux simples, et plus en avant, une paire d'antennes filiformes. Ventralement et latéralement, deux palpes renflés sont insérés au voisinage de la bouche. Le prostomium, comme d'ailleurs le pygidium, n'est pas homologue des autres segments, il ne présente pas extérieurement d'expansions locomotrices, ni intérieurement de coelome, son origine embryologique est d'ailleurs différente. (Guemouda, 2015)

##### IV.1.3.Le péristomium :

Porte ventralement la bouche; latéralement il présente des organes sensoriels allongés, les cirres tentaculaires, au nombre de quatre paires. De tels cirres se retrouvent sur les parapodes du tronc, avec deux paires pour chaque métamère ; on doit considérer les cirres du péristomium, très allongés, comme dérivant de parapodes réduits dans leurs autres parties ; on est donc conduit à considérer le prostomium comme résultant de la fusion de deux métamères. (Guemouda, 2015)

A la bouche fait suite le pharynx, qui peut se dévagner en se retrouvant et se projetant extérieurement, il dépasse alors largement le prostomium et forme une trompe armée d'épaississements chitineux. Le pharynx invaginé est visible par transparence. (Guemouda, 2015)

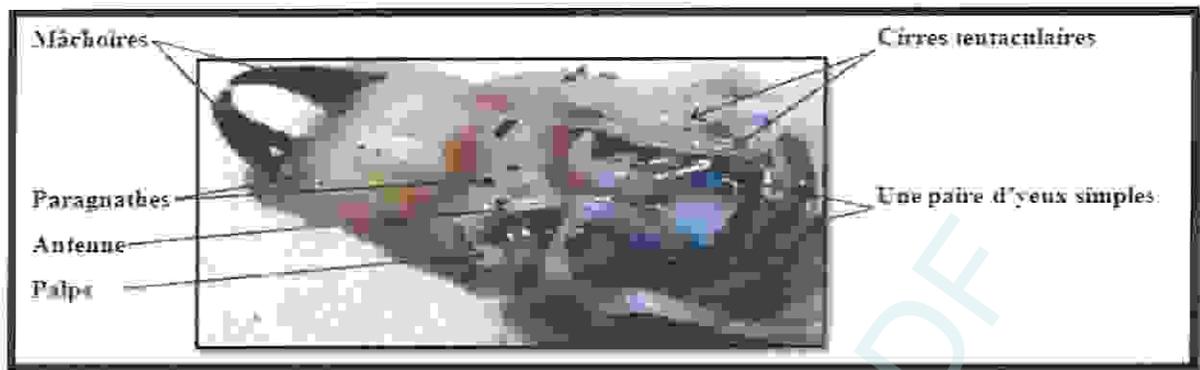


Figure 4 : Région antérieure de *P. cultrifera*; vue dorsale (trompe dévaginée) (x 10).

#### IV.1.4. Le tronc :

Où la segmentation externe bien visible correspond à la métamérisation. Il est formé de nombreux métamères, plus petits à l'extrémité postérieure, où ils se forment successivement, tant que l'animal grandit, en avant du pygidium. Chaque métamère présente latéralement une paire d'expansions de la paroi du corps, les parapodes, à rôle locomoteur. (Guemouda, 2015)

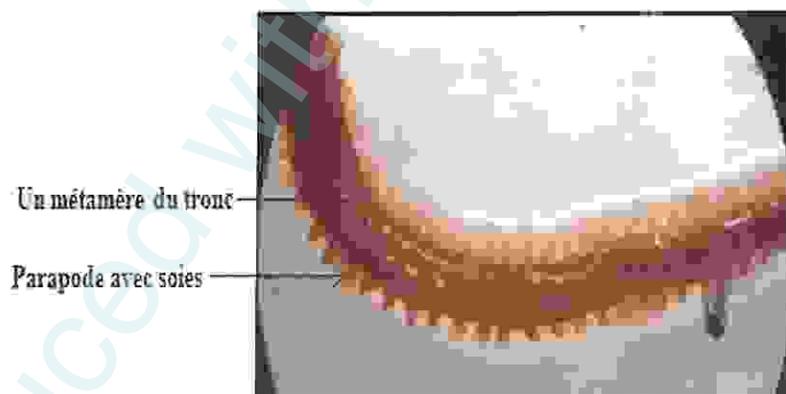


Figure 5 : Région antérieure et médiane de *P. cultrifera*, vue dorsale; montrant la métamérisation du corps (x 2,5).

#### IV.1.5. Parapode :

Est divisé en deux rames, une rame dorsale ou notopode, une rame ventrale ou neuropode. Chaque rame porte un bouquet de soies chitineuses et est soutenue par une baguette chitineuse, l'acicule, elle présente encore un prolongement sensoriel filiforme; le cirre, il existe une cirre dorsal et un cirre ventral, à chaque parapode. (Allouti, 2011).

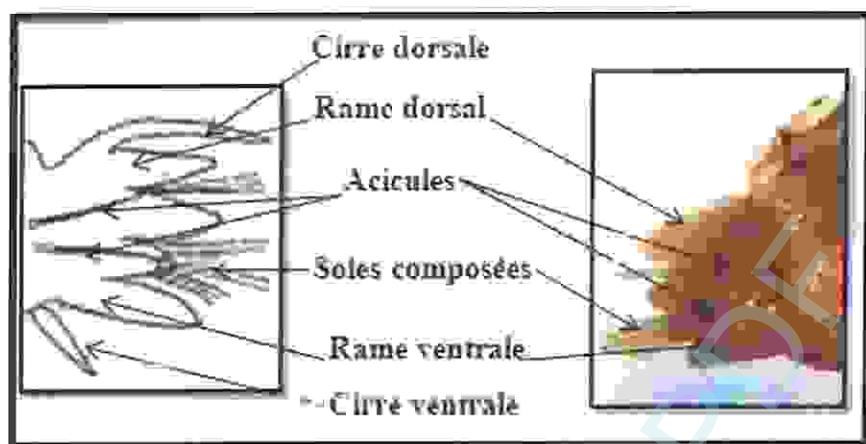


Figure 6 : Organisation d'un parapode de *P. cultrifera* (x 16).

#### IV.1.6. Le pygidium :

Partie postérieure qui porte l'anus, qui est terminal. Comme le prostomium, le pygidium n'est pas homologue des autres segments, ce n'est pas un métamère, il ne présente pas de parapodes et ne comporte pas de coelome. Il montre deux fins prolongements tactiles, les cirres caudaux. (Guemouda, 2015).

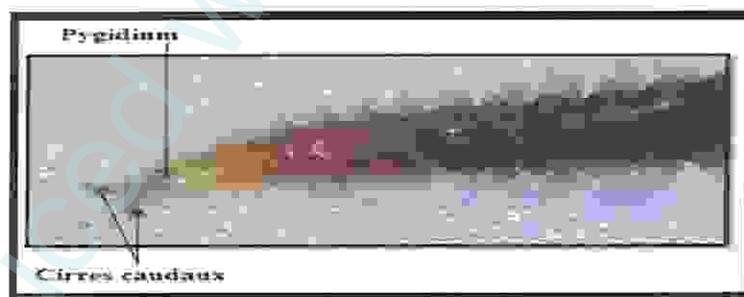


Figure 7 : Partie postérieure de *P. cultrifera*, vue dorsale; montrant le pygidium (x 8,5).

*Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840), est un Annélide Polychète appartenant à la famille des Nereidae, de couleur bronze vert avec un rouge clair dorsal, a une longueur de 10 à 25 cm . C'est une espèce benthique caractérisée par une large répartition géographique, occupant la méditerranée, le Nord-Ouest de l'Europe, l'océan Atlantique, l'océan Indien, et le pacifique.

En Algérie, elle est communément appelée « ver vert de roche » ou « ver à antennes et à pattes », elle est largement exploitée sur le littoral Est Algérien. On la trouve parmi les Rhodophycées, algues rouges meublant les trottoirs et banquettes. Elle est utilisée pour la pêche à la daurade et la sole (*Solea solea*) et d'autres variétés de poissons tels que le pageot, le petit loup et le marbré. Cette espèce est essentiellement utilisée en tant qu'appât pour la pêche sportive à la ligne et pour la pêche récréative. (Guemouda, 2015)

Selon le registre européen des espèces marines ERMS; sa position systématique citée dans est la suivante:

**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 :** *Perinereiscultrifera*, Grübe 1840 (Younsi ,2006)

### I. Reproduction :

Les polychètes, sauf quelques rares exceptions, ont les sexes séparés. Des espèces montrent un dimorphisme sexuel plus ou moins marqué. Il n'y a, en générale, pas d'organes génitaux bien différenciés. La présence de gamètes sphériques de couleurs jaune claire indiquant les femelles, des amas spermatiques de couleur blanc laiteux indiquant les mâles, et l'absence des gamètes, les vers sont dits indifférenciés. (Guemouda, 2015)

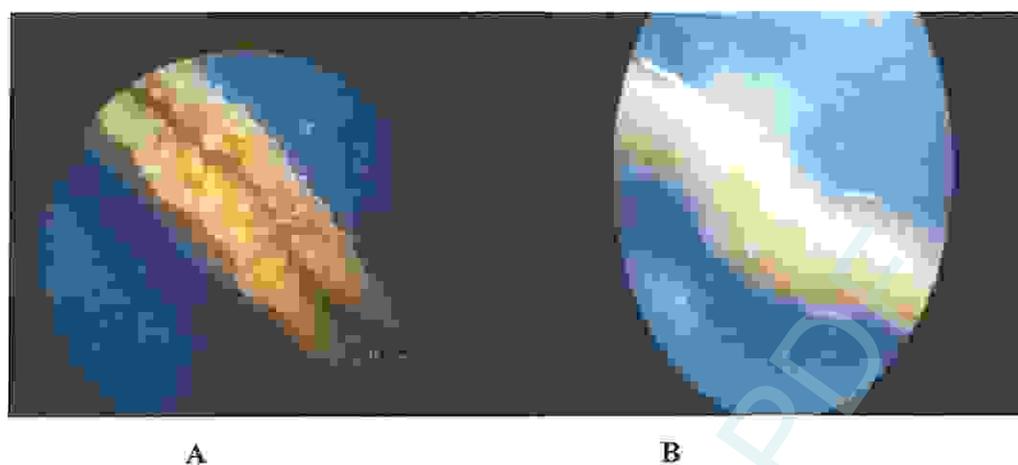


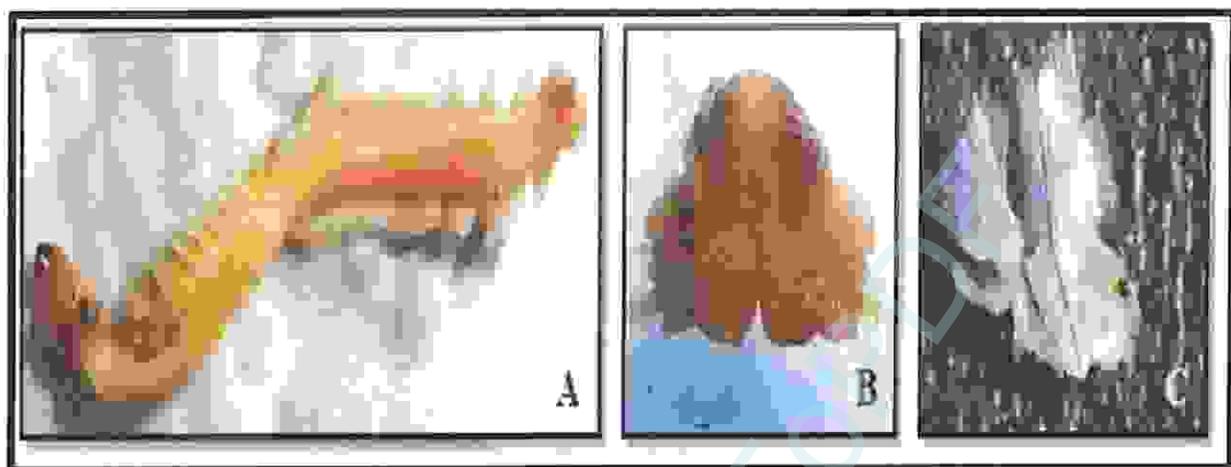
Figure 8 : Dimorphisme sexuel chez *P. cultrifera*: Femelle (A) et mâle (B) (x 10).

*P. cultrifera* est une espèce gonochorique. Selon la distribution géographique des populations, la reproduction s'effectue sans modifications morphologiques (Atoque) ou s'accompagnant de transformations somatiques.

La reproduction de *P. cultrifera* est de type épitoque en Manche et en Atlantique, En méditerranée, sur la baie d'Alger le mode est de type atoque. Sur le littoral Est Algérien le mode de reproduction est épitoque (Rouabah, 2003; Younsi, 2006; Gasmî, 2011).

La maturité sexuelle se traduit par des modifications morphologiques et anatomiques caractéristiques de l'épitoque, ainsi on assiste à une augmentation de la taille des yeux, un élargissement des parapodes, formations des soies hétéronereidiennes disposées en éventail, modifications musculaires dans les segments correspondants à l'exception du 19 ou 20ème segment antérieur ou ils sont tassés les uns contre les autres, ce qui rend l'animal plus court, plus large et aplati à épitoque médiane et postérieure.

Cette métamorphose permet à l'animal, qui devient hétéronereis, de s'adapter à une vie pélagique courte afin de nager vers la surface au moment de l'essaimage qui s'effectue à des périodes bien déterminées avec le cycle lunaire caractérisé par ce qu'on appelle la danse nuptiale (Guemouda, 2015).



**Figure 9 :** A ; la transformation somatiques chez *P. cultrifera* lors de la reproduction. B; coupe transversale d'un métamère. C; développement des parapodes).

La fécondation est externe et la reproduction chez *P. cultrifera* est strictement simple, les géniteurs meurent dans les jours qui suivent l'essaimage et l'évacuation des gamètes se fait par rupture des téguments au moment du rapprochement des sexes.

Chez les Nereidae, l'âge auquel les individus immatures entrent en gamétogénèse, passe à la maturité et enfin à la reproduction, est sous le contrôle de facteurs environnementaux (en plus du contrôle endocrinien tels que la température, la photopériode et le cycle lunaire).

L'observation des données sur les populations étudiées sur le littoral Algérien, montre que le mode de reproduction et la durée de vie varient en fonction de la localisation géographique. Ainsi à Alger, la durée de vie ne dépasse pas 2 ans et la reproduction par atoque, alors qu'à Annaba, durée de vie de trois ans et la reproduction est épitoïque. (Guemouda, 2015)

## II .Cycle de développement :

Chez les polychètes, la reproduction et le développement, deux modes qui sont sensiblement variables même parmi les espèces congénère morphologiquement semblables. Le cycle de vie de certaines espèces d'Annélides Polychètes est caractérisé par des transitions

écologiques qui s'opèrent à deux niveaux, une transition liée au développement et à la croissance des adultes, et une autre liée à la reproduction (dissémination de l'espèce).

(Alloufi, N)

Le cycle de développement est marqué par deux phases semi-pélagiques brèves et benthiques. L'œuf de grande taille, le trophophore, la segmentation spirale aboutit à une larve ciliée la trochophore, le développement de la couronne ciliée aboutit à la formation d'une larve méta trochophore.

L'éclosion a lieu au stade erpochète à 3 sétigères à la fin de la phase semi pélagique. La larve devient benthique au stade erpochete 4 sétigères, perd la couronne ciliée et acquiert les habitudes benthiques, migre vers le bas durant la phase de croissance et de différenciation sexuelle où il accomplit les modifications morphologiques de l'épitoquie.

D'après, chez *P. cultrifera* les œufs fécondés ont tendance à s'agglutiner pour former une grappe qui s'adhère à un substrat, également les larves produisent une substance collante qui les fixe sur un substrat et les empêchent d'être emportées dans la mer ouverte par l'action de la marée. (Guemouda, 2015)

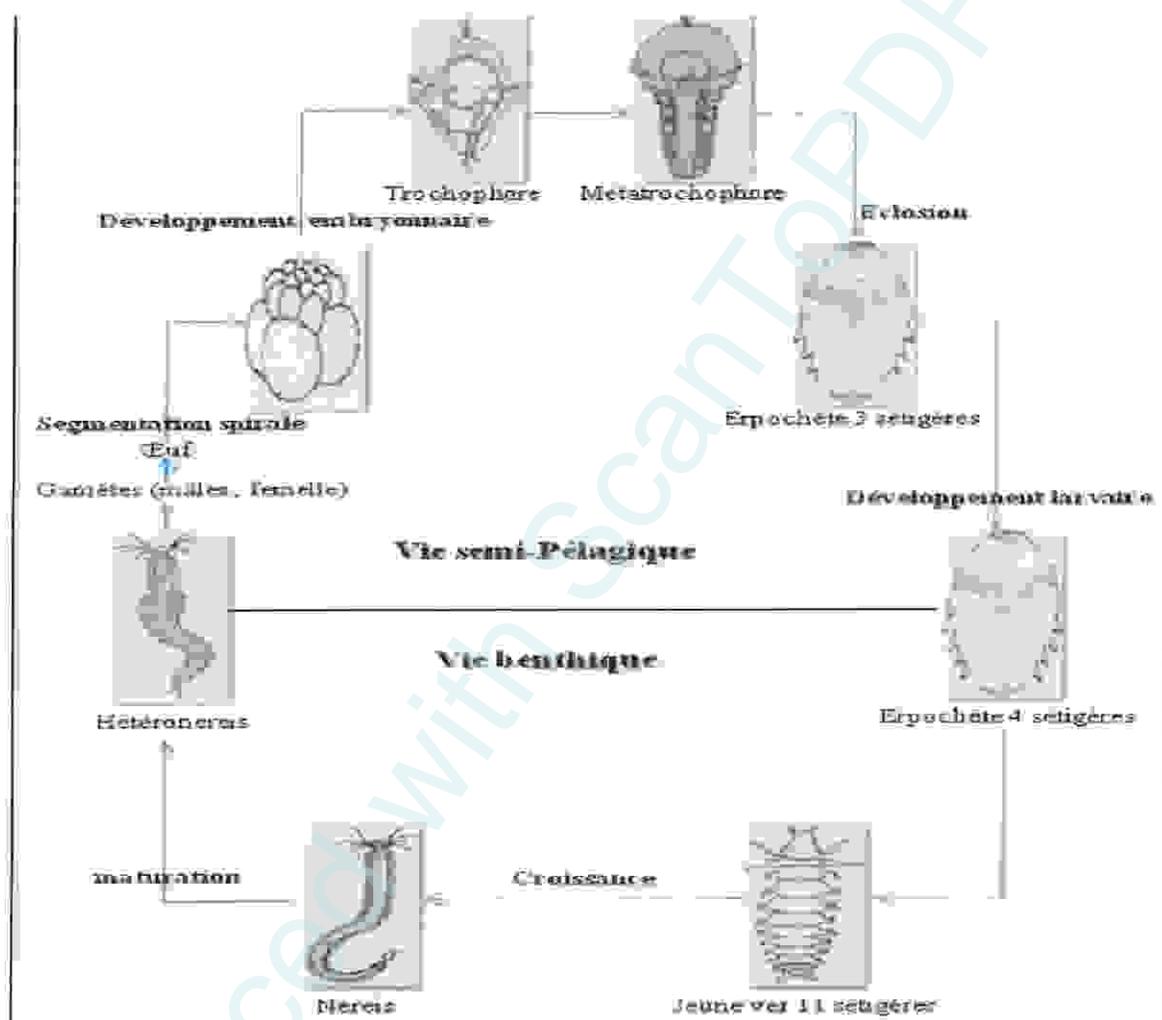


Figure 10 : Cycle de vie de *P. cultrifera* d'après (Guemouda 2015).

En 1869, le Suisse Friedrich Miescher isole une substance riche en phosphore dans le noyau des cellules, qu'il nomme nucléine (du latin *nucleus*, le noyau).

En 1889, l'Allemand Richard Altmann sépare à partir de la nucléine, des protéines et une substance acide, l'acide nucléique.

En 1896, l'Allemand Albrecht Kossel découvre dans l'acide nucléique les quatre bases azotées A, C, T, G.

En 1928, Phoebus Levene et Jacob Lunn (USA) identifient le désoxyribose. En 1935, on parle alors d'acide désoxyribonucléique.

En 1944, l'américain Oswald Avery découvre que l'ADN est responsable de la transformation génétique des bactéries et que ce serait bien le support de l'hérédité. Mais, certains scientifiques restent sceptiques et n'abandonnent pas l'idée que les protéines puissent porter l'information génétique.

En 1952, l'expérience de Hershey et Chase invalide définitivement cette dernière hypothèse. (10)

### **I. Définition de L'ADN :**

L'ADN (Acide Désoxyribo Nucléique) est la molécule qui est utilisée dans la nature comme support matériel de l'information génétique des êtres vivants, un peu comme un livre avec son texte serait un support matériel d'information sur les objets ou idées qui y seraient décrits. C'est dans l'ADN qu'est stocké le "programme de construction" des êtres vivants. C'est le même principe dans tout le monde biologique; on trouve de l'ADN chez tous les animaux, les plantes et chez les bactéries aussi. Ce programme est différent pour chaque espèce; l'ADN vu dans ses détails est différent, mais le langage de programmation est le même. (11)

## II. Structure de L'ADN : On distingue :

### II.1. Structure primaire :

- Il est constitué par l'enchaînement linéaire de nucléotides qui forment un filament non ramifié.
- Chaque nucléotide résulte de l'union d'un désoxyribose, un acide phosphorique et d'une base azotée purique (A-G) ou pyrimidique (T-C).

### II.2. Structure secondaire :

- 2 filaments de polynucléotides sont enroulés l'un sur l'autre en une double hélice.
- Chaque hélice est formée par les nucléotides unies par leur désoxyribose (entre C 3' et 5') au moyen de la molécule d'acide phosphorique.
- Les 2 hélices sont réunies par les liaisons hydrogènes qui forment entre les bases azotées une Complémentarité bien définie : A-T ; G-C. (12)

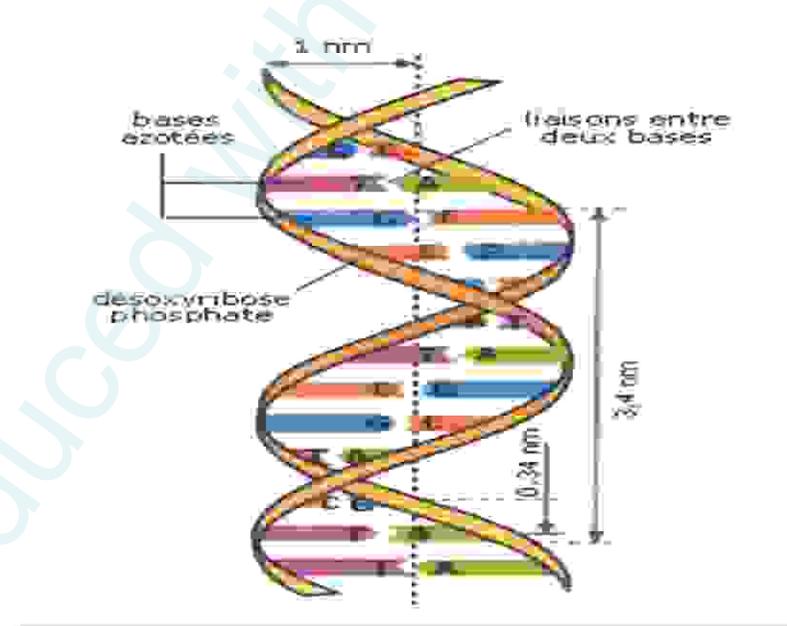


Figure 11 : La structure de l'ADN.

### III. Constituants de L'ADN :

#### III.1. Les bases :

Les paires de base sont au nombre de quatre : Adénine (notée A), Guanine (G), Cytosine (C) et Thymine (T). On distingue les paires de base en deux catégories suivant qu'elles dérivent de la purine (A et G) ou de la pyrimidine (T et C). Ces bases peuvent s'apparier spécifiquement par des liaisons hydrogènes. A s'associe avec T, et G avec C, ainsi que la formule chimique des bases. La liaison A-T (deux liaisons hydrogène) est moins forte que la liaison G-C (trois liaisons hydrogène). On notera que les points de fixation des bases sont excentrés par rapport aux paires de base. Les paires de base forment ainsi un angle entre elles. (Thomas, 2002)

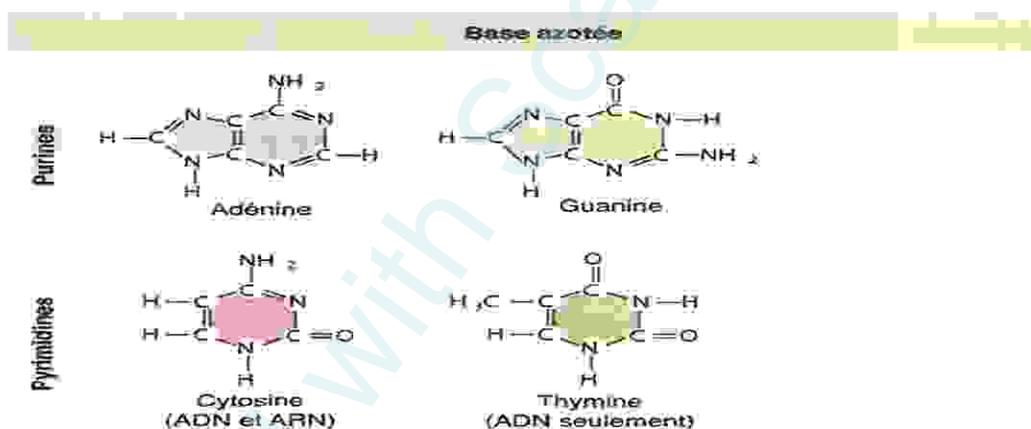


Figure 12 : Les bases azotées (Raven et al. 2014).

#### III.2. Les nucléotides :

Les sous-unités des acides nucléiques sont appelées nucléotides. Chaque nucléotide a la composition suivante :

- Du désoxyribose, qui est un glucide à cinq carbones.
- Un groupement phosphate, qui est fixé au carbone 5' du désoxyribose.
- Une base azotée, dont on décrit quatre types différents : deux purines et deux pyrimidines.

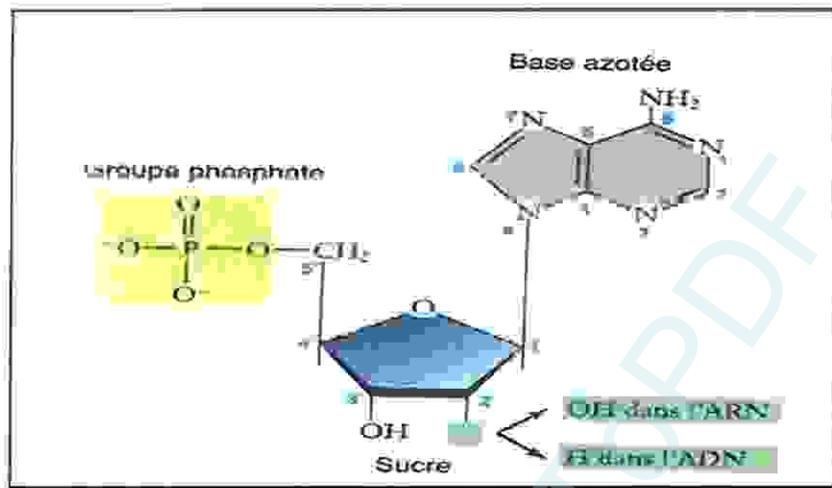


Figure 13 : Structure du nucléotide (Raven et al. 2014).

### III.3.les nucléosides :

Un nucléoside est composé d'une base liée à la molécule de pentose à la position -1' par une liaison covalente. Dans l'ADN le sucre est un désoxyribose-2' et les nucléosides sont appelés désoxyribonucléosides -2' ou simplement des désoxynucléosides. Base + sucre=nucléoside. (Bresnick,stephen D,2004)

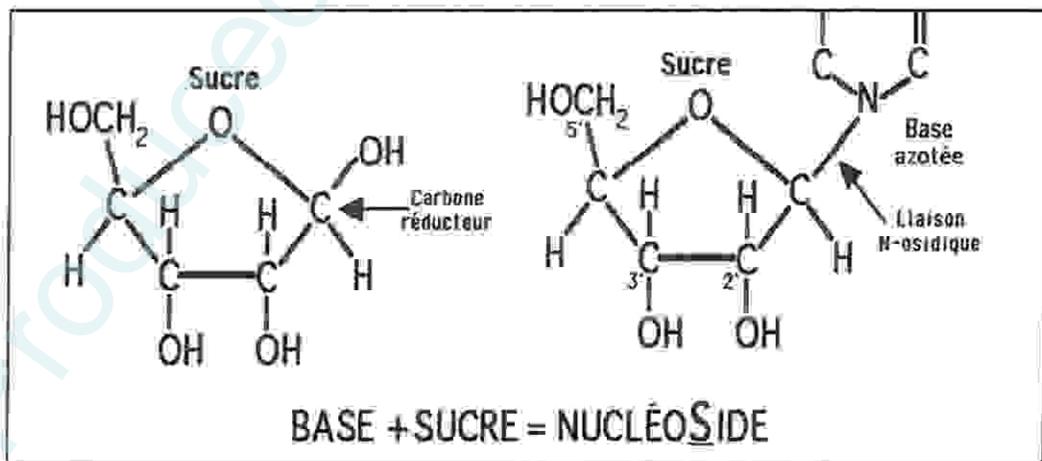


Figure 14: Structure du nucléoside (Housset et Raisonnier, 2006).

### III.4. Liaisons phosphodiester :

Dans les polymères des acides nucléiques, les sucres ribose ou désoxyribose sont liés avec une liaison phosphodiester entre la position 3' du prochain sucre formant ainsi une liaison phosphodiester 3'-5'. Les acides nucléiques comprennent donc un squelette sucre-phosphate directionnel avec une base fixée à la position 1' de chaque sucre. L'unité qui se répète est le nucléotide. Les acides nucléiques sont des polymères hautement chargés négativement sur chaque phosphate. (Turner et al, 2000)

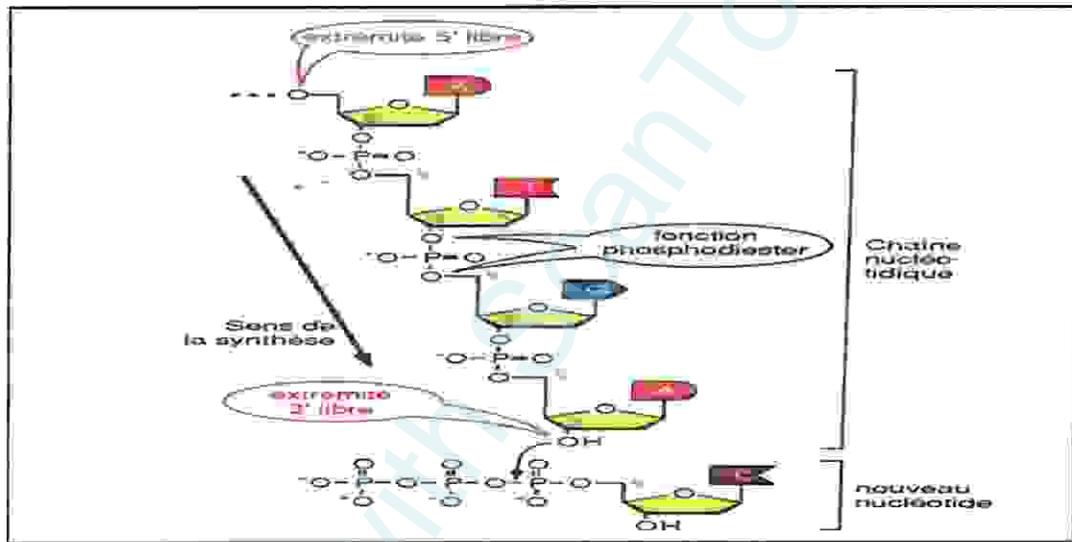


Figure 15 : La liaison phosphodiester (Werner, 2007).

## IV. Propriétés de la molécule d'ADN :

### IV.1. Complémentarité :

Deux chaînes d'ADN complémentaires sont appariées grâce aux liaisons hydrogène réalisées entre deux bases complémentaires, à savoir A avec T et C avec G. L'espacement entre les deux hélices est tel qu'à chaque fois une base purine interagit avec une base pyrimidique, ces bases contractent des liaisons hydrogènes de faible énergie qui aident à stabiliser la double hélice. Il y a 3 liaisons hydrogènes entre cytosine et guanine et 2 liaisons entre thymine et adénine. (13)

#### IV.2. Antiparallélisme :

Les deux brins sont parallèles mais orientés dans deux sens différents. Chaque brin d'ADN est orienté selon ses extrémités (5' phosphate, 3' hydroxyle), les deux brins ont des orientations opposées afin que les bases puissent s'associer correctement par les liaisons hydrogène. (13)

#### IV.3. Dénaturation et renaturation (hybridation) :

Les liaisons hydrogène qui rassemblent les bases sont de faible énergie, il est possible de les couper et séparer ainsi les deux brins avec l'application de la chaleur. L'ADN est dénaturé à une température comprise entre 60 et 90° C. Celle-ci dépend du rapport de richesse C+G/A+T, donc de la richesse en liaisons hydrogènes (bases CG). Cette dénaturation est réversible à condition que le retour à la température ambiante se fasse de façon lente et graduelle.

Le phénomène de dénaturation est réversible, les simples brins peuvent se réassocier par complémentarité entre les bases pour reformer un ADN bicaténaire, dans ce cas on parle de renaturation. (13)

#### IV.4. Absorption des UV :

L'ADN absorbe les UV à une longueur d'onde de 260 nm.

#### IV.5. Formation de sillon :

Il existe trois structures classiques des doubles brins d'ADN,

- La forme A rarement observée,
- La forme B la plus courante
- La forme Z observée quelque fois,

Les deux formes A et B sont composées d'hélice droite emmêlée en torsade par contre la forme Z est composée d'hélice en zigzag. Pour la forme la plus courante, l'enchaînement des groupements phosphatés crée deux sillons (un grand et un petit sillon) où s'exercent les interactions entre les protéines et l'ADN. (13)

**\* Petit sillon :**

Présente deux groupements accepteurs de la liaison pour les deux paires A – T et C – G, il permet l'attache des histones.

**\* Grand sillon :**

Est tapissé aussi d'atomes qui peuvent interagir avec des composants extérieurs aux acides nucléiques comme les nucléases, les enzymes de restriction, les facteurs de transcription. (13)

**Les variant conformationnels de la double hélice: Formes B, A, Z :**

**Conformation B :** c'est le modèle de Watson et Crick, le plus stable dans les conditions physiologiques :

- enroulement droit
- pas : 3,4nm
- 10pb par tour
- rotation du plan des bases :  $36^\circ$

**Conformation A :** -enroulement droit

- pas : de 2,8nm
- 11 pb par tour
- rotation du plan des bases :  $33^\circ$

**Conformation Z :**

- enroulement gauche
- pas : 4,5nm
- 12 pb par tour
- rotation du plan des bases :  $-30^\circ$

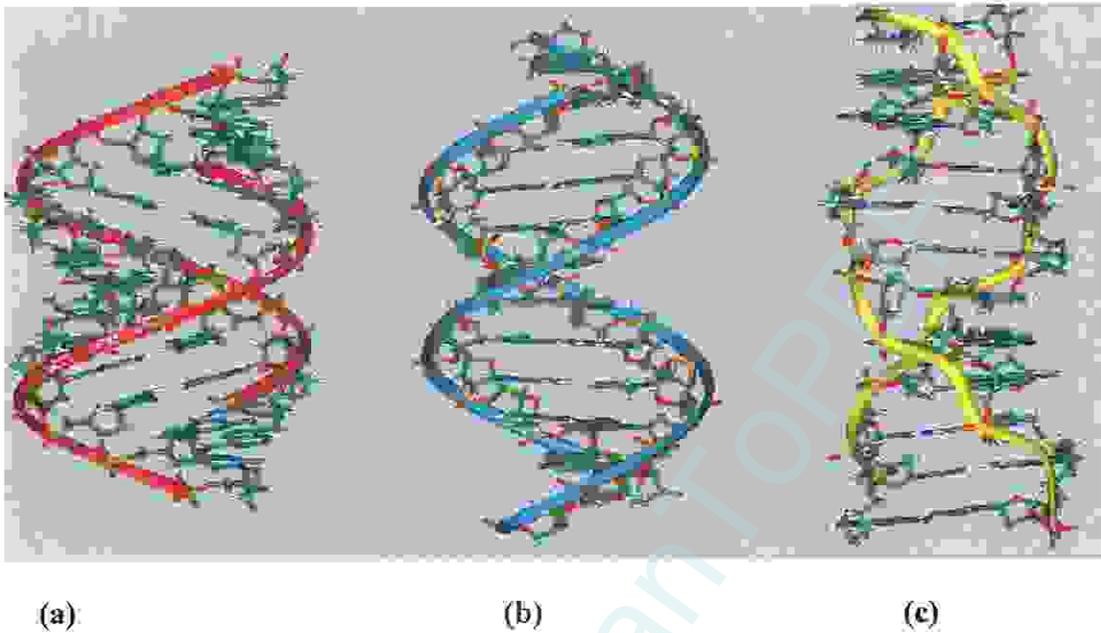


Figure 16: les trois formes de l'ADN : (a) forme A, (b) forme B et (c) forme Z. (14)

## V. Les fonctions de l'ADN :

### V.1. Stockage de l'information génétique :

Pour servir de matériel génétique, l'ADN doit contenir un enregistrement des instructions contenant toute les caractéristiques héréditaire de l'organisme. En terme moléculaire, l'ADN doit contenir l'information relative à l'ordre spécifique des acides amines de toutes les protéines synthétisées par l'organisme. (15)

### V.2. Réplication et hérédité :

L'ADN doit contenir l'information nécessaire à sa propre réplication (duplication). la réplication de l'ADN permet la transmission des instructions génétiques d'une cellule aux cellules qui en dérivent et d'un individu à sa descendance. (15)

### V.3. Expression du message génétique :

L'ADN n'est pas seulement un centre de stockage, il dirige aussi l'activité de la cellule. Par conséquent, l'information codée dans l'ADN doit s'exprimer en participant aux activités de la cellule. Plus précisément, l'information de l'ADN doit servir à diriger l'ordre d'incorporation des acides aminés spécifiques à une chaîne polypeptidique. (Karp, Gerald, 2010)

### VI. Extraction :

Extraction de l'ADN est un processus en plusieurs étapes par lesquelles le matériel génétique dans les cellules est éliminé et on le purifie. Analyse de l'ADN après extraction peut être un outil très puissant pour la médecine et la médecine légale, permettant l'identification et la comparaison des échantillons d'ADN, ainsi que le dépistage de diverses maladies génétiques.(15)

#### VI.1. Principe :

Les techniques d'extraction des acides nucléiques relativement simples, permettent d'obtenir un ADN de pureté élevée et de quantité importante. Elles ont pour but de récupérer les acides nucléiques en suspension et de les resuspendre dans un tampon adéquat. Il convient simplement d'éviter toute destruction enzymatique ou mécanique de l'ADN. (16)

#### VI.2. Définition :

L'extraction est une technique de séparation biochimique permettant d'isoler l'ADN à partir de matériels biologiques variés : cellules sanguines, cellules en culture, tissus, en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse. 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, qui suivent approximativement le même schéma de principe :

- Lysé des cellules bactérienne
- Élimination des protéines.
- Élimination des autres acides nucléiques (ARN etc.)
- Concentration de l'ADN par précipitation à l'alcool. (17)

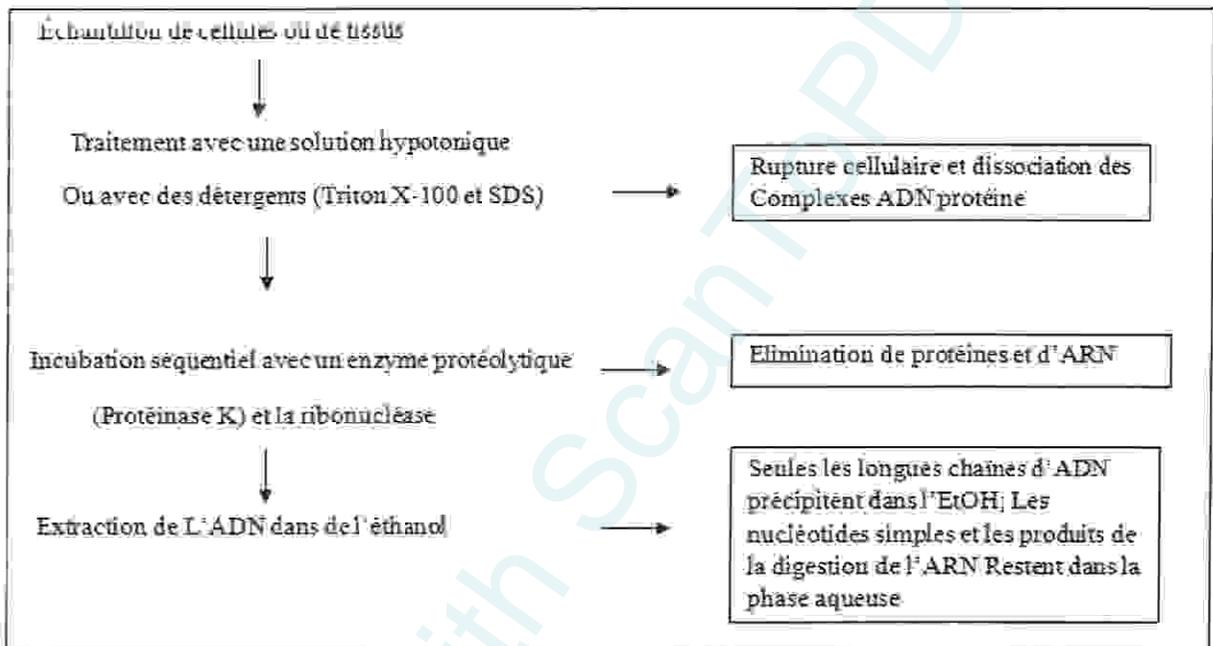


Figure 17 : Procédés couramment utilisés pour extraire les acides nucléiques.

### VI.3. Les principales étapes de l'extraction de l'ADN :

#### VI.3.1. 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). (18)

### VI.3.2. 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 ». (18)

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. (18)

### **Autres méthodes :**

Il existe de nombreuses autres méthodes d'extraction de l'ADN par exemple :

#### **a). La technologie des billes magnétiques :**

Après digestion enzymatique et solubilisation des lipides dans une solution spécifique, l'ADN chargé négativement est mis en contact avec des billes magnétiques chargées positivement afin qu'il s'accroche à celles-ci. La solution est éliminée alors que les billes sont maintenues à l'aide d'un aimant. Une autre solution de composition différente est ensuite ajoutée aux billes afin de neutraliser leur charge. L'ADN est alors libéré dans cette seconde solution. (19)

#### **b). Les cartes FTA :**

Une carte de papier Wattman FTA est imprégnée d'un traitement chimique qui permet, lorsqu'un échantillon est déposé sur celle-ci, la destruction cellulaire et l'immobilisation de l'ADN dans la carte. Pour récupérer l'ADN, la zone correspondante de la carte est prélevée à l'aide d'un emporte-pièce et lavée dans une solution spécifique. L'ADN immobilisé dans le papier est ainsi prêt à être amplifié par PCR par exemple. (19)

# Partie pratique

Produced with ScanTOPDF

# **Chapitre II :**

## **Matériel et Méthodes**

Produced with Scantopdf

## I. Présentation des sites :

Ce travail a été réalisé sur six sites au niveau du littoral Algérien : plage El-Mordjène à El Kala, plage St Cloud à Annaba, plage Stora à Skikda, plage Saint Michel et Bomo à Oran et enfin plage Salamandre à Mestghanem. Ces sites ont servi pour l'étude de la biodiversité des annélides polychète.



### Site d'EL-Kala « EL-Mordjène » :

La plage El-Morjène (El-Kala) est située dans la wilaya d'El-Taref à l'extrême Est de L'Algérie à 25 km de la frontière Tunisienne et à 80 km de la wilaya d'Annaba, sa position géographique : 36°53'53.33"N et 8°27'3.28"E. Elle a servi de site de référence pour notre étude de par son éloignement de toute source polluante. Le site a été classé réserve de la biosphère par l'UNESCO en 1990.

C'est une zone humide formant un écosystème très riche en termes de biodiversité. Le site D'El-Morjène (El-Kala) 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). (Meghlaoui Z, 2015)



**Figure 18:** Site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera* sur le littoral Est Algérien à El-Kala prise le 23 avril 2016.

➤ **Site d'Annaba « Saint Cloud » :**

La plage St Cloud est située dans la wilaya d'Annaba, sa position géographique :  $36^{\circ}54'5.79''N$  et  $7^{\circ}45'22.20''E$ . La plage St-Cloud est localisée près du port, de plus cette plage est caractérisée par la présence de polluants urbains et anthropiques. La baie reçoit des apports en eau douce par le biais de l'Oued Seybouse au Sud-Ouest qui véhicule des rejets d'origine agricole, domestique et industrielle. (Meghlaoui Z, 2015)



**Figure 19 :** Site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera* le littoral nord-Est Algérien à Annaba « Saint Claude » prise le 24 avril 2016.

➤ **Site Stora (Skikda) :**

Le troisième site d'échantillonnage est la plage de Stora dans la Wilaya de Skikda, sa position géographique :  $36^{\circ}52'18.86''N$  et  $6^{\circ}54'3.28''E$ , située sur la côte de la ville de Skikda à 180 km de la frontière tunisienne. Ce site est caractérisé par la présence de polluants tels que les HAP et par l'implantation du complexe pétrochimique en plus des activités anthropiques. À Skikda, les roches sont composées essentiellement de gneiss paléozoïque et protozoïque du socle kabyle. (Meghlaoui Z, 2015)



**Figure 20 :** Site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera* sur le littoral Est Algérien à Skikda prise le 29 avril 2016.

#### ➤ Site d'Oran (Saint Michel et Bomo) :

La plage Saint Michel et plage Bomo sont situées dans la wilaya d'Oran, leur position géographique :  $35^{\circ}45'11.88''\text{N}$  et  $0^{\circ}49'45.95''\text{O}$  (plage Bomo),  $35^{\circ}51'49.72''\text{N}$  et  $0^{\circ}17'41.85''\text{O}$  (plage St Michel).

La ville d'Oran est une ville méditerranéenne, se situe à 432 km à l'Ouest d'Alger. Elle représente un pôle d'attraction économique et industriel, Sa façade maritime est d'une longueur de 124 km, soit le 1/10 du littoral national, offrant d'importantes potentialités dans le domaine maritime (transport et commerce extérieur) et la pêche.

Le littoral Oranais se distingue par une urbanisation massive qui concentre 936.927 d'habitants, qui représente 77,5 % de la population totale de la Wilaya. A cela s'ajoute des problèmes environnementaux de différentes natures tel que : industrielles, agricoles, domestiques, ... etc.

Cependant, le littoral de la côte Oranaise est devenu vulnérable, constituant le réceptacle privilégié des apports contaminants, qu'ils proviennent des fleuves, de l'atmosphère ou des émissaires urbains et industriels notamment les rejets de la zone industrielle pétrochimique d'Arzew. (Sahnoun et al, 2010)



A

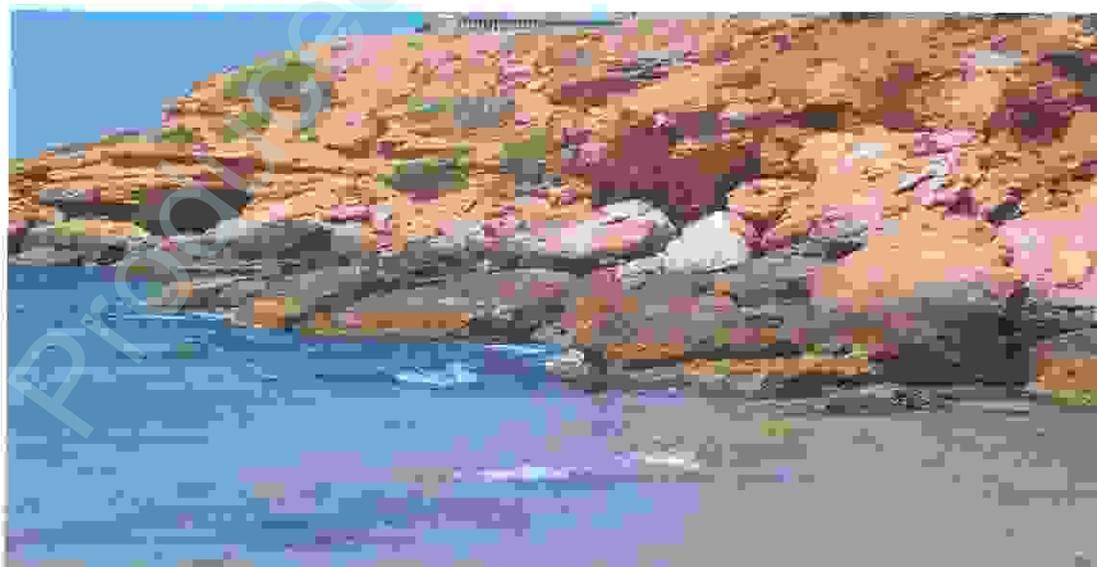
B

**Figure 21** : Site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera* (A : Bomo / B : Saint Michel)

➤ **Site Mostaganem(Slamandre) :**

La plage salamandre est située dans la wilaya de Mostaganem, sa position géographique :  $35^{\circ}55'30''$  N et  $0^{\circ}3'38''$  E.

Mostaganem est une ville côtière située au Nord-Ouest du territoire national, à environ 360Km à l'ouest d'Alger et à 80Km à l'Est d'Oran. Elle dispose d'une façade maritime de 124 km.



**Figure 22** ; Site d'échantillonnage de *Perinereis cultrifera*(Salamandre)

## II. Mode de récolte :

Les prélèvements ont été effectués au niveau de la zone intertidale avec des conditions climatiques et de vitesse de vent  $\leq 10$  Km/h et à marée basse. La technique d'échantillonnage est aléatoire simple, qui consiste à réaliser des prélèvements au hasard et de façon indépendante sur une superficie de 1m<sup>2</sup> de quadrat en utilisant des produits chimiques tels que l'eau de javel ou du  $KMnO_4$  diluée à 10%. cette technique permet de forcer les animaux à quitter leurs galeries . Ce type de procédé entraîne des destructions dramatiques de l'environnement et des ressources biotiques, et les vers récoltés avec cette méthode sont utilisés pour l'étude écologique.

Il existe une autre méthode qui consiste à racler la végétation à l'aide d'un grattoir. Ce mode de récolte est difficile, fatigant 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 mécanique. Par conséquent, ce mode de récolte est de plus en plus abandonné et est remplacé par d'autres méthodes qui semblent être plus rentables car elles sont rapides et permettent surtout de prélever des individus entiers et en grande quantité. Les vers non amputés ont été utilisés dans les analyses biochimiques.

La conservation se fait dans des bols avec des galeries de carton ou des algues naturelles à une température variant de 4 à 12°C, avec une durée de collecte des individus comprise entre 3 et 5 heures, selon les conditions météorologiques et de la densité des vers.

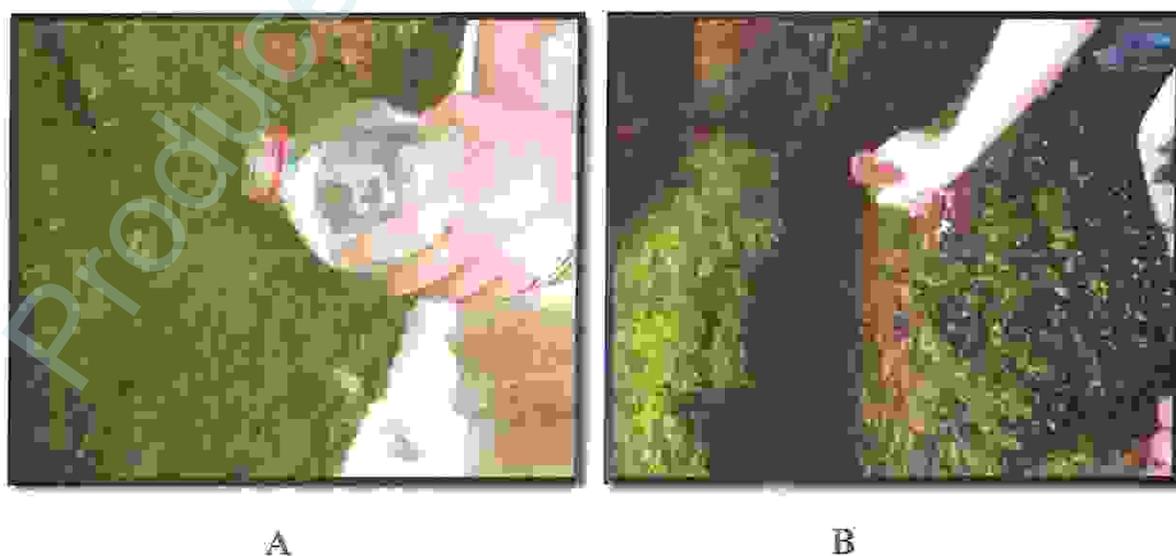


Figure 23 : Méthode d'échantillonnage (A) : chimique et B : par raclage)

### III. Mesure de poids et détermination des sexes :

Les individus récoltés sont conservés sous formol à 5 % et l'éthanol à 96 % dans des bouteilles de verre.

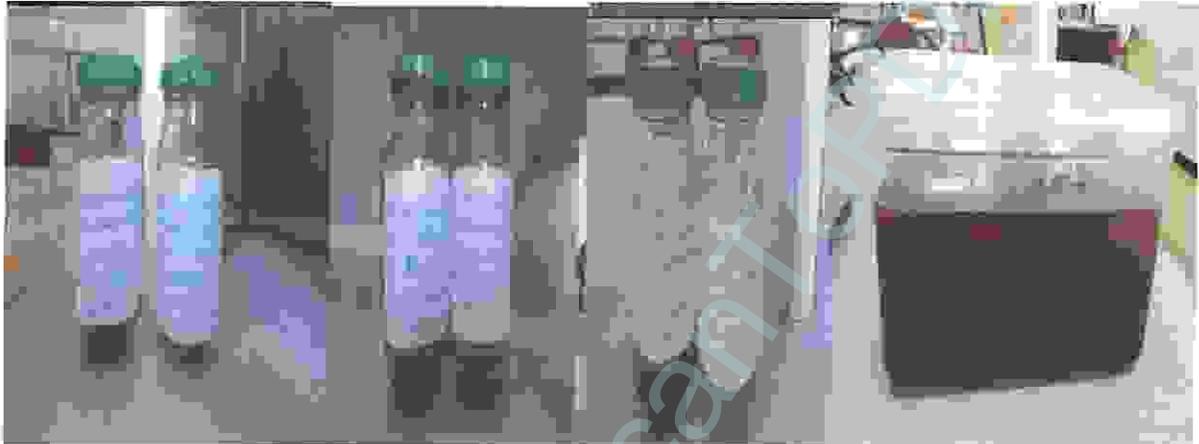


Figure 24 : Les bouteilles des échantillons.

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 a été déterminé par l'examen macroscopique, à l'aide d'une loupe binoculaire, du contenu coelomique, par une incision à l'aide d'une épingle, le long de la ligne médio-ventral du corps. Les mâles ont été identifiés par la présence d'amas spermatiques de couleur blanc laiteux, les femelles ont été identifiés par la présence de gamètes sphériques de couleur jaune claires représentent les ovocytes et les individus ne présentant pas de produit génitaux dans leur contenu coelomique, ont été considérés comme étant des individus sexuellement indifférenciés.



Figure 25 : 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 4 parties comme suite (50 mg, 100mg, 150mg, 200mg).

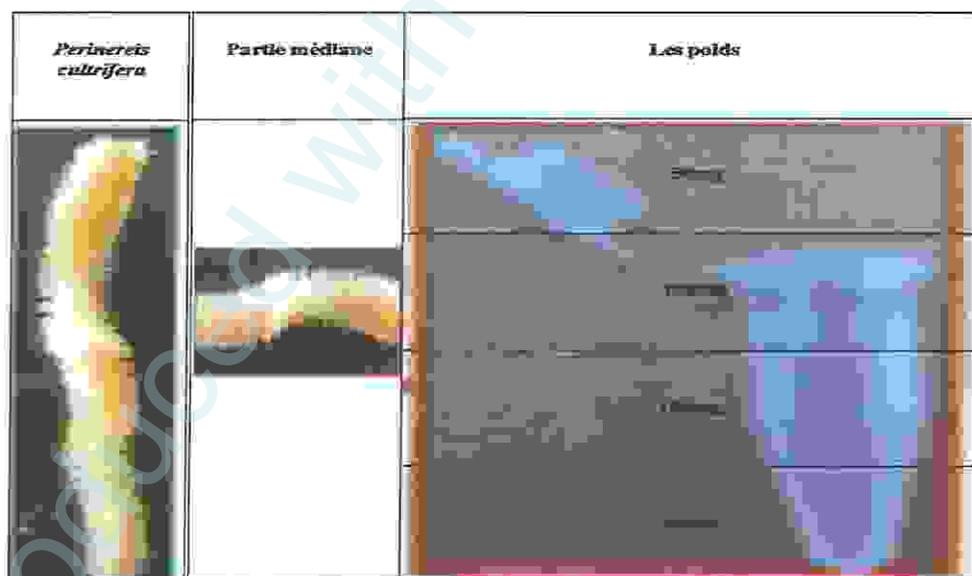


Figure 26: Division de la partie médiane de l'individu numéro 01.

#### 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 les 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 [Figure 27] 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.

$r^2$  : Coefficient de détermination de la courbe.

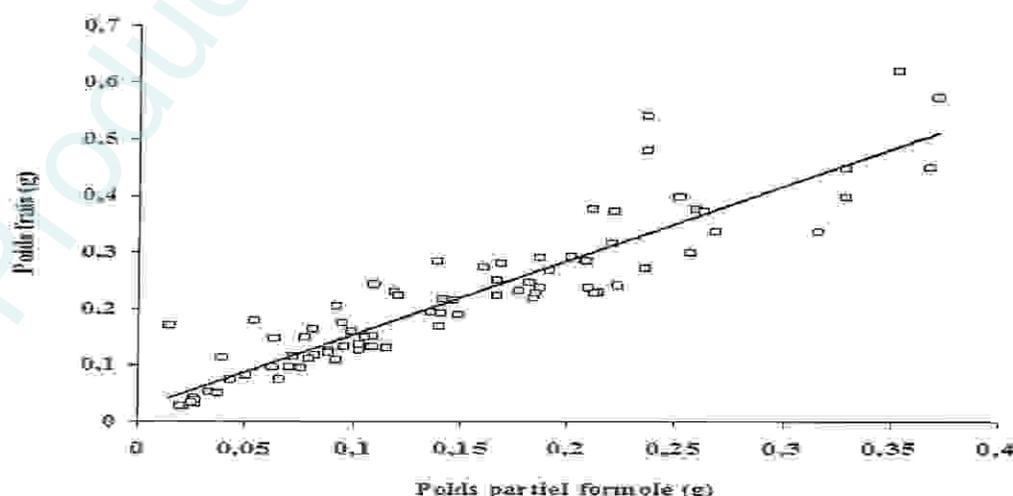


Figure 27 : Relation entre poids partiel formolé essuyé et poids frais essuyé

## 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, 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).

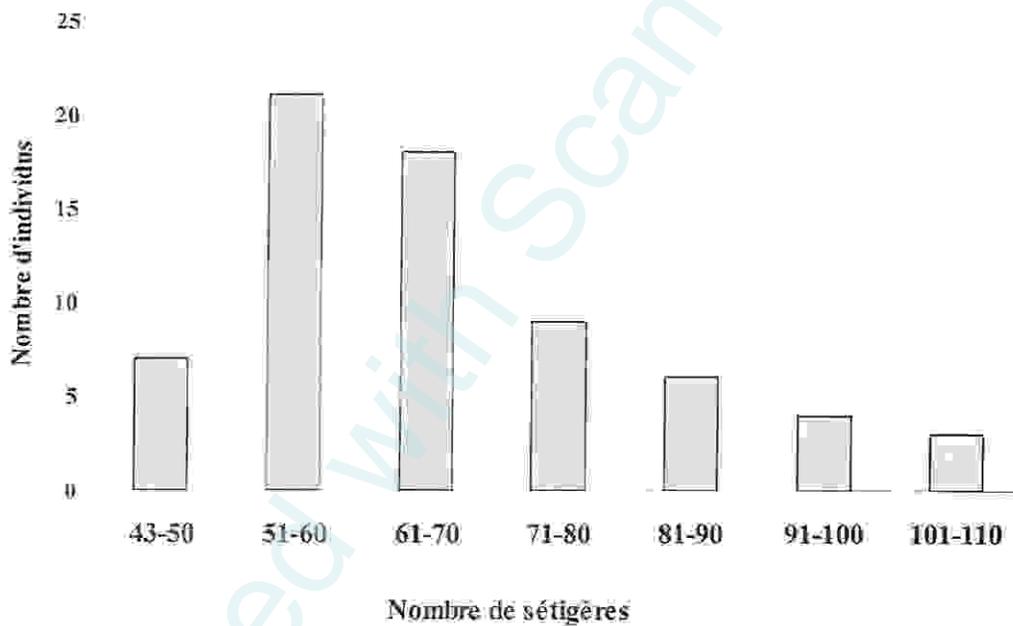


Figure 28 : Histogramme de distribution de fréquence du rang de cassure

### V.1. Indices écologiques :

Un peuplement peut être caractérisé par sa composition taxonomique mais aussi par sa densité, sa richesse, sa diversité spécifique. Les indices suivants ont été déterminés :

**Abondance (ni)** : c'est le nombre d'individus d'une espèce.

**Richesse totale (S)** : c'est le nombre total des espèces recensées dans un peuplement.

**Richesse moyenne (s)** : c'est la moyenne des richesses stationnelles ou richesse par relevé.

Ce paramètre exprime le nombre d'espèces les plus représentatives du milieu au sens de la fréquence de leur présence.

**La fréquence relative (f)** : c'est le nombre d'individus d'une espèce sur le nombre total d'espèces.

$$f = ni/N$$

$n_i$  : abondance spécifique de l'espèce

$N$  : abondance du peuplement.

**La fréquence d'occurrence ou centésimale (F)** : c'est le pourcentage du nombre de relevés où une espèce est présente sur le nombre total de relevés. On considère qu'une espèce est accidentelle ( $F < 25\%$ ), accessoire ( $25\% < F < 50\%$ ), régulière ( $50\% < F < 75\%$ ), constante ( $75\% < F < 100\%$ ), omniprésente ( $F = 100\%$ ).

$$F = ri/R \times 100$$

$r_i$  : nombre de relevés dans lequel l'espèce  $i$  est présente.

$R$  : nombre total de relevés

**La diversité ( $H'$ )**: la diversité d'un peuplement exprime le degré de complexité de ce peuplement. Elle s'exprime par un indice qui intègre à la fois, la richesse du peuplement et les abondances spécifiques. Parmi les indices disponibles permettant d'exprimer la structure du peuplement, nous avons retenu celui de Shannon et Weaver (1963).

$$i = n$$

$$H' = -\sum_{i=1}^n P_i \log_2 P_i$$

$$i = 1$$

où

$$P_i = ni/N$$

$$\log_2 P_i = \log p_i \times 3,322$$

$n_i$ : effectif de l'espèce  $i$ .

$N$ : effectif total du peuplement.

$H'$  est exprimé en Bit (Binary digit).

Cet indice mesure le degré de complexité d'un peuplement. Une valeur élevée de cet indice correspond à un peuplement riche en espèces dont la distribution d'abondance est équilibrée. Par contre une valeur faible de cet indice correspond soit à un peuplement caractérisé par un petit nombre d'espèces pour un grand nombre d'individus, soit à un peuplement dans lequel il y a une espèce dominante.

### V.2. L'équitabilité ou équipartition :

Des peuplements à physionomie très différente peuvent ainsi avoir la même diversité. Il est nécessaire de calculer parallèlement à l'indice de diversité  $H'$ , l'équitabilité ( $E$ ) en rapportant la diversité observée à la diversité théorique maximale ( $H' \text{ max}$ ).

$$E = H'/H' \text{ max}$$

ou

$$H' \text{ max} = \text{Log}_2 S$$

L'équitabilité varie de 0 à 1 ; elle tend vers 0 quand la quasi totalité des effectifs est concentrée sur une espèce, elle tend vers 1 lorsque toutes les espèces ont une même abondance. cas théorique dans la mesure où il existe toujours des espèces rares dans un peuplement.

La mesure de la densité est réalisée sur site, à l'aide d'un gabarit de 40x40cm . Les individus sont comptés à l'intérieur du cadre après les avoir forcés à sortir de leurs galeries par l'utilisation de l'eau de javel diluée à 10% dans l'eau de mer. La densité est estimée après cinq essais en moyenne réalisés sur le même site.

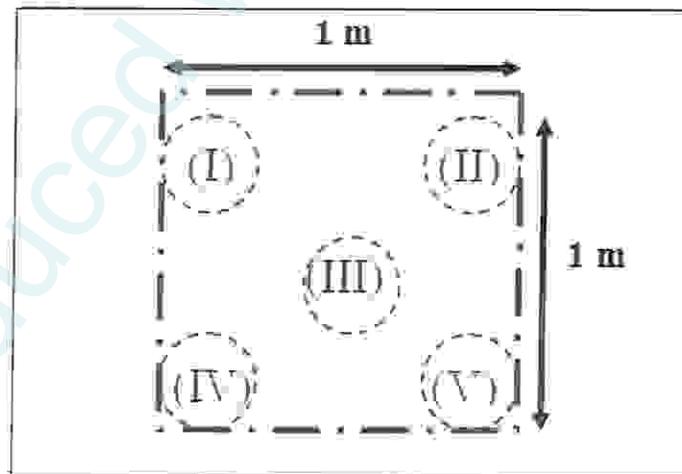


Figure 29 : Représentation schématique de la méthode de mesure de la densité

### V.I. 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 .

- SDS 1%

$$\begin{array}{l} \triangleright 1 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ \quad X \longrightarrow 40 \text{ ml} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \triangleright 1 \text{ g} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ \quad X \longrightarrow 40 \text{ ml} \end{array}} \right\} \begin{array}{l} X = 40 * 1 / 100 \\ X = 0,4 \text{ g} \end{array}$$

- NaCl 1.4M

$$\begin{array}{l} \triangleright m = V * C * M \\ m = 0,04 * 58,44 * 1,4 \\ m = 3,26 \text{ g} \end{array}$$

- éthanol (95%) 0.2%

$$\begin{array}{l} \triangleright 0,2 \text{ ml} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ \quad X \longrightarrow 40 \text{ ml} \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{l} \triangleright 0,2 \text{ ml} \longrightarrow 100 \text{ ml} \\ \quad X \longrightarrow 40 \text{ ml} \end{array}} \right\} \begin{array}{l} X = 20 * 0,2 / 100 \\ X = 0,08 \text{ ml} \end{array}$$

- EDTA 20Mm

$$\begin{array}{l} \triangleright 20 \text{ mM} = 0,02 \text{ M} \\ m = 0,04 * 372,23 * 0,02 \\ m = 0,298 \text{ g} \end{array}$$

- Tris HCl ph 8.0 100mM

$$\begin{array}{l} \triangleright 100 \text{ mM} = 0,1 \text{ M} \\ m = 0,04 * 121,14 * 0,1 \\ m = 0,484 \text{ g} \end{array}$$



Figure 30 : 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.

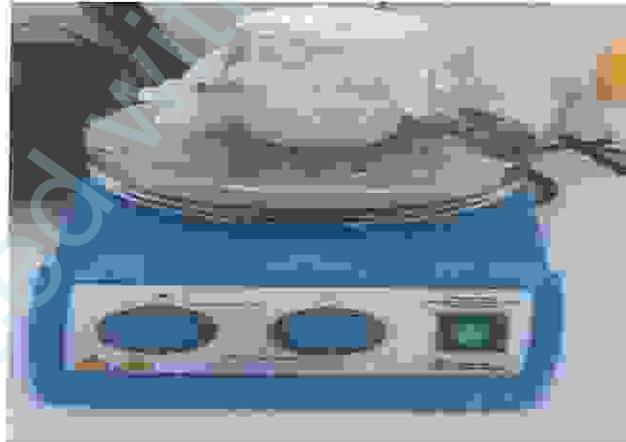


Figure 31 : Agitation du tampon.

### Jour 1 : Incubation du tampon et les échantillons :

- Incuber le tampon d'Extraction à  $60^{\circ}\text{C}$  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  $60^{\circ}\text{C}$  pendant 4 heures.

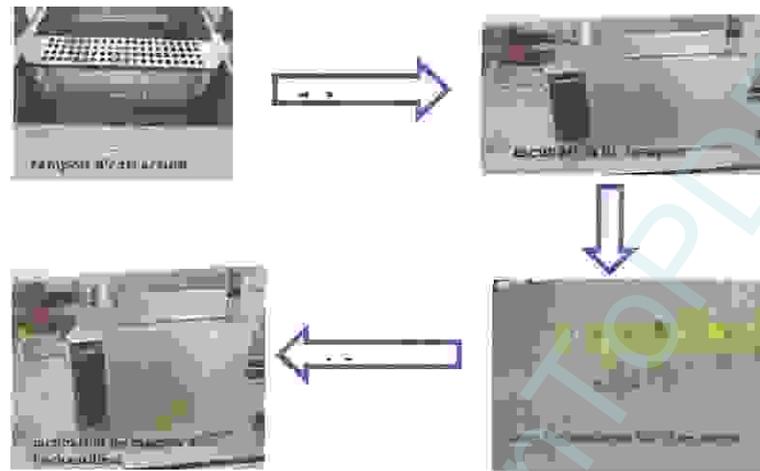


Figure 32 : Incubation du tampon et les échantillons.

### Jour 2 : Les différentes étapes d'Extraction d'ADN :

- 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  $\frac{1}{2}$  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' $H_2O$  incubant à 37°C resuspendre l'ADN.
  - Conserver à 4°C.

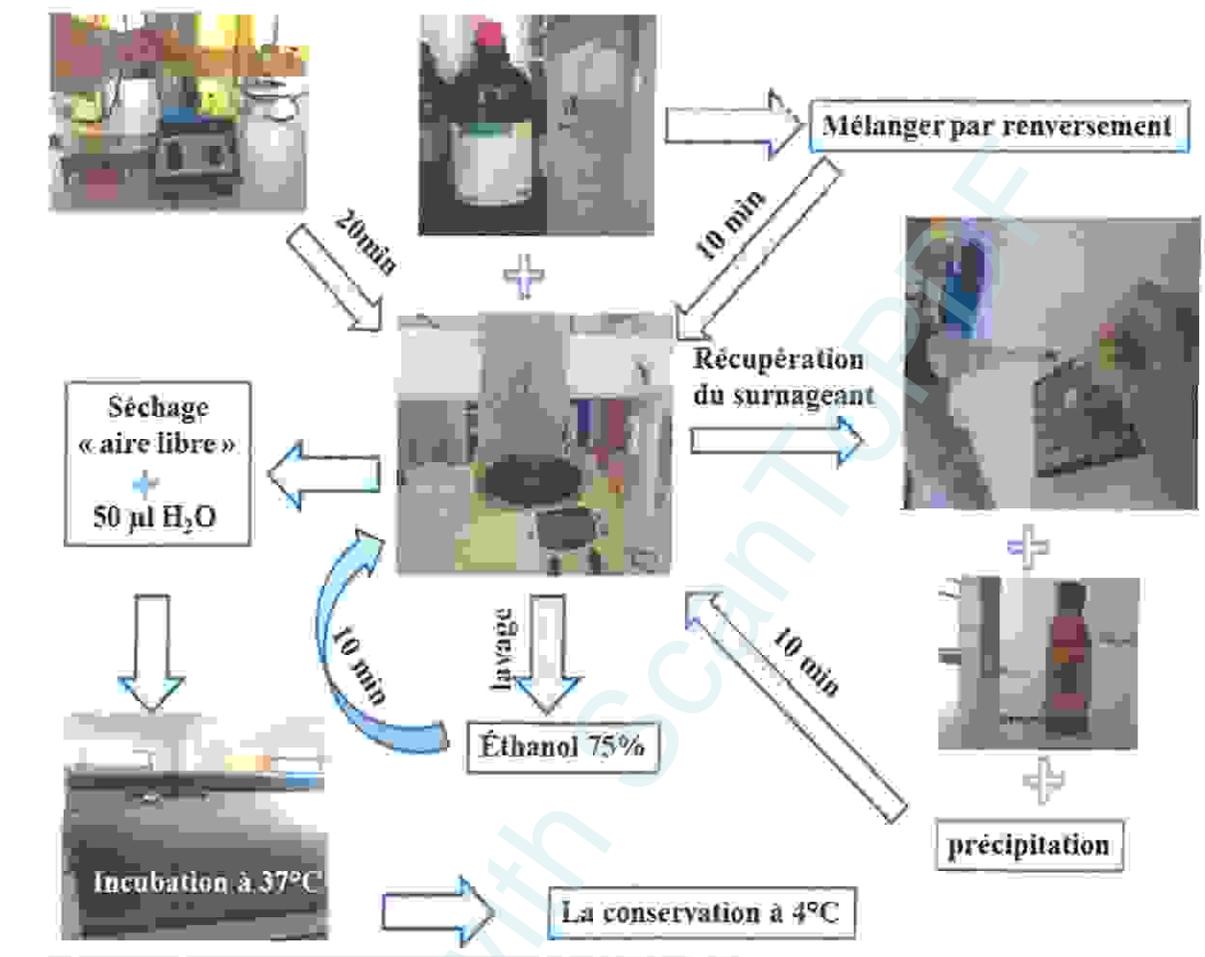


Figure 33 : Les étapes d'extraction.

## 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 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 µg/ml de dsADN, environ 37 µg/ml de ssADN, 40 µg/ml d'ARN ou environ 30 µg/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

Produced with Scantopdf

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 optimiser ce protocole et maîtriser les éléments qui peuvent l'influencer 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.

Afin de déterminer l'inventaire faunistique des sites d'étude, nous avons identifié les différents groupes zoologiques récoltés durant la période d'étude, la répartition des espèces est assez homogène au niveau de tous les sites, mais une diversification plus importantes et une abondance numérique est observée au niveau du site d'El kala par rapport aux autres. (Tableau 1)

Tableau 1 : Espèces identifiées et recensées au niveau des sites d'études (faune).

Embranchement	Classe	Famille	Espèce	
Annélides	Polychètes	Nérieridae	<i>Perinereis cultrifera</i>	
			<i>Neries ful</i>	
Plathelminthes	Turbellariés	Pseudocerotidae	<i>Pseudoceros maximus</i>	
Arthropodes	Crustacés	Malacostraca	<i>Isopode</i>	
			<i>Amphipoda sp( Gammarus pulex.Ampeliscidé amphipode )</i>	
			<i>Phaseolosomagranulatum</i>	
			<i>Eriphia verrucosa</i>	
Mollusques	Gastéropodes	Mytilidae	<i>Modiolus modiolus</i>	
			<i>Mitylusgalloprovincialis</i>	
			<i>lithophaga aristata</i>	
		Bivalves	Fissurellidae	<i>Fissurella radiosa</i>
				<i>Diadoragraeca</i>
			Patellidae	<i>Patella vulgata</i>
				Arcidae
Chitons	Acanthochitonidae	<i>Acanthochitona crinita</i>		
Echinodermata	Echinoidea	Arbaciidae	<i>Arbacia lixula</i>	

Le tri des récoltes échantillonnées au niveau des sites d'études nous a permis d'identifier les espèces suivantes



*Nereis falsu*  
(1cm=5mm)



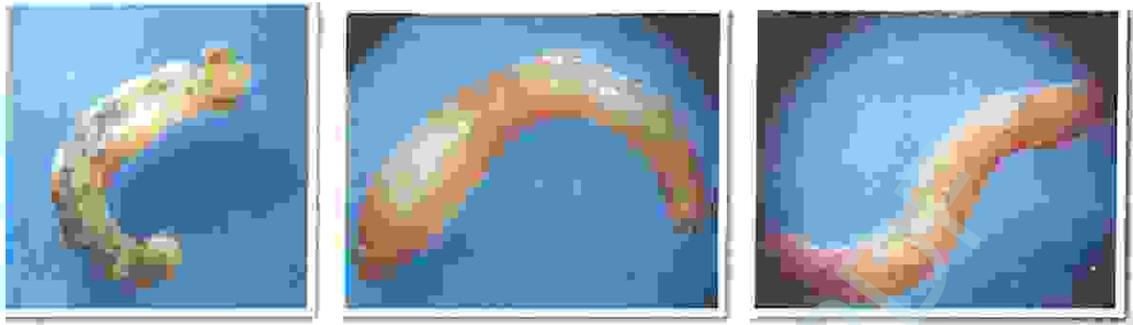
*Perinereis cultrifera*  
(1cm=4.2mm)



*Pseudoceros maxinus*



*Isopodes (sphaeromatidae)*

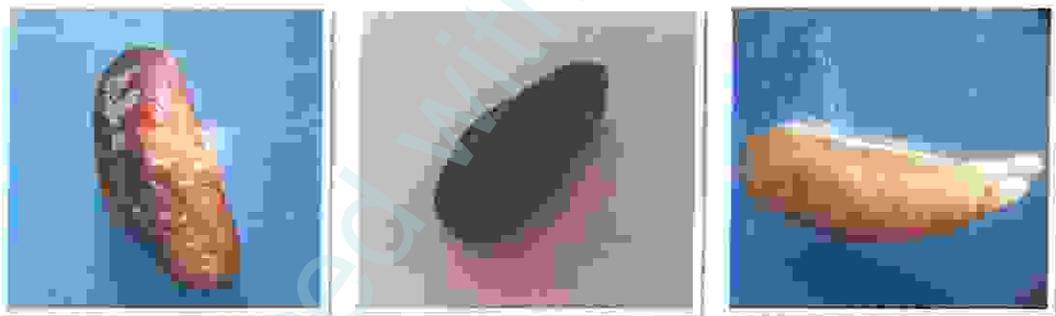


*Phascolosoma granulatum*



*Gammarus pulex*

*Ampelisca amphipode*

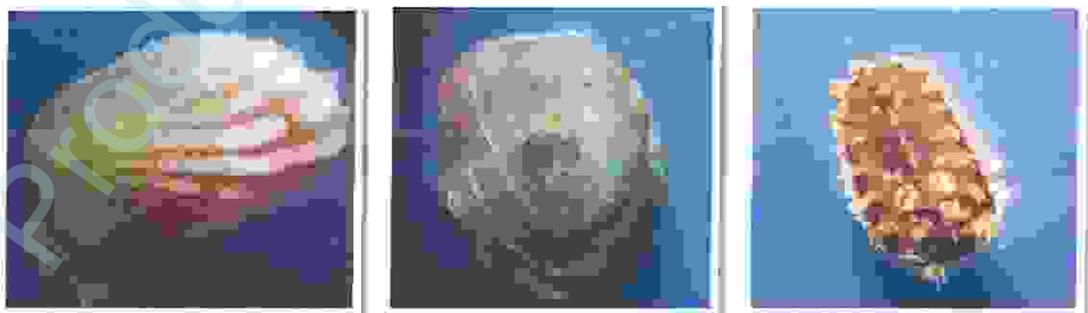


*modiolus*

*Mytilus Galloprovincialis*

*Lithophaga aristata*

*Modiolus*



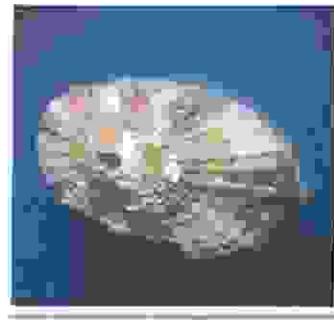
*Arca noae*

*Huitre (Ostrea edulis)*

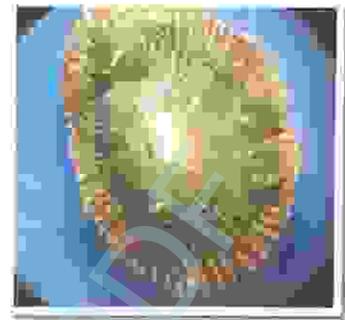
*Acanthochitona crinita*



*Fissurella radiosa*



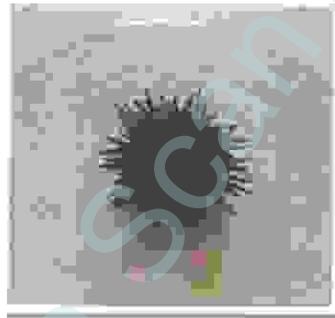
*Diodora gibberula*



*Patella vulgata*



*Eriphia verrucosa*



*Anædonia lxula*

Figure 34 : Espèces identifiées de la faune au niveau des sites d'étude

Nous avons effectué pour la même occasion un inventaire de la flore de l'habitas de notre espèce d'étude



*Corallina elongata*



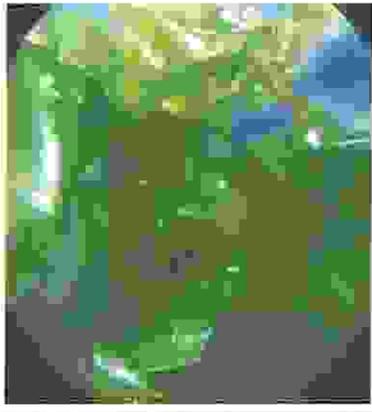
*Colpomenia sinuosa*



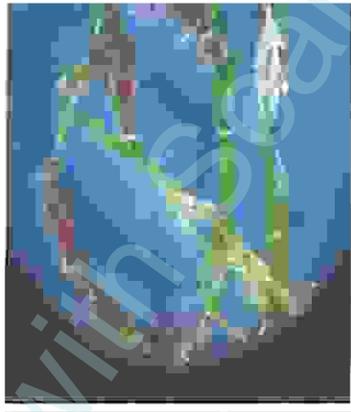
*Cystoseira mediterranea*



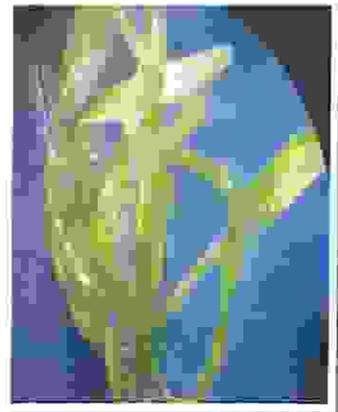
*Das Mesolitoral*



*Ulva Laevuca*



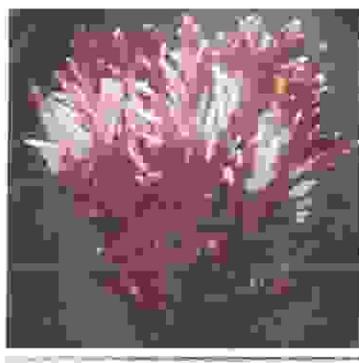
*Ulva intestinali*



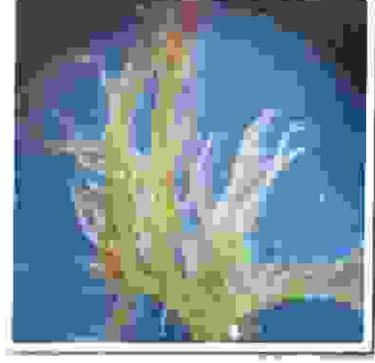
*Ulva compressa*



*Carollina officinans*



*Corallinae elongata*



*Pylaiella littoralis*

Figure 35 : Espèces identifiées de la flore au niveau des sites d'étude

### 1. Indices écologiques :

Les indices écologiques étudiés sont les indices de composition et les indices de structures suivants; l'abondance, la richesse totale. Le nombre d'individus des différentes espèces est très variable. Les espèces retrouvées en grand nombre dans tous les sites sont *Perinereis cultrifera* et *Mitulus galloprovincialis* et *Amphipoda* sp (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Nombre d'individus (n) des différentes espèces du peuplement

Site	El-Hola	Annaba	Miloua	Oran	Mostaganem
<i>Neries falsa</i>	1	33	1	0	2
<i>Perinereis cultrifera</i>	38	0	37	63	8
<i>Pseudoceros maximus</i>	0	0	1	0	0
<i>Isopode</i> sp	2	0	1	0	0
<i>Amphipoda</i> sp	48	19	25	0	41
<i>Phascolosoma granulatum</i>	0	0	20	0	0
<i>Eriphia verrucosa</i>	1	0	0	0	0
<i>Modiolus modiolus</i>	326	194	417	6	0
<i>Mitulus galloprovincialis</i>	0	1	4	0	0
<i>Lithophaga aristata</i>	0	0	1	0	0
<i>Fissurella radiosa</i>	0	0	0	0	5
<i>Diodora graeca</i>	0	0	0	0	0
<i>Patella vulgata</i>	0	3	0	0	0
<i>Arca noae</i>	0	0	7	0	0
<i>Huître (ostrea edulis)</i>	0	0	1	0	0
<i>Acanthochitona crinita</i>	3	0	0	0	3
<i>Arbacia lixula</i>	0	0	0	1	1
<i>Arbacia lixula</i>	0	0	0	0	1

La comparaison des différentes structures sur les sites d'étude révèle une spéciation de la composition des différentes populations selon le site étudié.

Les résultats du tableau 3 montrent que la richesse totale n'est pas homogène dans les différents sites, elle varie de 3 à 11 espèces. La richesse moyenne. L'abondance du peuplement varie de 60 à 515 individus.

**Tableau 3 :** Caractéristiques du peuplement des trois sites par la richesse spécifique, la richesse moyenne et l'abondance.

Site	Richesse spécifique	Abondance de peuplement
Skikda	11	515
Annaba	5	250
El kala	7	419
Oran	3	70
Mostaganem	7	61

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

Le poids frais essuyés des individus de *Forinerais cultrifera* provenant des six 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. 36). Le poids des vers n'a donc aucune influence sur les variations intra-individuelles dans la quantité d'ADN extraite.

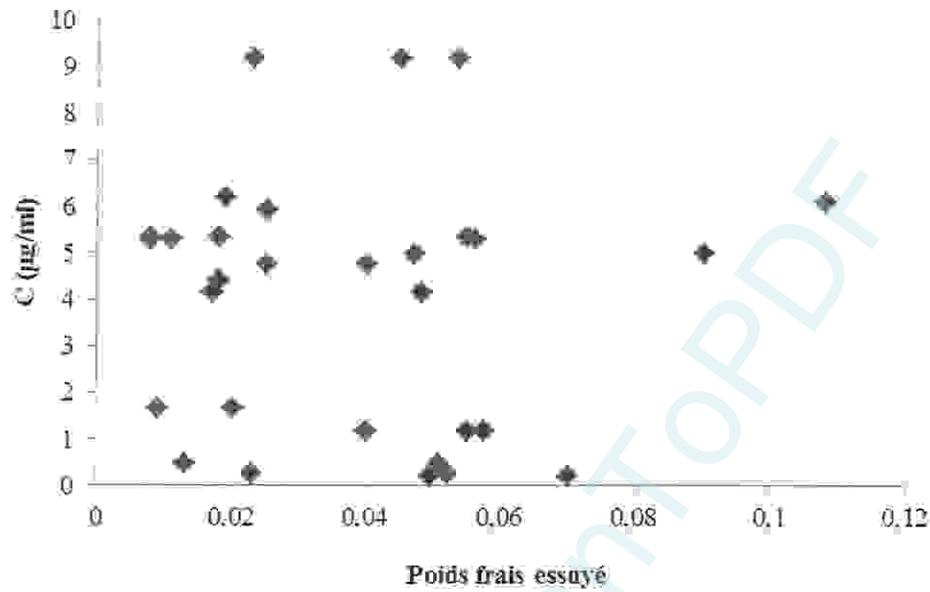


Figure 36 : Courbes de corrélation entre la quantité d'ADN et le poids des individus.

### 3. 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 sexuel pour pouvoir se reproduire. Pendant le cycle de vie *Perinereis cultrifera* trois classes sexuelles sont soulignées : les mâles, les femelles et les individus indifférenciées qui ne présentant pas de produits génitaux dans leur contenu coelomique. On comparant la quantité d'ADN issue des différentes classes sexuelles, aucune relation n'a pu être établie (Fig. 37) Le sexe des individus n'a aucun effet sur les la quantité d'ADN

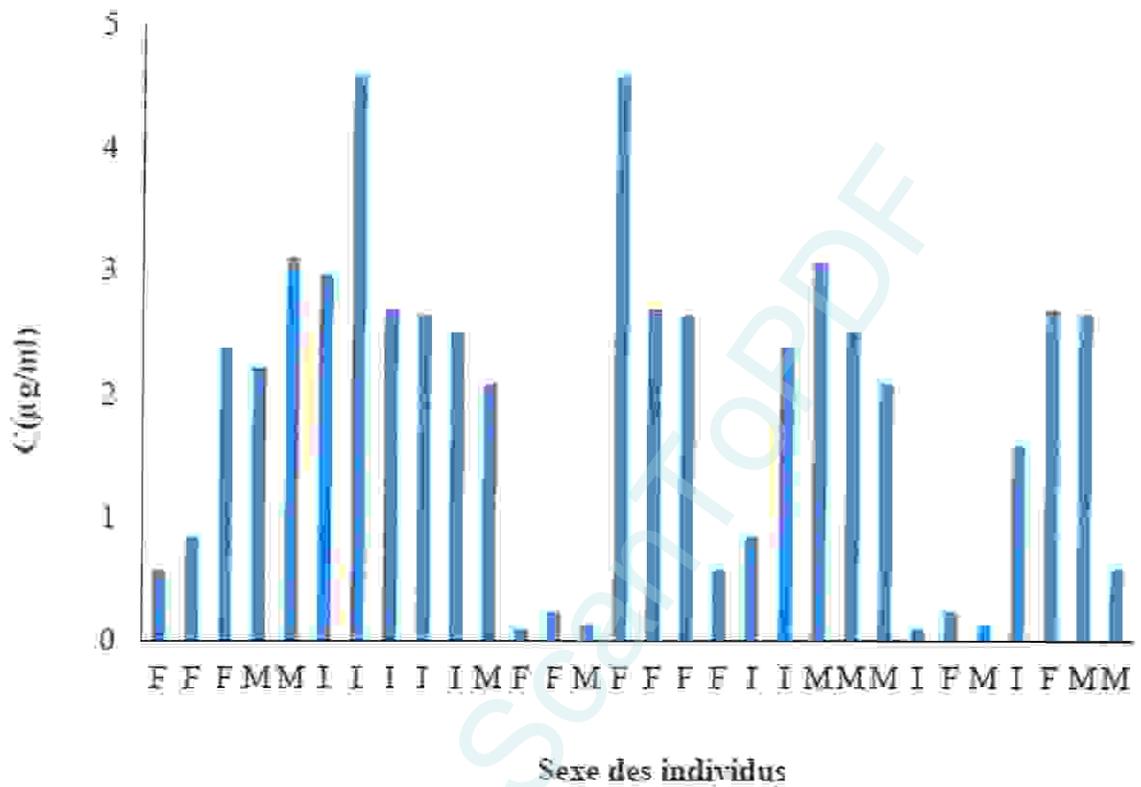
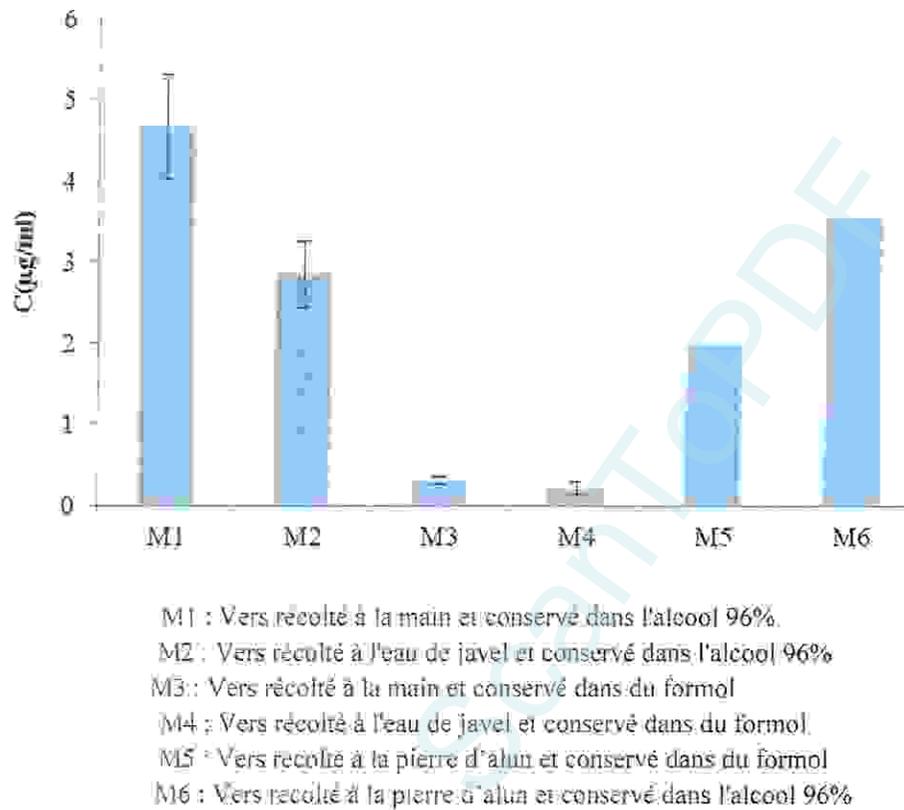


Figure 37 : Histogramme de la quantité d'ADN selon le sexe des individus

#### 4. 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 mécanique 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 38)



**Figure 38 :** Histogramme de la quantité d'ADN selon mode de récolte et conditionnement

La Figure 38 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 nombre des vers sectionnés. La conservation dans l'alcool 96% préserve mieux notre ADN que le formol.

### 5. Segmentation du ver et quantité d'ADN :

L'ADN molécule omni 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. On comparant les moyennes des quantités d'ADN extraite 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 difficile a hydrolysé (Fig.39).

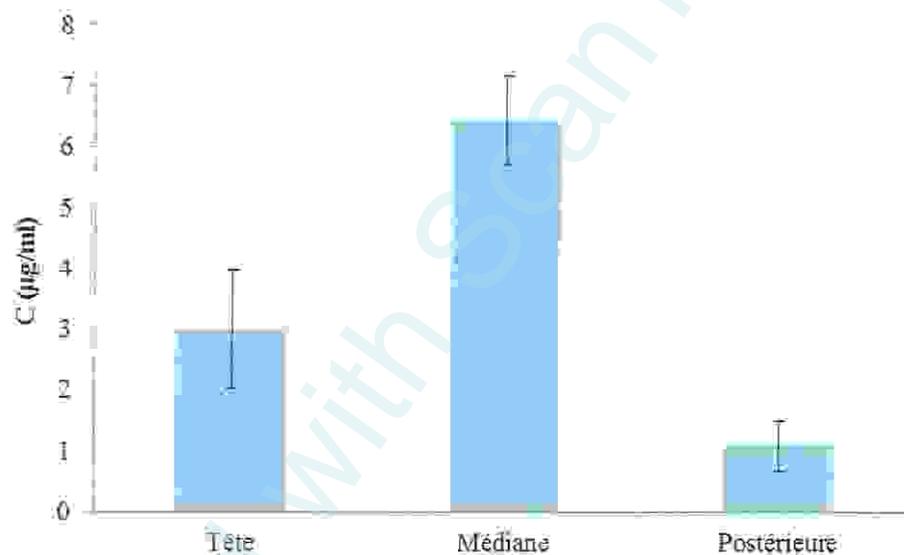


Figure 39 : Histogramme de la quantité d'ADN selon la segmentation du ver

### 6. Poids des échantillons et quantité d'ADN :

Les échantillons analysés des différentes régions du corps des individus de *Perinereis cultrifera* ont été divisé en quatre catégories de poids : 50µg, 100µg, 150µg et 200µg et la comparaison des moyennes selon la figure 39 souligne que l'ADN issue des partie médiane dont le poids est entre 50 à 100µg nous permis d'avoir la quantité d'ADN la plus élevé, ce qui confirme les résultats précédent (Fig.39).

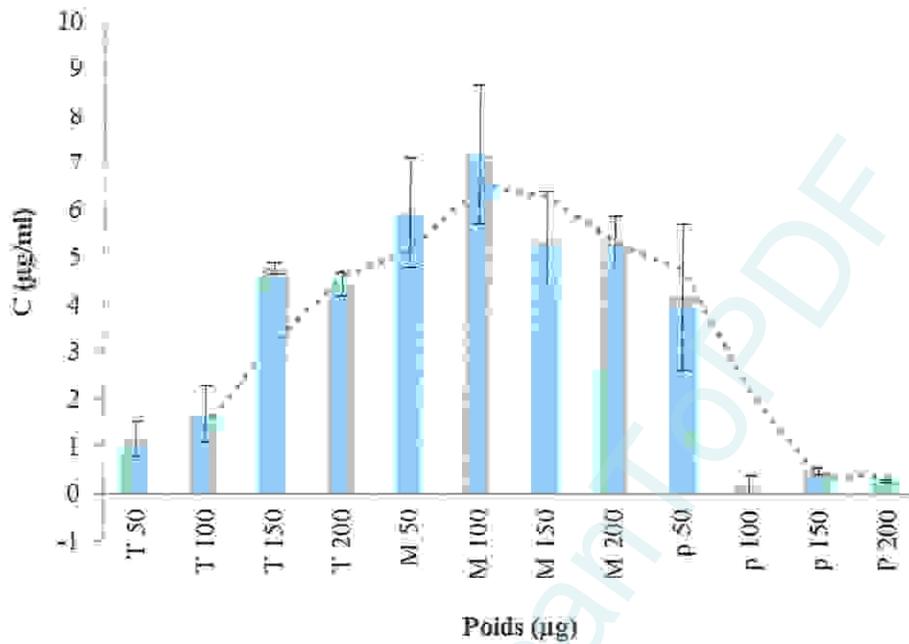


Figure 40 : Histogramme de la quantité d'ADN selon les poids des échantillons

### 7. 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 41. Nos valeurs sont comprises entre 1,69 et 2,16 et les échantillons dont le poids est de 100µg présente la meilleure pureté obtenue. ( fig.41)

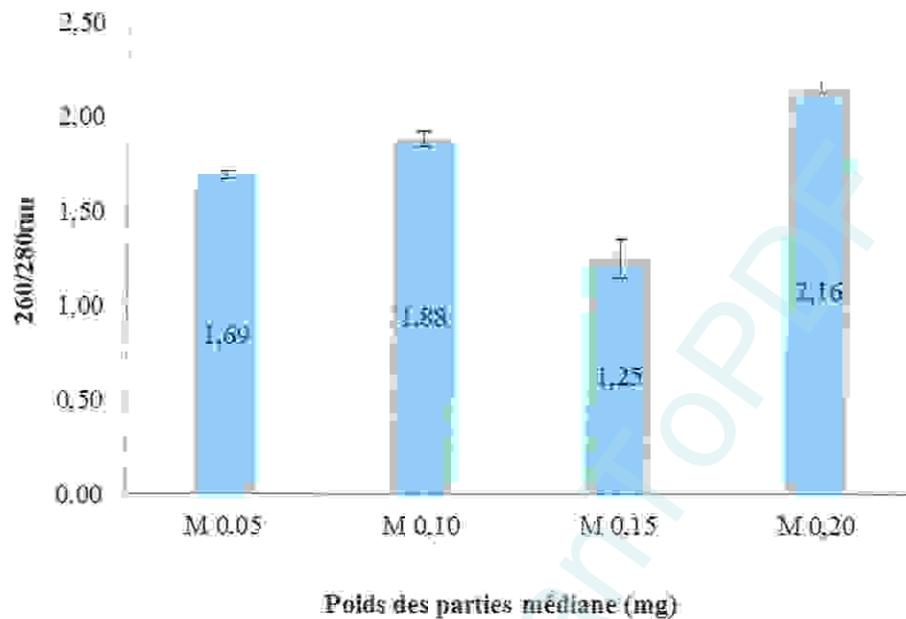


Figure 41 : Histogramme de pureté d'ADN selon les poids des échantillons des régions médiane.

## 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 deux jours. En sachant que le protocole initial était sur 3 jours (Figure 42).

- 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 solutions déjà chaud et incuber à 60°C pendant 2 heures.
- Passer au vortex les ependorf.
- Centrifuger à 3800rpm pendant 20 min et transférer dans un ependorf de 1.5ml.
- Ajouter un volume égal de (Chloroforme-Ethanol 4,96/0.08ml et 1.92ml) et bien mélanger par renversement pendant 3 minutes.
- Centrifuger à 1500rpm pendant 10 minutes à 4°C.
- Récupère le surnageant et le transfère dans un ependorf propre.
- Ajouter  $\frac{2}{3}$  de volume de propasol.

- Laisser précipiter pendant 1 nuit 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'air libre pendant 10 minutes et reprendre dans 50microlitres d'H<sub>2</sub>O incubant à 37°C resuspendre l'ADN.
- Conserver à 4°C

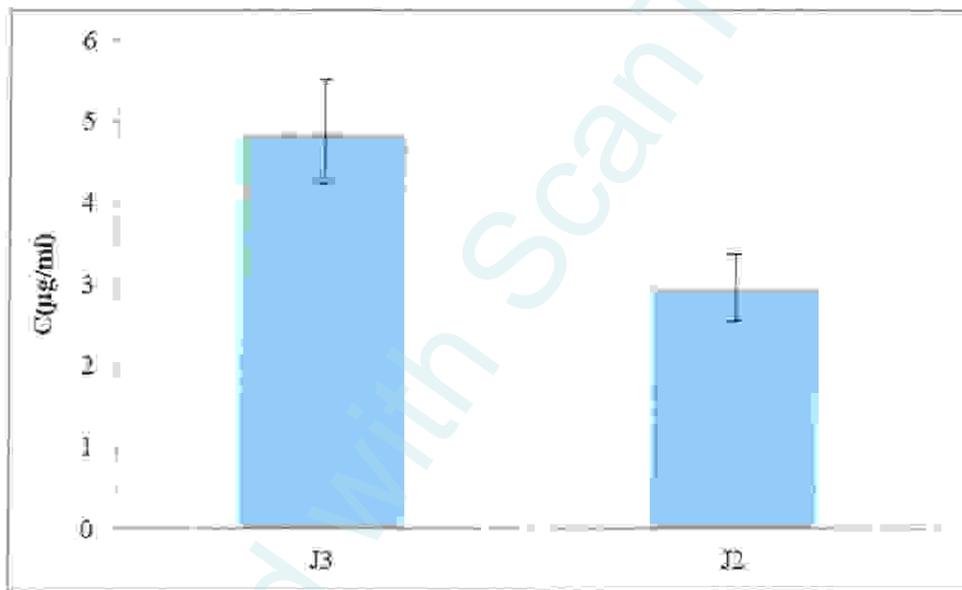


Figure 42 : Histogramme de quantité d'ADN selon la durée du protocole.

# Conclusion

Produced with ScanTOPDF

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.

La comparaison des différentes structures sur les sites d'étude révèle une spéciation de la composition des différentes populations selon le site étudié.

Le croisement des résultats montre que la récolte 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 quatre 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 incubé 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 incubé à 37°C pendant 1 jour

Jour 3

- Ajouter 2/3 de volume d'isopropanol glacé
- Laisser précipiter pendant une nuit à -20°C

Jour 4

- 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 bibliographiques**

Produced with Scantopdf

### Web graphie :

- (1) [http://adamoliverbrown.com/wp-content/uploads/2012/02/Lab06\\_Ann%C3%A9lides.pdf](http://adamoliverbrown.com/wp-content/uploads/2012/02/Lab06_Ann%C3%A9lides.pdf)  
Consulté le 15/02/2016
- (2) <http://coursbiologie.net/les%20lophotrochozoaires-les%20ann%C3%A9lides.html> consulté le 15/02/2016
- (3) [http://www.biorny.sitew.com/fs/12\\_s3/5hcqi-introduction\\_a\\_la\\_biologie.pdf](http://www.biorny.sitew.com/fs/12_s3/5hcqi-introduction_a_la_biologie.pdf) consulté le 18/02/2016
- (4) <http://www.takween.com.tn/Demo/Zoologie/chap7/chap7.pdf> consulté le 20/02/2016
- (5) <http://www.vdsciences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-animale/zoologie-descriptive/biol-animale-14-annelides.html> consulté le 20/02/2016
- (6) [http://sites79.ac-poitiers.fr/defiscientifique-melle/sites/defiscientifique-melle/IMG/pdf/vers\\_de\\_terre\\_map31.pdf](http://sites79.ac-poitiers.fr/defiscientifique-melle/sites/defiscientifique-melle/IMG/pdf/vers_de_terre_map31.pdf) consulté le 23/02/2016
- (7) <http://nico8386.free.fr/cours/BA/Classifprotos.pdf> consulté le 23/02/2016
- (8) <http://www.kobalinverts.com/articles/les-hirudinea.html> consulté le 26/02/2016
- (9) <http://blogplongee.fr/wp-content/uploads/2011/11/cours-biologie-marine-vers.pdf> consulté le 26/02/2016
- (10) [http://www.fsr.ac.ma/cours/biologie/amzazi/acide\\_nucl.pdf](http://www.fsr.ac.ma/cours/biologie/amzazi/acide_nucl.pdf) consulté le 27/02/2016
- (11) <http://www.ne.ch/autorites/DDTE/SCAV/denreesalimentaires/Documents/ExplicationsTheoriques.pdf> consulté le 29/02/2016
- (12) <https://natyinfirmiere.files.wordpress.com/2010/10/linformation-genetique-adn-transfert-et-conservation.pdf> consulté le 02/03/2016
- (13) [http://medecinedentaire-promo2014-2015-alger.weebly.com/uploads/4/3/0/9/43097903/cours\\_adn\\_-\\_polymorphisme.pdf](http://medecinedentaire-promo2014-2015-alger.weebly.com/uploads/4/3/0/9/43097903/cours_adn_-_polymorphisme.pdf) consulté le 02/03/2016
- (14) [http://www.fsr.ac.ma/cours/biologie/amzazi/acide\\_nuc2.pdf](http://www.fsr.ac.ma/cours/biologie/amzazi/acide_nuc2.pdf) consulté le 03/03/2016
- (15) <http://fr.winesino.com/public-health-safety/medical-research/1007074990.html> consulté le 05/03/2016
- (16) [sciences1.univ-oujda.ac.ma/cours/svi/TP%20Genetique%20HumaineS5b.pdf](http://sciences1.univ-oujda.ac.ma/cours/svi/TP%20Genetique%20HumaineS5b.pdf) consulté le 05/03/2016
- (17) [www.ma.igmors.u-psud.fr/gautheret/cours/L2-ADN1.pdf](http://www.ma.igmors.u-psud.fr/gautheret/cours/L2-ADN1.pdf) consulté le 05/03/2016
- (18) [www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BMbioch/bmbioch.pdf](http://www.chups.jussieu.fr/polys/biochimie/BMbioch/bmbioch.pdf) 06/03/2016

(19)[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 06/03/2016

#### Mémoires :

Allouti N., Étude écotoxicologique de deux Néréidés : *Pernereiscultrifera* et *Neriesfalsa* (annélides, polychètes) dans l'Est Algérien (El-Kala, Skikda) : Cycle de reproduction, activité biochimique et enzymatique, Annaba : université Badji Mokhtar, 2011, 05 -19 p.

François C, contribution a l'étude biochimique de l'ovogenèse de *perinereis cultrifera* (annélide polychète), université des sciences et techniques d Lille, 1981, 06 p

Gasmi H., 2010. Effet du stress environnemental sur la biodiversité et la physiologie d'un bioindicateur de pollution *Perinereis cultrifera* (Annélide, Polychète) : Aspects biologie, morphométrique, et biochimique. Thèse de Magistère en biologie et physiologie animale option Ecotoxicologie Université d'Annaba., 99p.

Guemouda M, impact de la pollution par les hydrocarbures sur *Perineries cultrifera* (annélides, polychètes) – littoral Est Algérien – Annaba : université Badji Mokhtar 2014-2015, 48-56-57-p

Meghlaoui Z, stress environnemental et biodiversité des polychètes, analyse polylogénétique –littoral Est Algérien, Annaba : université Badji Mokhtar 2014-2015, 24-25-26p

Rouabah A., 2003. Comparaison au plan biochimiques et génétique de population de l'annélide polychète *Perenereis cultrifera* du littoral français et algérien : pr'cision des liens de parenté. Thèse de doctorat, Université de Mentouri Constantine.

Thomas H, transport électronique dans l'ADN –université des sciences et technique de Lille I, 2002, 06p

Younsi M., Contribution à l'étude de la position taxonomique de *Perinereiscultrifera* au niveau du bassin méditerranéen- Littoral Nord Est Algérien -, Constantine : Université Mentouri, 2006, -02-12-14P.

#### Livres :

- Besnick, stephen D, biologie, 1<sup>ère</sup> ed. paris, 2004, 45 p
- Housset C. et Raisonnier A., Biologie Moléculaire, Paris : faculté de médecine (pierre et maricurie) : 2006, 204p.
- Karp, Gerald, biologie cellulaire et moléculaire : concepts and experiments ,3ème ed, paris. 2010, 404p

- Raven, Johnson, Mason, Losos, Singer. *biologie.3emeed.france: de boeck*, 2014, 1279p. ISBN:978-2-8041-8458-2.
- Turner P.C., Cleman M., Dales A.D., et White M.R.II., *L'essentiel en biologie moléculaire*. berti. lieu d'édition : port royal livres, 2000,37P.
- Werner M., *biochimie et biologie moléculaire*. paris : dunod, 2007, 654p.

**Articles :**

- Sahnoun F ,Bendraoua A, Hadjel M,(2010), contrôle de la population marine du littoral oranais,communication science et technologie ,147p
- 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.

Produced with Scantopdf

Le produit	Composition chimique	Rôle
<b>CTAB</b>	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide ou $(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3\text{Br}$	CTAB est un détergent cationique, soluble dans l' $\text{H}_2\text{O}$ et facilement soluble dans l'alcool. CTAB est couramment utilisé dans la préparation et la purification d'ADN génomique de bactéries, y compris minipreps ADN pour le séquençage. Des complexes de CTAB à la fois polysaccharide et la protéine résiduelle.
<b>Chloroforme</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trichlorométhane</li> <li>• <math>\text{CHCl}_3</math></li> </ul>	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.
<b>EDTA</b>	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 metallo-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 $\text{Mg}^{2+}$ , 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.
<b>Ethanol 75%</b>	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	Pour lavage
<b>Ethanol 95%</b>	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	Élimination des sels et précipitation de l'ADN
<b>Formol</b>	$\text{CH}_2\text{O}$	La conservation des échantillons.
<b>HCl</b>	l'acide chlorhydrique.	Ajuster le pH
<b>Isopropanol</b>	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{-CH}_3$	Précipité et amélioré considérablement la qualité d'ADN
<b>Mercaptoéthanol</b>	$\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$	Mercaptoéthanol est souvent inclus dans des tampons d'extraction conçus pour l'extraction d'ADN
<b>NaCl</b>	Le chlorure de sodium	L'addition de NaCl à une concentration supérieure à 0,5 M avec le CTAB est connue pour éliminer les polysaccharides. Les sels comme NaCl sont ajoutés pour moduler la concentration des cations dans le tampon d'extraction et éclater des compartiments par osmose

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 (C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO)<sub>n</sub></p>	<p>Utiliser pour l'adsorption des composés phénoliques à pH bas. le PVP co-précipite avec l'ADN</p>
RNase	ribonucléase	<p>Est un type de nucléase qui catalyse la dégradation de l'ARN en éléments plus petits.</p>
SDS	<p>dodécylsulfate de sodium NaSO<sub>4</sub>((CH<sub>2</sub>)<sub>11</sub>CH<sub>3</sub>)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• est un détergent et tensioactif ionique fort. couramment utilisé en biochimie et biologie moléculaire.</li> <li>• solubilisation des lipides.</li> </ul>

Uria	<ul style="list-style-type: none"><li>• trihydroxyméthylamino méthane</li><li>• 2-amino-2- hydroxyméthyl-1,3- propanediol</li></ul>	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.
------	---	--

Produced with ScanTOPDF

# Glossaire

Produced with ScanTOPDF

## 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

**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

**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 (issuë 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 importantes dans l'appariement des bases azotées d'un acide nucléique bicaténaire.

**Liaison phosphodiestères** (*Phosphodiester bond*) : liaison covalente entre deux nucléotides adjacents 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 (paramecie), sporozoaires (plasmodies).

## R

**Reproduction** : Fonction par laquelle les être 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. (Bourgeonnement 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.

## 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

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* (Grübe, 1840) 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.

L'utilisation des indices écologique pour essayer d'étudier la faune associée à notre espèce à révéler une spéciation de la composition des différentes populations selon le site étudié.

Dans le 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, *Perinereis cultrifera*, phylogénétique, extraction d'ADN

## 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* (Grübe, 1840) 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.

The use of ecological clues to try to study the fauna associated with our species to reveal speciation of the composition of different populations according to the study site.

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 Polychètes, *Perinereis cultrifera*, phylogenetic, extraction of DNA.

## ملخص

الديدان الحلقية ذات الأشعار الرقيقة هي واحدة من الأنواع الأكثر وفرة في المجتمعات القاعية ذات التراب الرقيمي و التنوع البيولوجي و يطلق على هذا النوع من الحلقيات *Perinereis cultrifera* (Grübe, 1840) و التي تمثل نوع حقيقي معقد، و من هنا كانت الحاجة للمقارنة على المستوى الجزيئي من أجل تأكيد العلاقة الموجودة بين مختلف الأشكال لهذا النوع و ذلك باستخدام تقنيات التسلسل الجيني و تقارب العلاقات الوراثية. محاولة دراسة هذا النوع من الحيوانات باستخدام أدلة اليبس للكشف عن التركيبة حسب الموقع الجغرافي.

من أجل تحسين مرونه كقول مستخرج الحمض النووي و الحصول على أفضل أداء مع الأجدد بعين الاعتبار جميع العوامل التي يمكن أن تؤثر على نوعية الحمض النووي. حيث ظهرت النتائج أن مجرد الأبر مط و التعنن و التعليق في الكحول و وزن العينات يمكن أن يحسن الأداء بشكل ملحوظ.

الكلمات المفتاحية: الديدان الحلقية ذات الأشعار الرقيقة، *Perinereis cultrifera*، تقارب العلاقات الوراثية، استخراج

حمض النووي.