

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

**Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement
du Littoral**



Mémoire de fin d'études

**En vue de l'obtention du Diplôme d'Ingénieur et Master en Sciences de La Mer
Option : Biotechnologie Marine**

Thème

**Contribution a la caractérisation systématique et
morphologique des poissons**

Présenté par :

Maichi Feriel.
Benhafed Ryma.

Soutenu le 14/10/2021 devant la commission de jury:

Mme MAOUEL DJ.	Maître de conférences A – ENSSMAL	Présidente
Mme ALOUACHE S.	Maître de conférences A – ENSSMAL	Examinatrice
Mme CHAOU N.	Maître-assistant– ENSSMAL	Examinatrice
Mme AMAR I.	Maître-assistant– ENSSMAL	Promotrice

Année universitaire : 2020 - 2021

Remerciements

Ce travail n'aurait pu se réaliser sans l'aide de Dieu qui nous a donné volonté, courage et surtout patience, puis celle de toutes les personnes qui y ont contribuées de près ou de loin.

Nous voudrions tout d'abord adresser toute notre reconnaissance à Madame AMAR Imen qui a encadré ce travail, ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

*C'est avec un grand plaisir que nous adressons nos remerciements à :
Madame MAOUEL DJ. Pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de présider cette soutenance.*

Madame ALOUACHE S. Qui nous a fait l'honneur d'être membres du jury et d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Madame CHAOU N. Qui nous a fait l'honneur d'être membres du jury et d'avoir accepté d'examiner notre travail

Nous désirons aussi remercier les professeurs de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral, qui nous ont fourni les outils nécessaires à la réussite de nos études universitaires.

Nous remercions également tout le personnel de la bibliothèque et la scolarité pour leur aide, patience, disponibilité et gentillesse.

Nous tenons à témoigner toute notre gratitude à nos parents, nos frères et sœurs et les membres de nos familles.

Enfin, nous adressons un grand merci à nos vrais amis.

Dédicaces

Nul œuvre est exaltante que celle réalisée avec l'aide du bon DIEU et le soutien moral des personnes qui nous sont proches.

Je dédie ce travail en signe de reconnaissance. A celui qui a lutté et sacrifié pour m'offrir les conditions propices à ma réussite : Mon très cher père SIDJELLOUL.

A celle qui m'a étreint de tendresse et d'affection et qui a constitué la première école de mon existence. Ma très précieuse, chaleureuse et aimable mère SAMIA.

A l'âme de la prunelle de mes yeux, ma très chère grand mère MOUIMA.

*A Mes sœurs : Manel et Malika, Mes frères Mhamed et Abd El raouf
Mes beaux frères Med Saghir et Abd elhadi, qui par leurs prières et leurs encouragements, j'ai pu surmonter tous les obstacles.*

A mon oncle Maamar et Hbib,

A mes très chères nièces Nadia et Maryam,

Mes neveux Med Amir et Imad Edine,

A mes amies Leila, Wissal, Yusra, Melissa, merci d'être des amies si merveilleuses, vous étiez toujours là pour moi, que cela soit dans les moments de joie ou de désespoir,

A la meilleure binôme et amie Ryma, merci d'avoir partagé avec moi toute ces souvenirs que j'oublierais jamais, je suis vraiment chanceuse de t'avoir à mes côtés,

*Et à toutes personnes avec qui j'ai passé des moments inoubliables et qui
n'ont pas cessé de m'encourager.*

Trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et reconnaissance,

Je vous aime.

Feriel (Fifi)

Dédicaces

Je dédie ce travail:

A moi pour tous les obstacles que j'ai pu surmenté tout au long de mon parcours universitaire.

A mon frère Amine (miminou) le meilleure frère au monde

A ma mère Madame Derguine

A mes deux soeurs Abir (Abirou) et Rania (Rak2ayou)

A la mémoire de mon grand père

A ma copine Sana

Sans oublier ma copine et meilleure binome Fériel

A tous ceux que j'aime

Merci!

Ryma Benhafed

SOMMAIRE

Liste des figures.....	I
Liste des tableaux.....	II
Liste des acronymes.....	III
Résumé.....	IV
Introduction.....	1
CHAPITRE I : GÉNÉRALITÉS.....	2
1. Méthodes d'identification morphologique.....	4
2. Méthodes d'analyse génétique.....	8
2.1. Principe.....	8
2.2. Principes d'échantillonnage.....	8
2.3. Analyse des échantillons.....	9
2.4. Identification de l'espèce.....	9
CHAPITRE II : Méthodes d'identification (exemple de la Moule : <i>Mytilus galloprovincialis</i>).....	18
1. Etude morphologique d'un mollusque (exemple de la Moule : <i>Mytilus galloprovincialis</i>).....	18
2. Méthodes d'identification à l'échelle moléculaire.....	28
2.1. Par analyse des protéines.....	28
2.1.1. Marqueurs enzymatiques.....	28
2.1.2. Électrophorèse.....	29
2.2. Par analyse de l'ADN.....	34
2.2.1. Marqueurs génétiques.....	34
2.2.2. L'empreinte génétique.....	35
2.2.3. PCR.....	37
2.2.4. RFLP (Le polymorphisme de longueurs des fragments de restriction)..	52

2.2.5. RAPD.....	53
2.2.6. AFLP.....	55
2.2.7. Barcode moléculaire.....	57
2.2.8. Séquençage.....	60
Discussion.....	64
Conclusion et Perspective.....	69
Référence bibliographique.....	71
Annexe.....	80

Liste des figures

Figure I. 1 : structure bicaténaire de l'ADN.....	5
Figure I. 2 : mensuration prises sur les spécimens examinés.....	13
Figure I. 3 : (A, B, C, D, E) Exemples de quelque critères méristiques.....	15
Figure I. 4 :a) Sonar d'imagerie ARIS 3000 Explorer b) dans le réservoir quatre peu profond c) dans le réservoir trois plus profond pendant les expériences en aquarium.....	16
Figure I. 5 : Image satellitaire montrant la station 1(Cap Tizirine).....	19
Figure I. 6 : Image satellitaire montrant la station 2 (Rochet Blanc).....	20
Figure II. 7 : Les moules nettoyées et débarrassées de leurs épibiontes.....	21
Figure II. 8 : Les paramètres linéaires réalisés.....	22
Figure II. 9 : Distribution des fréquences de tailles des moules récoltées à Cap Tizirine.....	24
Figure II. 10 : Distribution des fréquences de tailles des moules récoltées à rochet blanc.....	25
Figure II. 11 : Graphe représentatif de la régression entre la longueur totale et le poids total de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> prélevé du Cap Tizirine.....	26
Figure II. 12 : Graphe représentatif de la régression entre la longueur totale et le poids total de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> prélevé de Rochet blanc.....	26
Figure II. 13 : Variations spatiotemporelles des valeurs de l'indice de condition des moules récoltés au Cap tizirine et Rochet blanc en moi de mai.....	27
Figure II. 14 : Principe de la focalisation isoélectrique des protéines (164).....	30
Figure II. 15 : Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE).....	31
Figure II. 16 : Exemple d'une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de protéines en conditions dénaturantes (2D-SDS-PAGE).....	32
Figure II. 17 : Résultat de l'électrophorèse par IEF et le niveau de similarité entre les échantillons crus et cuits.....	33
Figure II. 18 : résultat de l'électrophorèse par SDS-PAGE et le niveau de similarité entre les échantillons crus et cuits.....	33
Figure II. 19 : Les différentes étapes de la PCR (Gnis, 2007).....	38
Figure II. 20 : Schéma représentant la méthode hiérarchique utilisée dans l'identification génétique de <i>Phoxinus</i>	39

Figure II. 21: Les résultats de PCR.....	40
Figure II. 22 : La technique de PCR multiplex.....	41
Figure II. 23 : microplaque d'ELISA montrant les résultats obtenues des espèces de scombridae amplifiées par PCR.....	43
Figure II. 24 : résultat de l'électrophorèse sur gel avec PCR-SSCP des espèces.....	45
Figure II. 25 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.....	48
Figure II. 26 : Principe de technique PCR-RFLP.....	51
Figure II. 27: Principe de la RELP.....	53
Figure II. 28: Principe de la technique RAPD (Bertrand, 2009).....	54
Figure II. 29 : Profils RAPD, après coloration au BET et électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, des produits d'amplification obtenus avec les amorces A01 et A10 (Chaoui, 2007).....	55
Figure II. 30 : Les étapes de la technique AFLP (Arnaud, 2006).....	56
Figure II. 31 : Marqueurs AFLP. Principe de détection et source du polymorphisme (Khazaal, <i>et al.</i> 2005).....	57
Figure II. 32 : Schéma représentant les fréquences des distances génétiques à l'intérieur d'une espèce (intraspécifique) et entre des espèces (interspécifiques) (Okassa, 2010).....	59
Figure II. 33: Les écarts du barcoding les salmonidés (Rasmussen, 2009).....	60
Figure II. 34 : Séquençage de l'ADN (Khazaal, <i>et al.</i> 2005).....	62
Figure II. 35 : Le gel de migration.....	62
Figure II. 36 : Exemple de la variation génétique d'un poisson à l'autre, obtenu par séquençage. (khazaal, <i>et al.</i> , 2005).....	63

Liste des tableaux

Tableau1: Equation de regression reliant la longueur totale (Lt) et le poids total (Pt), chez Mytilus provenant du littoral de Tipaza.....	25
Tableau 2: Variations mensuelles de l'indice de condition ($m \pm s$, $n=10$) chez Mytilus edulis récoltés au Cap Tizirine et Rochet Blanc.....	27
Tableau 3: Le sex-ratio des deux stations.....	28
Tableau 4 : Contenance en protéines dans les échantillons de poissons crus et cuits analysés par électrophorèse IEF et SDS-PAGE.....	34
Tableau 5 : tous les résultats obtenus de l'application de la méthodologie proposée, la couleur verte représente le résultat positif et la couleur rouge représente le résultat négatif du test de PCR ELISA.....	44
Tableau 6 : Résultats obtenus de rendement de l'ADN en termes de qualité et quantité pour tous les échantillons de crevette analysés.....	49
Tableau 7: Tableau comparatif des techniques moléculaires appliqué dans l'identification des poissons.....	67

Liste des acronymes

ADN mt: ADN mitochondrial.

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique.

AFLP: Amplified fragment-length polymorphism.

AMOVA : Analyse de la variance moléculaire.

ARN: Acide Ribonucléique.

COI: Cytochrome oxydase.

ddATP: Didésoxyribo nucléotide à Adénine.

ddCTP: Didésoxyribo nucléotide à Cytosine.

ddGTP: Didésoxyribo nucléotide à Guanine.

ddTTP: Didésoxyribo nucléotide à Thymine.

dNTP: désoxyribo nucléotides.

DTT: Dithiothréitol.

EDTA: Ethylène diamine tetra acétiqueacide.

FAO: Food and Agriculture Organization.

HTS: High Tech Système.

IEF: Focalisation Isoélectrique.

Kb: kilobase.

mRNA : Acide ribonucléique messenger.

Multiplex PCR: Multiplex polymerase chainreaction.

NCBI : National Center For Biotechnology Information.

NGS : Séquençage nouvelle génération.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PEG: polyethylene glycol.

pH: potentiel de l'hydrogène.

RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism.

SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis.

SNPs : Single Nucleotide Polymorphism.

Taq: Thermusaquaticus.

Tm: melting temperature, température de fusion moléculaire.

Tris: trishydroxyméthylaminométhane.

VNTR: Variable number tandem repeat.

Résumé

L'identification des espèces de poissons est très importante dans plusieurs domaines, traditionnellement on se basait sur les critères morphologiques, mais cette méthode n'est pas efficace face à des espèces morphologiquement identiques.

L'avancement technologique a permis l'élaboration de nouvelles techniques plus performantes en se basant sur la génétique moléculaire.

Dans notre manuscrit, nous présentons une contribution à la caractérisation systématique et génétique des poissons, nous présentons aussi quelques techniques de génétique moléculaire et leurs applications dans l'identification des espèces de poissons.

Mot clés : identification, espèces, poissons, techniques de génétique moléculaire.

Abstract

The identification of fish species is very important in many areas, traditionally it was based on morphological criteria, but this method is not effective in the face of morphologically identical species.

The technological advancement has allowed the development of new, more efficient technologies based on molecular genetics.

In our manuscript, we present some molecular genetics techniques and their applications in the identification of fish species.

Key words: identification, species, fish, techniques of molecular genetics

ملخص:

تحديد أنواع الأسماك مهم جدا في العديد من المجالات ، في العادة يتم الاستناد على البنية المورفولوجية لكل نوع. لكن هذه الطريقة ليست دقيقة أمام تشابه هذه البنى.

غير أن التطور التكنولوجي سمح باكتشاف طرق حديثة و دقيقة وذلك إعتمادا على الوراثة الجزيئية

في نسختنا هذه نقدم لكم بعض الطرق التي تعتمد على تقنيات الوراثة الجزيئية وتطبيقاتها في تحديد أنواع الأسماك

تحديد ، أنواع ، أسماك ، تقنيات الوراثة الجزيئية : الكلمات المفتاحية

Introduction

Introduction

L'identification des espèces de poissons est traditionnellement basée sur des caractéristiques morphologiques externes. Elle nécessite presque toujours la capture et la manipulation des spécimens. De plus, pour plusieurs d'entre elles, un examen attentif de certaines structures est requis, et ce n'est qu'à partir de spécimens morts ou anesthésiés que nous pouvons les observer. Cette clé est basée sur les critères morphologiques les plus évidents possibles et vise l'identification rapide des spécimens (Desroches, J.-F. 2010).

Cette méthode connaît certaines limites quand il s'agit par exemple de différencier des espèces qui se ressemblent beaucoup morphologiquement. C'est pourquoi les outils génétique et moléculaire fournissent des moyens particulièrement efficaces pour distinguer les individus appartenant à des espèces différentes ou regrouper les individus d'une même espèce (Khazaal, *et al.*, 2005).

Depuis les années 1980, l'identification des stocks de poissons fait appel aux outils génétiques (Carvalho, *et al.*, 1994), (Begg, *et al.*, 1999), (Booke, 1999), (Grant, *et al.*, 1998) qui se sont avérés très informatifs (Waples, 1998). Au début, l'électrophorèse des protéines était la seule connue. Par la suite, la diversité génotypique a été abordée à travers les produits des gènes que sont les allozymes. Ces derniers ont révélé des groupes systématiques passés inaperçus auparavant, aux niveaux intra et interspécifiques (Chaoui, 2007).

La découverte des enzymes de restriction a permis de développer de nouvelles techniques, telles que les RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) sur l'ADN mitochondrial ou nucléaire. L'arrivée de techniques relativement avancées en biologie moléculaire, notamment la PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a mis à notre disposition des marqueurs très polymorphes, tels que les RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), les minisatellites et les microsatellites. Très sensibles, ces derniers permettent de détecter la variabilité génétique à l'intérieur des populations (Tautz, 1984) (De Woody, *et al.*, 2000).

La biodiversité ne comprend pas seulement la diversité des espèces, mais aussi la diversité des gènes et des habitats. Chaque être vivant se distingue de ses congénères par de petites différences dans son matériel héréditaire. Les individus d'une même espèce et d'une même région forment une population (Khazaal, *et al.*, 2005)

Dans notre manuscrit, nous présentons une contribution à la caractérisation systématique et génétique des poissons :

-Le premier chapitre passe en revue par un rappel de quelques principes de base de la génétique moléculaire, nous présentons aussi une étude systématique sur les poissons, basée sur les critères morphologique.

-D'autre part, nous exposons quelques méthodes et techniques de génétiques moléculaires, avec certains exemples de leurs applications dans la différenciation des espèces de poissons.

- Enfin, nous proposons parmi ces méthodes celles qui semblent être les plus fiables pour être appliquées dans la caractérisation des poissons.

Chapitre I :

Généralités

Chapitre I : Généralités

1. Méthode d'identification morphologique

Malgré l'avènement des techniques qui examinent directement la variation génétique biochimique ou moléculaire, les méthodes conventionnelles continuent d'avoir un rôle important dans l'identification des espèces, même à ce jour (Swain, et al., 1999).

Les études morphologiques, sont basées sur l'analyse et l'interprétation des variations de taille et de forme qui sont observées chez les êtres vivants. La démarche la plus classique dans toute étude sur la base des critères morphométriques, est d'effectuer un relevé de valeurs de plusieurs variables quantitatives et/ ou qualitatives sur un échantillon d'individus, et de réaliser par la suite une analyse de données afin d'accéder à l'information nécessaire permettant une interprétation plausible des phénomènes génétiques ou autres qui régissent ces populations (Bouhadad, 1998).

Identification des variables morphométriques

Des caractéristiques morphologiques externes dont les principaux caractères utilisés sont :

Des mesures métriques, qui font référence à des variables numériques continues (la longueur de la tête par rapport à la longueur du corps...).

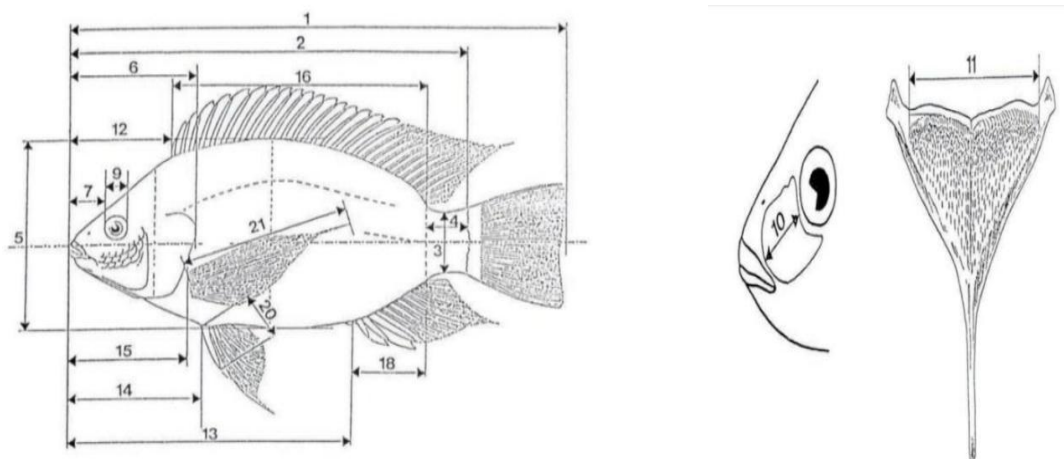


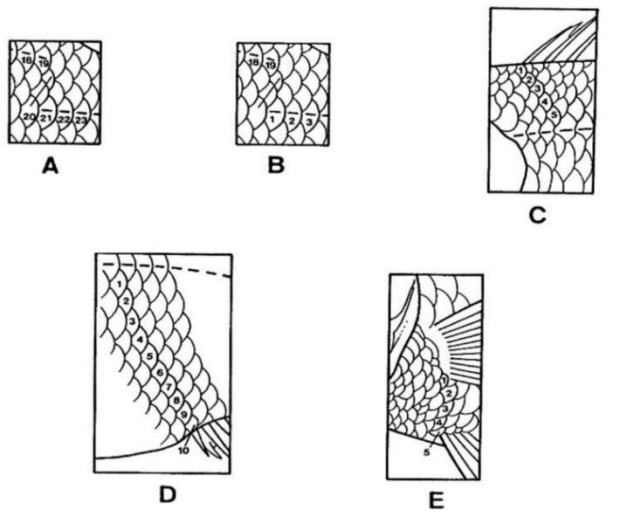
Figure I.2: mensuration prises sur les spécimens examinés

1.longueur totale ;2.longueur standard ;3.hauteur du pédoncule caudale ;4.longueur du pédoncule caudale ;5.hauteur maximale du corps ;6.longueur de la tête ;7.longueur du museau ;8.distance inter-orbitaire ;9.diamètre de l'œil ;10.longueur de l'os pré-orbitaire ;11.largueur de l'os pharyngien inférieur ;12.longueur pré-dorsale ;13.longueur pré-anale ;14.longueur pré-pelvienne ;15.longueur pré-pectorale ;16.longueur de la base de la

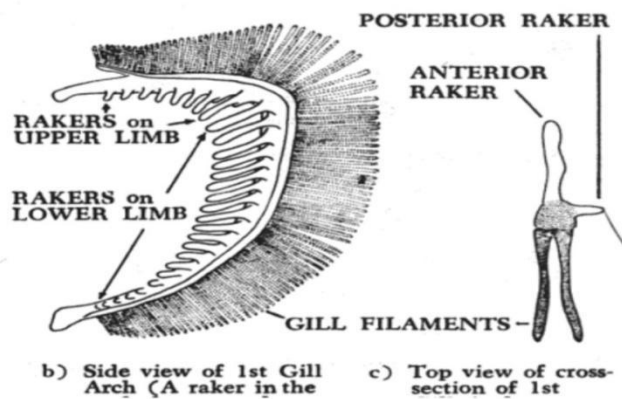
nageoire dorsale ;17.longueur de ma plus longue épine dorsale ;18.longueur de la base de la nageoire anale ;19.longueur de la plus longue épine anale ;20.longueur de l'épine pelvienne;21.longueur de la nageoire pectorale.
(Gourène, *et al.* 1993)

Des comptages méristiques, qui font référence à des variables numériques discontinues.

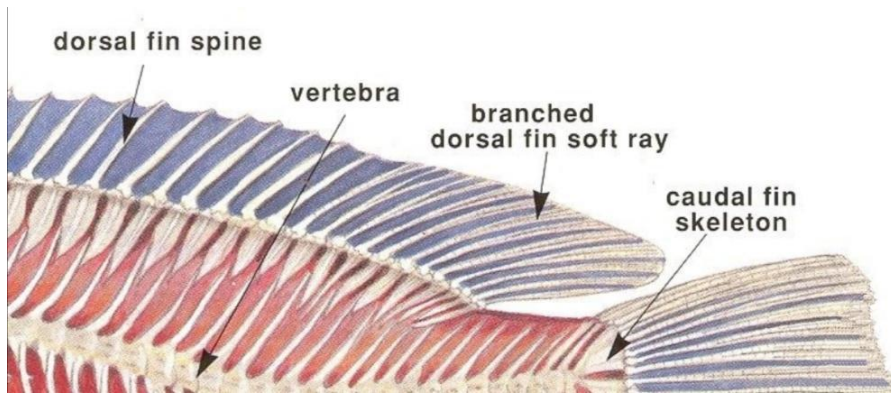
Les écailles



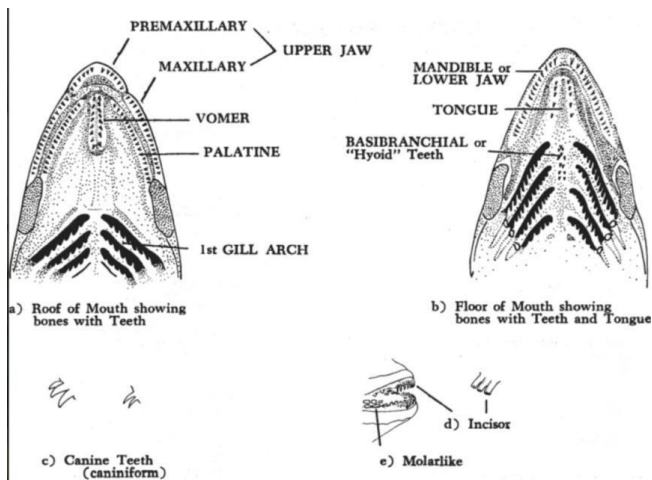
Branchies



Nageoires, rayons, épines



Les dents



Des attributs descriptifs : qui font référence aux caractères distinctifs (la forme de la nageoire caudale, présence de barbillon...)

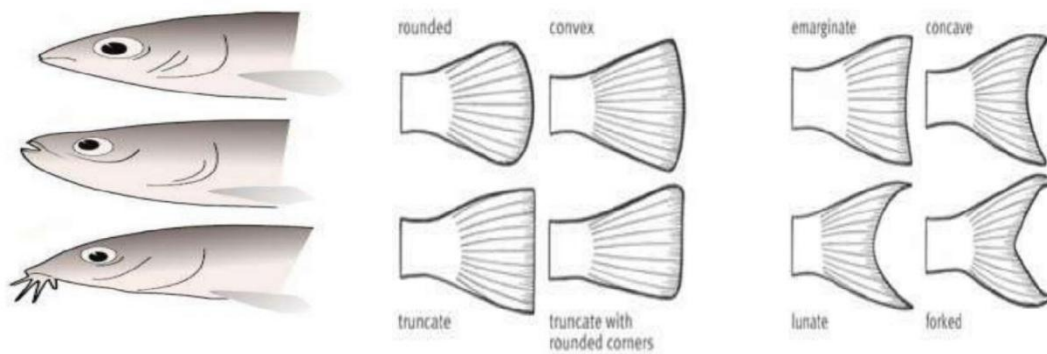


Figure I.3: (A, B, C, D, E) Exemples de quelque critères méristiques (Fish base, 2014).

Sonar d'imagerie à résolution adaptative (ARIS) comme outil d'identification des poissons marins

L'évaluation et le suivi de la biodiversité marine, y compris les populations de poissons, sont essentiels pour une gestion de la conservation fondée sur des preuves des ressources marines côtières. L'efficacité des techniques de surveillance pour l'évaluation des stocks varie selon les conditions de la mer.

Le sonar d'imagerie à résolution adaptative à haute fréquence (ARIS) est largement utilisé pour la détection et l'imagerie d'objets sous-marins y compris l'identification des caractéristiques morphologiques telles que la peau et les nageoires (Belcher et al, 2002). Les progrès technologiques ont grandement amélioré l'utilité de cet outil dans la surveillance marine (Fornshell et Tesei, 2013).

Le sonar imageur ARIS 3000 Explorer (Fig.4) fonctionne à deux fréquences : un mode d'identification 3 MHz pour des images à plus haute résolution dans une portée de 5 m et un mode de détection 1,8 MHz pour des images à plus faible résolution, mais avec une portée accrue de 15 m (www. soundmetrics.com).

Les recherches sous-marines récentes utilisant ARIS comprennent des évaluations des récifs biogéniques (Griffin et al., 2020), le traitement automatisé des images (Shahrestani et al., 2017), la validation des estimations de la longueur des poissons (Cook et al., 2019) et la comparaison de l'identification des assemblages de poissons aux méthodes basées sur le réseau (Egg et al., 2018). Actuellement, il n'y a pas de littérature publiée évaluant les capacités comparatives d'ARIS pour identifier avec précision les espèces en utilisant à la fois des conditions d'aquarium et de terrain.

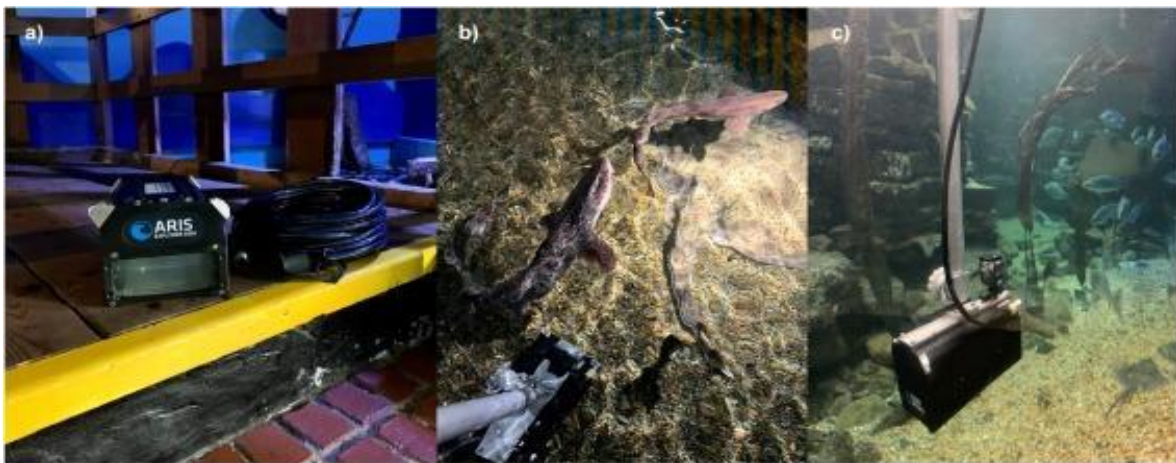


Figure I.4 : a) Sonar d'imagerie ARIS 3000 Explorer b) dans le réservoir quatre peu profond c) dans le réservoir trois plus profond pendant les expériences en aquarium. (<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106092>)

2. Méthodes d'analyse génétique

2.1. Principe

Le principe d'un examen génétique est d'analyser le **matériel génétique** (ADN ou chromosomes) qui se trouve dans les cellules de l'organisme (Genetique-medicale.fr).

l'analyse est réalisée à partir d'une prise de sang, de salive, de cellules de la peau ou de cellules musculaires (Genetique-medicale.fr).

L'analyse et la méthode utilisée dépendent de l'indication (Genetique-medicale.fr).

2.2. Principe d'échantillonnage

Les outils de la génétique des populations fournissent des méthodes permettant d'identifier une série de caractéristiques dans une population donnée.

Compte tenu des limitations inhérentes à chaque méthode d'identification, la meilleure méthode pour évaluer la structure d'un stock est une approche holistique qui utilise toutes les informations disponibles à partir des études génétiques, démographiques, écologiques et du cycle vital (Waples, 1998).

2.3. Analyse des échantillons

L'analyse d'échantillons de tissus pour l'ADN requiert la participation d'un personnel formé et l'utilisation d'un équipement approprié.

L'échantillon de tissu peut être divisé et l'on peut incuber de petits échantillons dans un tampon de digestion.

La période d'incubation et la température dépendront du tissu et de la méthode utilisée. Les autres méthodes d'extraction de l'ADN comprennent entre autres la procédure standard au phénol/chloroforme suivies d'une précipitation à l'éthanol (iccat/documents/scrs).

2.4. Identification de l'espèce

L'ADN est le principal objet d'examen étant donné qu'il est identique dans tous les types de cellule d'un organisme, tandis que les protéines peuvent varier d'un tissu à l'autre. En outre, l'ADN est stable et fournit plus d'informations que les protéines.

L'identification par les moyens génétiques de l'espèce repose sur plusieurs techniques, nous citons à titre d'exemple quelques unes par la suite (iccat/documents/scrs).

Chapitre II:

**Méthode d'identification d'un mollusque
(Exemple de la moule *Mytilus
galloprovincialis*)**

CHAPITRE II : Méthode d'identification d'un mollusque (exemple de la moule *Mytilus galloprovincialis*)

1. Etude morphologique de la Moule *Mytilus galloprovincialis*

Zone d'étude

Station 1

Située au nord-est de cherchell.

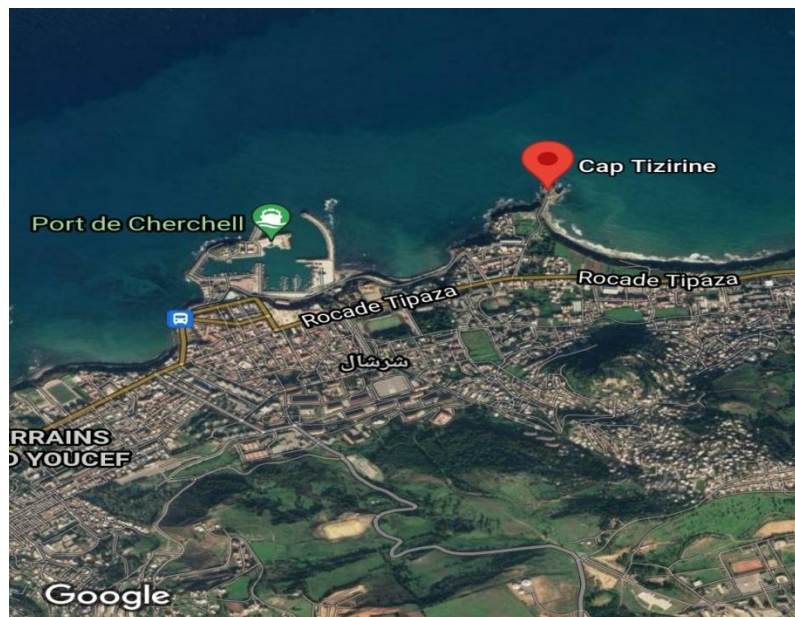


Figure II.5 : Image satellitaire montrant la station 1 (Cap Tizirine)

Station 2

Se situe au coté ouest de cherchell entre la plage oued el bellaa à l'ouest et la plage des trois ilots à l'Est, elle est supposé n'être exposé à aucune source de pollution du fait de sa localisation assez éloignée des divers sujets, il est fréquenté par les pêcheurs et les animaux ainsi que quelques estivants en été.



Figure II.6 : Image satellitaire montrant la station 2 (Rochet Blanc)

Echantillonnage

Stratégie d'échantillonnage

Dans le but de la réalisation de cette étude, un prélèvement d'échantillons de moules a été effectué durant le mois de mai 2021.

Les moules étudiées ont été arrachées de leurs substrat d'une façon artisanale des 2 stations.

Les échantillons ont été transportés dans un temps réduits avec une glacière maintenue à basse température et stockés dans des sachets de congélation au congélateur maintenu à une température de -21 C° .

Au laboratoire, nous avons effectué le trie et le nettoyage des échantillons de leurs epibiontes et de leur byssus.

Après cela nous avons effectué la pesée et mesures des moules.

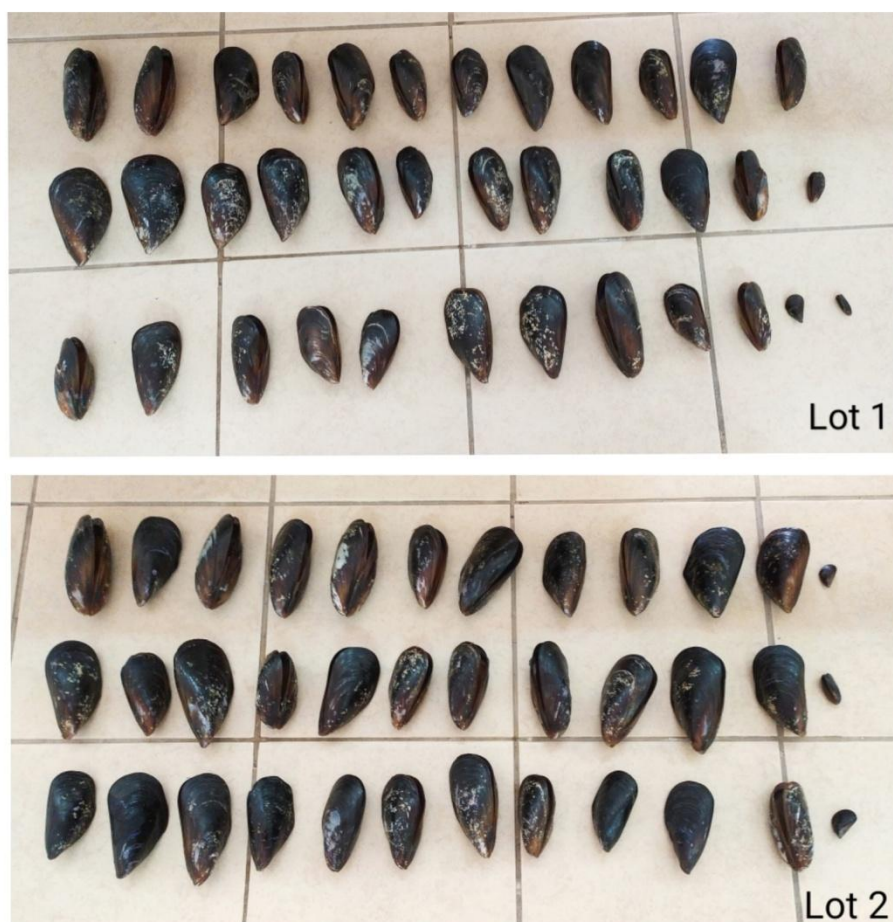


Figure II.7 : Les moules nettoyées et débarrassées de leurs épibiontes

Mesures et pesés de la moule

La mesure des paramètres linéaire a été réalisé à l'aide d'un à coulisse à 1/20mm de précision (fig.8).

La largeur (L_a) qui va de charnière dorsale au bord ventral.

La longueur totale (L_t) correspondant à la plus grande distance, séparant le bord antérieur du bord postérieur de la coquille.

L'épaisseur maximale (E_p) qui est la largeur maximale de la convexité des deux valves réunies.



Figure II.8 : Les paramètres linéaires réalisés

Etude de la croissance

Distribution de fréquence de taille

La première étape à effectuer est de mesurer et regrouper des moules récoltés par classe de taille de 5 mm d'intervalle. Cette opération nous a permis de savoir le nombre d'individu dans chaque classe de taille. Cette distribution des fréquences de taille par station est utilisée pour étudier les paramètres de croissance de Von Betallanfy.

Croissance relative

Une analyse biométrique montrant la relation entre la taille et le poids par loi d'allométrie simple est réalisée pour étudier la croissance relative des bivalves.

L'expression de l'équation de la loi d'allométrie :

$$Y = a X^b$$

Y : dimension de l'organe ou proportion du corps étudié

X : longueur de l'organe de référence

a : indice à l'origine

b : coefficient d'allométrie

Cette équation peut également être exprimée sous sa forme logarithmique après transformation :

$$\text{Log } Y = \text{Log } a + b \text{ Log } X$$

Le coefficient allométrique est exprimé par l'exposant b de l'équation linéaire de la régression. Pour déterminer le type d'allométrie la pente a été comparé a une valeur théorique égale a 3 a l'aide de test t de student selon Trigui(1995), quand :

$b = 3$: il y a isométrie, le poids croit proportionnellement au cube de longueur.

$b > 3$: l'allométrie est dite majorante, le poids croit plus vite que le cube de la longueur.

$b < 3$: l'allométrie est dite minorante le poids croit moins vite que le cube de la longueur.

Donc la croissance d'un paramètre est proportionnellement inférieure ou supérieure a la croissance du paramètre de référence.

La régression linéaire est utilisé pour déterminer le rapport des paramètres a et b , tandis que le calcul du coefficient de détermination R^2 établit le degré de corrélation entre les variables.

Indice de condition

L'indice de condition (IC) est un indice biométrique qui est couramment utilisé en conchyliculture pour rendre compte du degré de remplissage des coquilles des animaux.

L'indice de condition nous donne une idée de l'état physiologique des individus d'une population (Bodoy et Massé, 1979, Bodoy, 1980, Lucas et Beninger, 1985) et permet d'estimer la part de la matière organique émise lors de la reproduction (Bodoy et Massé 1979). Selon Pellerin-Massicote (1994) il est aussi un indicateur générale de stress et de la santé des organismes.

Dans cette étude nous avons choisis de suivre l'évolution de l'indice de condition en chair qui laisse présumer qu'il y a eu une croissance lorsqu'il est plus élevé (Pellerin-Massicote et al, 1989). Cet indice permet d'évaluer l'état physiologique des organismes en relation avec l'alimentation et la reproduction.

$$IC = (\text{poids de la chair fraîche} / \text{Poids total}) \times 100$$

Détermination du sex-ratio :

Les sexes sont facilement déterminés durant la période de gamétogénèse avancée, elle est basée sur la couleur du manteau qui est jaune orangé chez les femelles et blanche ou jaune pâle chez les males.

Pour parvenir à tel résultat, les moules sont nettoyées, ouvertes et sexées d'après l'observation macroscopique de la coloration du manteau.

Le sex-ratio est défini par le rapport suivant :

$$SR = (\text{nombre de mâle} / \text{nombre de femme})$$

Résultats

Distribution de fréquence de taille

Station 1

Les individus récoltés dans la moulière (Cap Tizirine) 36 individus montrent des tailles variant de 17,80 à 85,09 mm. Les effectifs les plus faibles (3 spécimens) sont enregistrés dans les classes de taille inférieures à 56.49 mm. Les individus dont la taille est comprise entre 56.49mm et 85.09mm représentent le plus gros des effectifs de la population de moules récoltées dans la station.

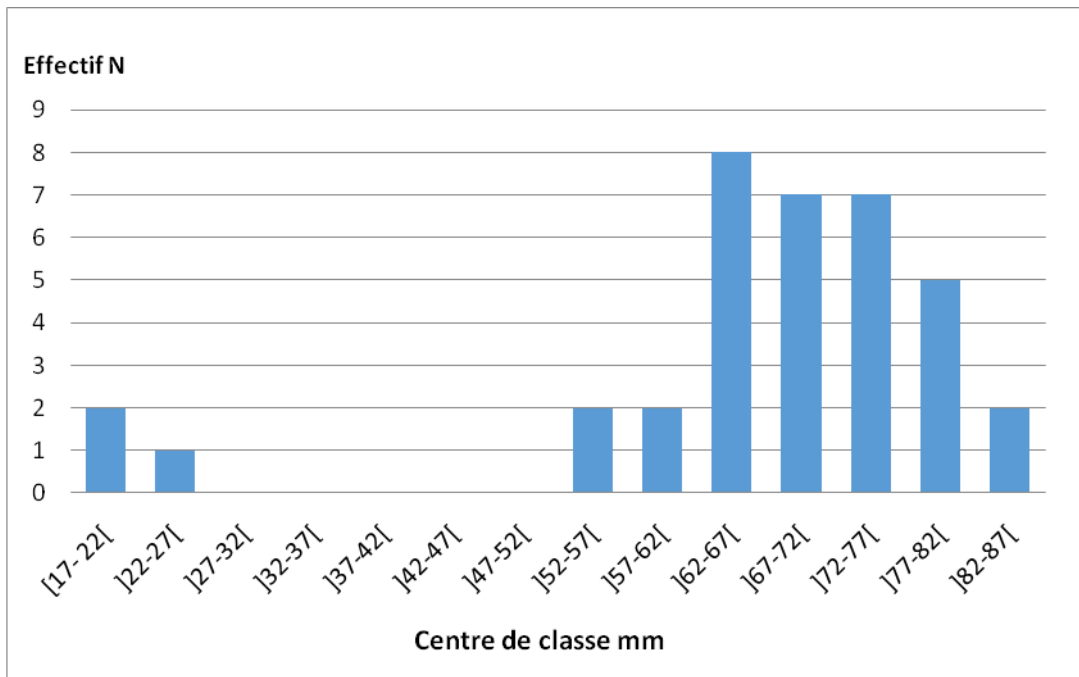


Figure II.9: Distribution des fréquences de tailles des moules récoltées à Cap Tizirine

Station 2

Les 36 individus récoltés de la moulière Rochet blanc sont de taille comprise entre 18.87mm et 87.03mm. Les effectifs les plus faibles (3 spécimens) sont enregistrés dans la classe de taille inférieure à 60.67mm. Les individus dans la taille entre 60.67mm et 87.03mm abritent les effectifs les plus gros.

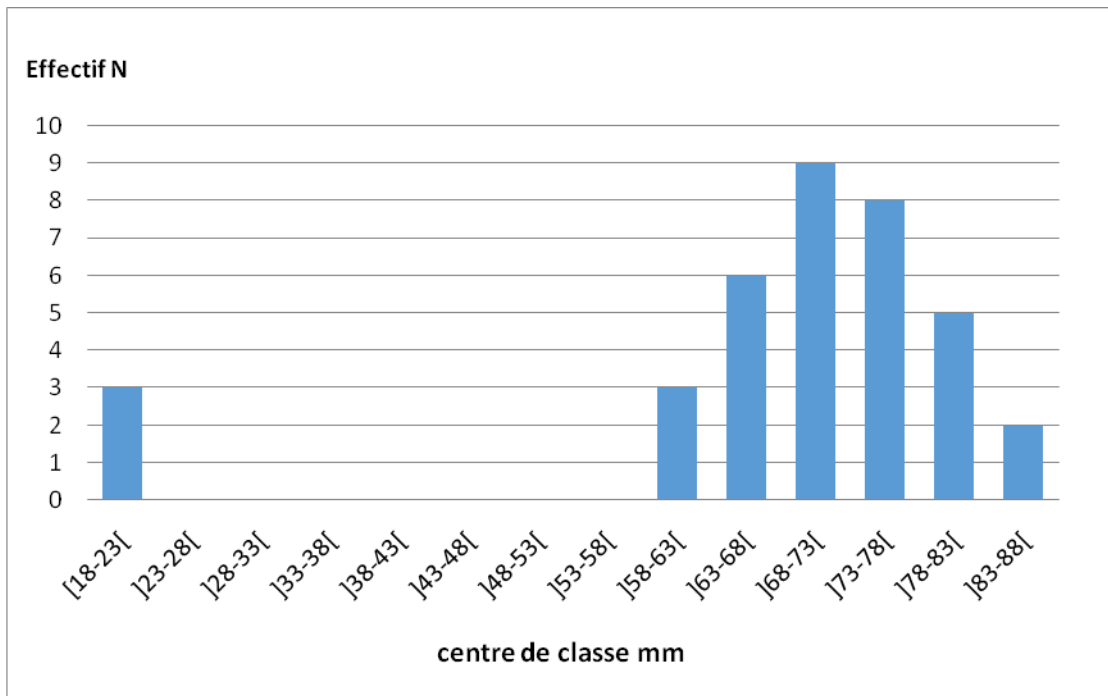


Figure II.10: Distribution des fréquences de tailles des moules récoltées à rochet blanc

Etude de la croissance

Les résultats de l'estimation de la croissance relative de la moule *Mytilus galloprovincialis* par l'application de l'équation allométrique reliant la longueur totale au poids total sont consignés dans le tableau.

Tableau II.1 : Equation de regression reliant la longueur totale (Lt) et le poids total (Pt), chez *Mytilus galloprovincialis* provenant du littoral de Tipaza

Sites	N	X	Y	Equation Biométrique	R ²	Relation biométrique
Cap Tizirine	36	Langueur	Poids	Pt= 0,00042Lt ^{2,454}	0,957	Allométrie minorante
Rochet Blanc	36	Langueur	Poids	Pt= 0,00029Lt ^{2,536}	0,967	Allométrie minorante

Station 1

Chez la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevée à Cap Tizirine, la croissance relative estimée par l'équation reliant la longueur totale au poids total, à partir de 36 individus, montre l'existence d'une allométrie minorante avec un coefficient de détermination R² de

96,7 %. Cette allométrie fait ressortir que chez les bivalves du Cap Tizirine la longueur croit plus vite que le poids (Tab.1, fig.11).

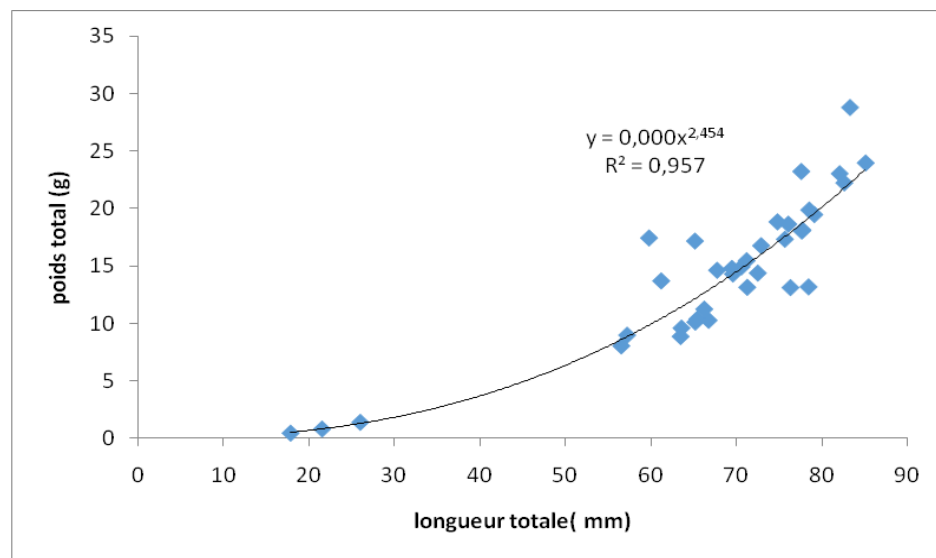


Figure II.11: Graphe représentatif de la régression entre la longueur totale et le poids total de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevé du Cap Tizirine

Station 2

La croissance relative estimée par l'équation reliant la longueur totale au poids total, à partir de 36 individus de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* provenant de Rochet blanc, montre l'existence d'une allométrie minorante avec un coefficient de détermination R2 de 96.7 %. L'allométrie observée fait apparaître que la longueur croit plus vite que le poids chez les bivalves du Cap Rochet blanc (Tab.1, fig.12).

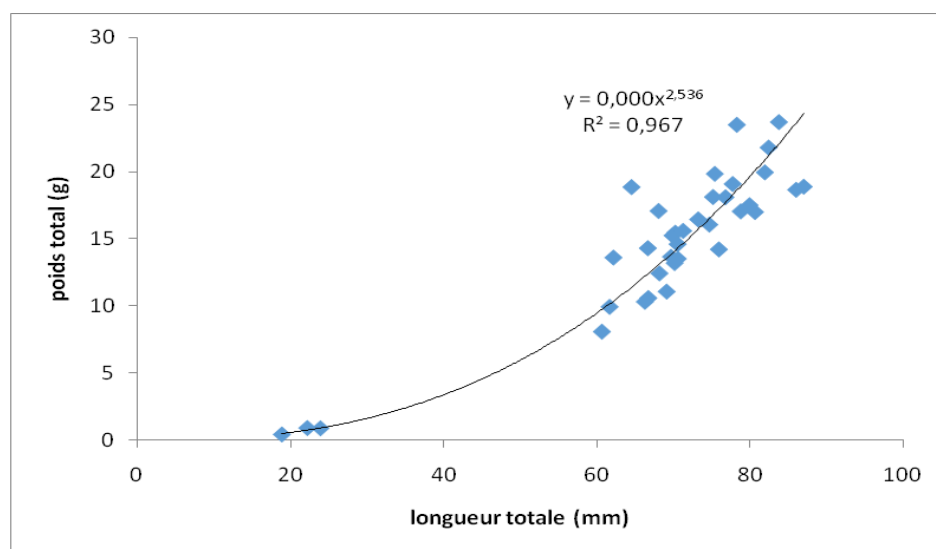


Figure II.12: Graphe représentatif de la régression entre la longueur totale et le poids total de la moule *Mytilus galloprovincialis* prélevé de Rochet blanc

Indice de condition

Les valeurs de l'indice de condition des moules provenant des deux sites montrent des fluctuations similaires.

D'après les résultats obtenus, on note une valeur de 28,35 au niveau du Cap Tizirine et une valeur de 26,25 au niveau du Rochet blanc. Ces valeurs marquent une légère hausse tout au long du mois de mai, variant entre 11,11 et 41,20 pour la Cap Tizirine, et entre 8,04 et 38,82 pour le Rochet blanc.

Tableau II.2 : Variations mensuelles de l'indice de condition ($m \pm s$, $n=10$) chez *Mytilus galloprovincialis* récoltés au Cap Tizirine et Rochet Blanc

Mois	Cap Tizirine	Rochet blanc
Mai	28.35±4.33	26,25±4.12

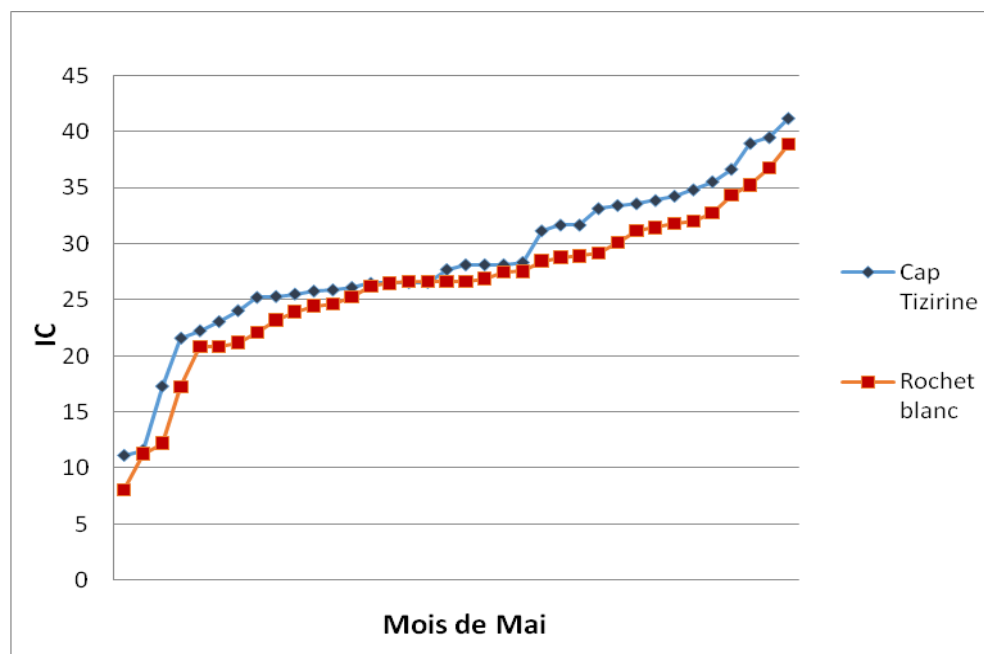


Figure II.13: Variations spatiotemporelles des valeurs de l'indice de condition des moules récoltés au Cap tizirine et Rochet blanc en moi de mai

Le sex-ratio

Station 1

Dans les échantillons de moules récoltées dans le Cap de Tizirine, nous notons une prédominance des individus de sexe mâle pendant le mois de mai.

Station 2

Sur les 36 échantillons de moules prélevés au Rochet Blanc, les échantillons présentent une légère prédominance des individus de sexe mâles durant le mois de mai.

Tableau II.3 : Le sex-ratio des deux stations

Station	Cap Tizirine	Rochet Blanc
Sex-ratio	2,6	1,11

-Comparaison entre les deux lots

-Les fréquences de tailles des deux sites sont presque identiques, variant de 17,80 à 87,03 au total, avec: le meme effectif le plus faible.

-Ainsi que la relation biométrique qui montre une allométrie minorante au niveau des deux stations, ce qui veut dire que la longueur des bivalves (les deux lots) croit plus vite que le poids.

-Les valeurs de l'indice de condition font référence a la croissance des individus des deux stations, ce qui signifie un bon état physiologique des individus.

-Enfin, la valeur du sex-ration au niveau de la station 1 (Cap Tizirine) montre une différence significative entre le nombre de mal et femelle, caractérisé par un nombre de mal plus grand que celui de femelle, tandis qu'au niveau de la station 2 (Rochet Blanc), le nombre de mal est femelle représente une légère différence non significative.

2. Méthode d'identification à l'échelle moléculaire

2.1. Par analyse des protéines ou la protéomique

La protéomique est une science récente qui étudie les protéines. Le terme « protéome », proposé en 1995, désigne l'ensemble des protéines exprimées par le génome d'une cellule, d'un tissu ou encore d'un organe à un moment précis de son développement.

Même si le séquençage du génome humain est aujourd'hui achevé, l'étude du génome comporte des limites. Sa connaissance ne permet pas d'appréhender la complexité du fonctionnement cellulaire. Un même génome conduit à l'expression de plusieurs protéomes en fonction des étapes du cycle cellulaire, de l'état physiopathologique de la cellule. Enfin, les protéines peuvent subir de nombreuses modifications indépendamment de la seule expression du gène codant.

L'analyse protéomique permet donc une description dynamique de la régulation de l'expression génique, grâce à l'étude des protéines et de leurs modifications post-traductionnelles.

Les recherches ont été orienté du coté protéique plus spécifiquement les protéines sarcoplasmiques ou « myogène », qui sont munis d'une spécificité très marqué pour chaque espèce et sont facilement extractibles (Roubal, 1963). Pour l'identification des espèces animales correspondant à des tissus musculaires dénaturés, on utilise aussi bien les protéines des myofibrilles que celles du sarcoplasma.

L'introduction de l'étude de la variation protéique par électrophorèse dans les années soixante a procuré la première base véritable à l'étude génétique des populations (Bernatchez, 1994).

2.1.1. Marqueurs Enzymatiques

Les marqueurs enzymatiques sont plus souvent désignés par le terme allozymes qui sont les variations alléliques d'une enzyme. En effet, chaque individu diploïde possède deux séquences d'ADN (une sur chaque chromosome homologue) correspondant à la même enzyme, qui à la traduction, peuvent donner deux formes enzymatiques différentes ou allozymes si les séquences sont différentes. Ces différences en séquences d'acides aminés composant l'enzyme peuvent être mises en évidence par une électrophorèse (Chlaida, 2009). Cependant, certains auteurs ont montré l'effet de l'environnement sur l'expression enzymatique (Lemaire, *et al*, 2000).

Les différences des fréquences alléliques indiquées par l'électrophorèse des protéines étaient les premiers marqueurs employés pour évaluer les différences génétiques entre les stocks (Wirgin, *et al*, 1994).

2.1.2. L'électrophorèse

Principe et description

L'électrophorèse est une technique de séparation de particules chargées électriquement par migration différentielle sous l'action d'un champ électrique (Semmame, 2020)

L'électrophorèse est (avec la chromatographie) la principale des techniques utilisées en biologie pour la séparation et la caractérisation des molécules. Elle a quelques applications en chimie mais est principalement utilisée en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines et acides nucléiques (Semmame, 2020)

L'électrophorèse est utilisé pour:

- déterminer le nombre de sous-unités d'une protéine et de déterminer leur masse molaire respective.
- d'évaluer le degré de purification d'une protéine.
- de séparer des protéines pour les révéler par la technique du Western blot (réaction avec un ou des anticorps).
- de séquencer l'ADN et de déterminer la taille de fragments d'ADN.
- de séparer des acides nucléiques pour les analyser par la technique du Northern blot (ARN) ou du Southern blot (ADN) (Amrani, 2019)

L'électrophorèse a pour but de séparer des molécules chargées au travers d'un gel (un polymère) sous l'effet d'un champ électrique. Les molécules se déplacent vers le pôle de charge opposée à leur charge nette, Les molécules anioniques (-) migrent vers l'anode (+) et les molécules cationiques (+) se déplacent vers la cathode (-) (Amrani, 2019)

Les facteurs influençant la migration:

- Charge électrique nette, celle-ci dépend de la différence entre le pH du milieu et le pH de chacune des particules
- Taille et géométrie de la molécule
- Viscosité et température du tampon
- Intensité du champ électrique (Amrani, 2019)

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Focalisation isoélectrique (IEF)

La focalisation isoélectrique (IEF) est une technique d'électrophorèse sur gel qui sépare les protéines selon leurs points isoélectriques (pI) dans un gradient de pH. Le point isoélectrique d'une protéine est le pH pour lequel la charge nette de la protéine est nulle (Ballihaut, 2007)

Les protéines, entraînées par un champ électrique, vont se déplacer dans ce gradient en fonction de leur charge nette (Ballihaut, 2007)

Quand une protéine arrive au point de pH qui correspond à son point isoélectrique, sa charge globale devient nulle résultant en un arrêt de sa migration, on parle de «focalisation isoélectrique» (Figure 14) (Ballihaut, 2007)

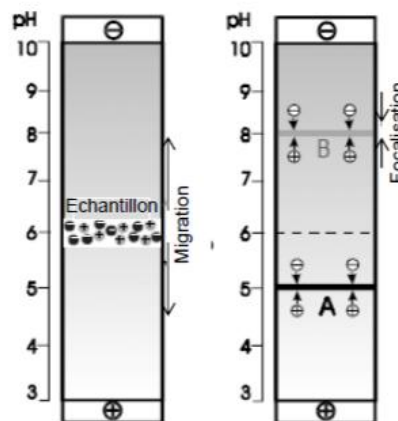


Figure II.14: Principe de la focalisation isoélectrique des protéines (164).Après application d'une tension, les protéines migrent dans le gradient de pH et se focalisent au point de pH correspondant à leur pI (Ballihaut, 2007).

Ce mode de séparation utilise la charge des protéines ce qui proscrit l'utilisation des détergents ioniques très efficaces comme le SDS pour la solubilisation des protéines (Ballihaut, 2007).

Une haute qualité de préparation de l'échantillon est souvent nécessaire (Ballihaut, 2007).

Il est en effet important de se débarrasser des impuretés ioniques et des sels présents aux côtés des protéines après la lyse cellulaire. Ces impuretés peuvent empêcher une focalisation correcte des protéines, des précipitations TCA/acétone des protéines sont donc conseillées pour les enlever. Les acides nucléiques, les lipides, les polysaccharides, les composés phénoliques sont également des composés qui peuvent empêcher de différentes manières la

focalisation correcte des protéines. De la qualité de cette préparation de l'échantillon vont dépendre les résultats de l'électrophorèse IEF et l'électrophorèse 2D (Ballihaut, 2007).

Electrophorèse de protéines sur gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium (SDS-PAGE)

C'est une technique très populaire de séparation des protéines, SDS-PAGE pour « Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Gel Electrophoresis » décrite initialement par Laemmli en 1970 (175), et aujourd'hui très largement répandue (Ballihaut, 2007).

C'est une électrophorèse de zone des protéines dans un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les protéines extraites de l'organisme sont solubilisées, chargées négativement par le SDS puis dénaturées (Ballihaut, 2007).

L'agent réducteur réduit les ponts disulfures des protéines ce qui a pour conséquence de les dissocier en sous-unités polypeptidiques individuelles. Les protéines ainsi solubilisées migrent dans un système d'électrophorèse discontinu constitué de deux gels de polyacrylamide de porosité différente et tamponnés à des pH différents (Ballihaut, 2007).

Les protéines chargées négativement par le SDS possèdent une vitesse de migration intermédiaire et vont de ce fait se trouver emprisonnées et donc concentrées dans la fine zone délimitée par les ions Cl⁻ et les ions glycine (Ballihaut, 2007)

Les protéines ainsi concentrées sont ensuite séparées suivant leur taille dans le gel de séparation (running gel) (Ballihaut, 2007).

Les protéines ne sont plus emprisonnées dans la fine zone et sont alors séparées suivant leur taille par migration vers l'électrode positive (Ballihaut, 2007).

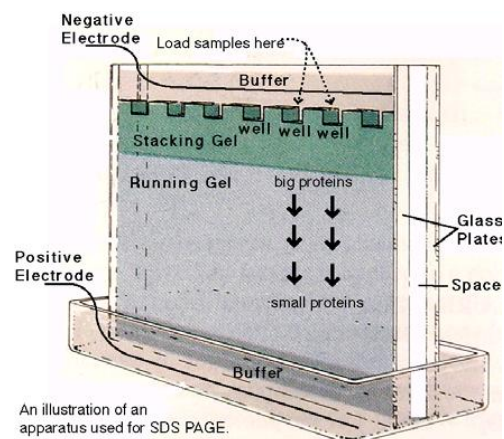


Figure II.15 : Principe de l'électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (1D-SDS-PAGE) (Ballihaut, 2007).

Le SDS-PAGE est de nos jours utilisé en routine principalement pour:

- estimer la taille des protéines.
- établir la pureté d'une protéine.
- quantifier les protéines.
- contrôler l'intégrité protéique.
- comparer le contenu protéique de différents échantillons.
- analyser la taille et le nombre des sous-unités protéique.
- établir des cartes 2D (Ballihaut, 2007).

La dénaturation des protéines entraîne la perte de leur activité enzymatique ce qui oblige parfois à avoir recours à l'électrophorèse de zone non dénaturante plus délicate à utiliser et presque toujours moins résolutive (Ballihaut, 2007).

Electrophorèse bidimensionnelle de protéines sur gel de polyacrylamide (2D –SDS-PAGE)

L'électrophorèse bi dimensionnelle sur gel (2D-SDS-PAGE ou gel 2D) est la seule méthode actuellement disponible pour la séparation simultanée de milliers de protéines (Ballihaut, 2007)

Les protéines sont séparées suivant une première dimension en fonction de leur charge nette par focalisation isoélectrique (IEF) puis suivant une deuxième dimension en fonction de leur taille moléculaire par SDS-PAGE (figure 16) (Ballihaut, 2007)

Cette technique est appropriée à l'étude des protéines comprises entre 10 et 300 kDa avec un point isoélectrique compris entre 4 et 10. Introduite dans les années 1970, perfectionnée par O'Farrell en 1975, cette technique permet aujourd'hui de résoudre jusqu'à 5000 protéines simultanément avec une grande reproductibilité (2000 protéines en routine) (Ballihaut, 2007).

Les limites de cette technique sont les mêmes qu'en IEF. Les protéines membranaires et basiques sont largement sous-représentées sur les gels 2D en raison de problèmes d'extraction et de solubilisation pour l'IEF. Aussi, en raison de la grande diversité des protéines, la résolution des gels 2D n'est pas toujours suffisante pour les séparer efficacement et la co-migration de plusieurs protéines par spot n'est pas rare. La gamme dynamique maximale visible sur gel 2D est de 104 au maximum. Or dans certains échantillons comme le sérum, la gamme dynamique peut atteindre 109. Des méthodes de pré-fractionnement sont donc nécessaires afin de visualiser les protéines minoritaires (Ballihaut, 2007).

Cette technique permet cependant d'observer plusieurs milliers de protéines, certaines modifications post-traductionnelles ainsi que de grandes variations de masses visibles sur la deuxième dimension (Ballihaut, 2007).

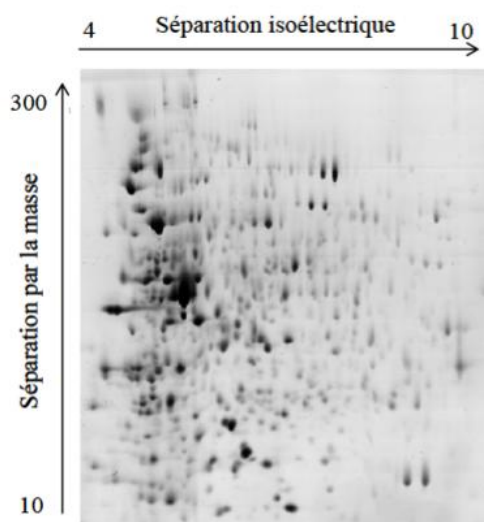


Figure II.16 : Exemple d'une électrophorèse bidimensionnelle sur gel de protéines en conditions dénaturantes (2D-SDS-PAGE) (Ballihaut, 2007)

Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire est une technique analytique permettant la séparation d'espèces chargées sous l'effet d'un champ électrique dans un capillaire de faible diamètre (10 à 100 μ m). Les molécules se déplacent la plupart du temps dans un milieu aqueux appelé électrolyte et servant de milieu conducteur (Audrey, 2017)

La séparation des composés par électrophorèse capillaire résulte de deux mécanismes de transport, l'électromigration et l'électroosmose. L'électromigration résulte du déplacement d'une espèce chargée lorsqu'elle est soumise à un champ électrique, elle s'effectue dans le sens du champ électrique (mobilité électrophorétique positive) pour les cations et dans le sens opposé pour les anions (mobilité électrophorétique négative). Une molécule neutre n'est pas soumise au phénomène d'électromigration, elle se déplace donc à la vitesse du flux électroosmotique (Audrey, 2017).

La mobilité électrophorétique et la vitesse électrophorétique, dépendent du milieu, pH et composition du tampon (force ionique, viscosité, etc) et de la température (Audrey, 2017).

L'électroosmose est responsable du flux électroosmotique. La paroi interne des capillaires de silice fondue est rincée avec de la soude ce qui permet l'hydrolyse des ponts siloxanes en groupements silanols. En fonction du pH de l'électrolyte, ces derniers seront plus ou moins

déprotonés ($pK_a=5.5$). Les contre ions positifs de l'électrolyte vont neutraliser la paroi. Ces cations nombreux, attirés par le pôle négatif, entraînent avec eux le liquide : le flux électroosmotique (Audrey, 2017).

Lorsque le capillaire est rempli d'un électrolyte tampon, les cations du tampon sont attirés vers les charges négatives de la surface du capillaire, formant ainsi une double couche électrique, caractérisée par un potentiel de surface ou potentiel zéta (ζ) (Audrey, 2017).

Le flux électroosmotique est fonction des propriétés du tampon (nature, force ionique, pH et viscosité) (Audrey, 2017).

Electrophorèse sur papier et acétate de cellulose

Les bandes d'acétate de cellulose sont fragiles, mais elles limitent la diffusion des molécules à séparer. La révélation des protéines se fait également par une réaction colorimétrique (rouge de ponceau par exemple). Cette technique, peu résolutive, permet de séparer grossièrement des groupes de protéines. Elle est peu coûteuse et permet une analyse rapide des protéines sériques (Mohamed N, 2010).

Application d'électrophorèse des protéines chez les poissons

Dans le cadre d'une étude collaborative, et dans le but de tester et d'étudier la fiabilité et la pertinence des méthodes d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et IEF, neuf laboratoires ont choisi d'étudier l'identification d'espèces de poissons cuits par électrophorèse des protéines sarcoplasmiques (Food Chemistry 67 (1999)).

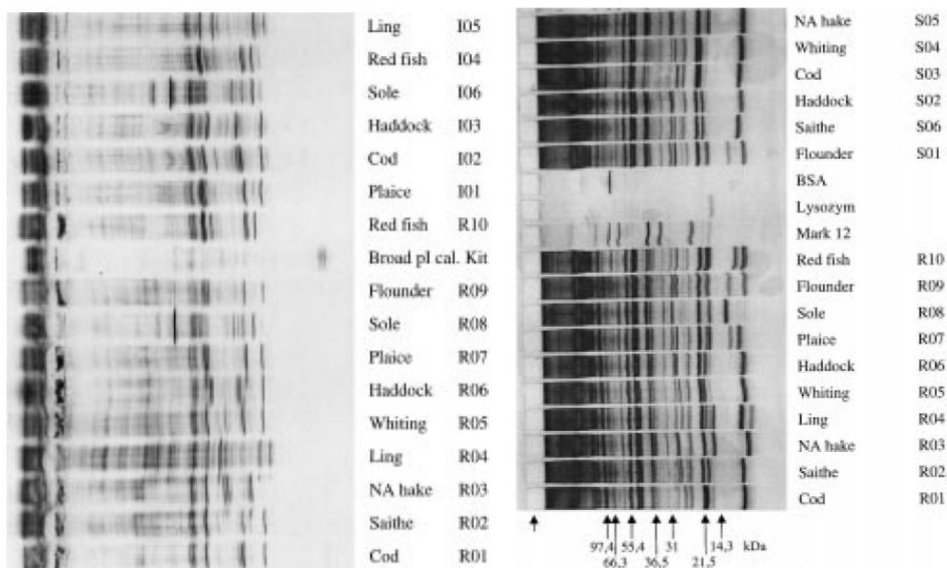


Figure II.17 : résultat de l'électrophorèse par IEF et le niveau de similarité entre les échantillons crus et cuits

Figure II.18 : résultat de l'électrophorèse par SDS-PAGE et le niveau de similarité entre les échantillons crus et cuits

Une similarité significative remarquée entre les espèces de poissons crus témoins et les espèces de poissons cuits a identifiés (Figure 17 et 18), seulement un parmi 35 identifications était incorrecte pour l'électrophorèse IEF et quelques variabilités pour l'électrophorèse SDS-PAGE (tableau4), mais les résultats restent significatifs.

Tableau II.4 : Contenance en protéines dans les échantillons de poissons crus et cuits analysés par électrophorèse IEF et SDS-PAGE.

IEF			SDS-PAGE		
Code d'échantillon					
Crus	espèces	protéines	Crus	Espèces	Proteins
R07	Poisson plat	9.2	R09	Flet	12.1
R01	morue	7.2	R06	Aiglefin	11.4
R06	aiglefin	9.6	R01	Morue	15.2
R10	Poisson rouge	15.3	R05	Merlan	13.7
R04	Molva molva	12.6	R03	Merlu commun	12.9
Cuits			Cuits		
I01	Poisson plat	5.6	S01	Flet	12.7
I02	morue	5.6	S02	Aiglefin	14.8
I03	aiglefin	5.4	S03	Morue	15.2
I04	Poisson rouge	5.1	S04	Merlan	13.9
I05	Molva molva	5.5	S05	Merlu commun	18.1

2.2. Par Analyse de l'ADN

2.2.1 Marqueurs génétiques

Un marqueur génétique est un caractère mesurable à hérédité mendélienne (Tagu,1999) et il est considéré idéal lorsqu'il est polymorphe (variable entre individus), discriminant(différencie les individus apparentés), multiallélique (possède plusieurs allèles sur un même locus), codominant (les hétérozygotes sont visibles), non épistatique (indépendant de l'expression des autres marqueurs), neutre (quel que soit l'allèle présent au locus, la valeur sélective de l'individu est la même), reproductible d'une expérience à l'autre, manipulable à grande échelle et économique. La répartition des marqueurs sur l'ensemble du

génomique est également un critère à retenir. Les principales sources de marqueurs moléculaires proviennent soit d'un polymorphisme de séquence (par exemple substitution, insertion, délétion), soit d'un polymorphisme de nombre d'unités de répétitions (microsatellites, IMA et minisatellites) (Nikolik, 2009).

Les marqueurs génétiques utilisés pour l'application des méthodes génétiques, sont de 3 types:

ADN mitochondrial (ADNmt), ADN nucléaire simple copie, et ADN nucléaire satellite (ADN répétitifs) (BERNATCHEZ, 1994).

Plusieurs caractéristiques de l'ADN mitochondrial en font un marqueur de choix pour l'étude populationnelle. C'est un petit génome de structure simple, que l'on retrouve dans la mitochondrie, présent en plusieurs copies identiques dans chaque cellule (1000-1000000 copies) et donc, facile à isoler. Son taux de mutation nucléotidique est de 5 à 10 fois supérieures à celui du génome nucléaire, ce qui augmente sa capacité de résolution. Parce qu'il est haploïde (un seul type par individu) et transmis maternellement, sa taille est théoriquement 1/4 de celui des gènes nucléaires et par conséquent, l'ADNmt est moins sensible à l'effet homogénéisateur du flux génique entre populations, ou inversement, plus sensible à la dérive génique, ce qui accentue son pouvoir de discrimination (BERNATCHEZ, 1994).

Comparativement, à tout l'intérêt porté à l'étude de l'ADNmt au cours des dernières années, l'étude de la variabilité génétique de l'ADN nucléaire simple copie en a suscité bien peu, en particulier pour l'étude des populations de poissons (BERNATCHEZ, 1994).

Tandis que l'étude de la variation de l'ADN satellite (ADN répétitif) semble beaucoup plus prometteuse que l'analyse de l'ADN simple copie (BERNATCHEZ, 1994).

Des découvertes récentes ont décrit, d'abord chez l'humain puis chez d'autres organismes, l'existence de loci hypervariables constitués de nombreuses petites unités de séquences répétées et constituant des régions non-codantes du génome (désigné par l'acronyme "VNTR" (variable number of tandem repeats) (BERNATCHEZ, 1994).

Le taux de changement du nombre de ces séquences répétées constituant ces loci est très élevé à un point qu'il génère un très grand nombre d'allèles différents, ce qui permet l'identification génétique individuelle à un niveau de probabilité très élevé. Pour cette raison, cette technique est connue sous le nom de "DNA fingerprinting" (empreinte génétique). Outre son haut degré de résolution, cette approche offre certains autres avantages par rapport à l'analyse de l'ADN nucléaire simple copie. Entre autres, de nombreuses sondes

reconnaissant ces régions hypervariables sont quasiment universelles (utiles pour de nombreuses espèces) et déjà disponibles.

Les chercheurs ont déterminé, à l'aide de marqueurs génétiques appelés microsatellites, l'ascendant généalogique de 98% de la première génération de poissons contenus à la Station biologique et dans les installations industrielles (BERNATCHEZ, 1994).

2.2.2. L’empreinte génétique

L’empreinte génétique désigne une technique permettant l’identification d’un individu à partir de l’ADN. Plus précisément c’est l’image de la répartition des zones non codantes de l’ADN qui constituent l’hérédité d’un individu (ofscienc.com).

Vers le milieu des années 80, des marqueurs polymorphes, appelés des mini satellites, ont été découverts. Ce sont des motifs de quelques dizaines de bases (typiquement entre 30 et 70), dont plusieurs unités se font suite à certains endroits dans le génome. Le nombre d’unités varie d’un individu à l’autre: c’est la base du polymorphisme. Ainsi dans la population, on va dénombrer pour un même marqueur, une dizaine (parfois plus) d’allèles caractérisés chacun par un certain nombre d’unités de répétition. Le degré de polymorphisme de ces marqueurs est donc bien supérieur à celui des polymorphismes de restriction et leur capacité à distinguer les individus est d’autant meilleure. C’est Alec Jeffreys, de l’Université d’Oxford, qui fut le premier à utiliser les mini satellites pour créer des empreintes génétiques; il est désormais considéré comme le père des empreintes génétiques (ofscienc.com).

La révélation des polymorphismes de type minisatellites fait appel à la technique de Southern blot. Cependant cette technique est longue à mettre en œuvre (plusieurs jours). Sa limite essentielle est d’exiger des quantités importantes d’ADN (de l’ordre de 5 à 10 microgrammes), qui doit en plus être de bonne qualité (ofscienc.com).

Vers la fin des années 1980, la découverte d’un nouveau type de polymorphismes, les microsatellites, couplée à l’utilisation d’une nouvelle technique révolutionnaire, la PCR, a permis une nette avancée pour la réalisation d’empreintes génétiques. Les microsatellites comportent des séries de répétitions d’un motif de base court (1 à 4 paire(s) de bases) et sont répartis sur l’ensemble du génome. Le nombre de répétitions peut varier de 10 à 40 environ. Comme dans le cas des mini satellites, le polymorphisme tient au nombre variable de répétitions d’unités observées dans les différents allèles. Chaque marqueur présente une dizaine d’allèles différents, parfois plus. Les séquences à analyser sont donc courtes et parfaitement adaptées à une révélation par la technique de PCR.

Les différents allèles sont reconnus en fonction de leur taille, qui est mesurée en paires de bases d'ADN (ofscienc.com).

Application de l'empreinte génétique pour l'identification des poissons

Cette technique a été utilisée pour démontrer la perte de diversité génétique de souches domestiques de l'Achigan à grande bouche (*Micropterus salmoides*) relativement aux populations sauvages (WHITMORE et al, 1990).

RICO et al. (1993) ont utilisé avec succès des sondes d'origine humaine et virale pour étudier les relations parentales et le succès reproducteur individuel chez l'Épinoche(10) à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). D'autres travaux ont démontré l'utilité de telles sondes pour l'étude populationnelle chez les Salmonidés (TAGGART et FERGUSON, 1990a), les Cyprinidés (GEORGES et al, 1988), les Cichlidés (HARRIS et al. 1991) et les Osméridés (TAYLOR et BENTZEN, 1993).

L'utilité de cette méthode pour les études populationnelles est limitée à cause de la révélation simultanée de la variabilité à plusieurs loci, générant ainsi des patrons de fragments d'ADN parfois complexes et difficiles d'interprétation.

Pour résoudre ce problème il faut développer des sondes spécifiques pour chaque locus hypervariable. Les allèles de ces loci sont ensuite révélés par hybridation avec des sondes spécifiques à chaque locus. Le développement de telles approches est cependant encore jeune et a fait l'objet de peu d'études publiées chez les poissons.

TAGGART et FERGUSON (1990 b) ont démontré chez le Saumon Atlantique (*Salmo salai*) que ces simples loci hypervariables comportent beaucoup plus de variation qu'aucun autre marqueur étudié à ce jour chez cette espèce. Alternativement, les loci "VNTR" de petites tailles (microsatellites) peuvent être amplifiés spécifiquement par la technique PCR éliminant ainsi de multiples difficultés techniques liées à l'utilisation de sondes. Cette approche, encore plus récente que la précédente, n'a fait l'objet que de deux études publiées chez les poissons.

Ainsi, RICO et al. (1993) ont respectivement démontré un taux très élevé de polymorphisme de ces marqueurs chez les Épinoches et la Truite commune.

En France et aux États-Unis, on utilise couramment 13 loci (régions de séquence répétée) pour une identification d'une espèce .Et comme chaque locus est composé d'une certaine séquence de répétition (microsatellite) et que le nombre de répétition est parfaitement

indépendant des répétitions sur les autres loci, les règles de statistiques peuvent être appliquées.

Par exemple, pour trois loci A, B et C, indépendants et pour lesquels il existe plusieurs versions (A_1, A_2, A_3 , et B_1, B_2, \dots), on peut dire que la probabilité $(A_1, B_2, C_1) =$ la Probabilité $(A_1) \times$ Probabilité $(B_2) \times$ Probabilité (C_1) . Ainsi pour 13 loci, la probabilité d'avoir deux séquences identiques pour 2 individus différents non apparentés est estimée à 1 chance sur 10^{18} , ce qui est quasiment négligeable (très proche de zéro). Par conséquent, plus le nombre de microsatellites analysés est important, plus l'identification est fiable. Toutefois, dans le cas général, si on ne sait pas si les 2 individus sont apparentés, la probabilité monte à 1 chance sur 3×10^{12} (parce que 0,2% de la population mondiale est constituée de jumeaux monozygotes).

2.2.3. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Découverte en 1986 par Kary Mullis, la PCR (Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne), permet l'amplification de l'ADN in vitro (Tagu, 2018).

Une technique qui est devenue incontournable et couramment utilisée en routine dans les laboratoires.

En deux mots, c'est une réaction enzymatique qui permet de sélectionner puis d'amplifier en une très grande quantité un fragment d'ADN particulier, présent en très faible quantité au départ, parmi des millions d'autres fragments.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes: une dénaturation, une hybridation, puis une élongation (Ifremer, 2009).

Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible (la durée d'un cycle est de l'ordre de la minute) (Ifremer, 2009).

En moyenne une PCR comporte entre 20 et 40 cycles qui se répètent en boucle, comportant chacun trois paliers de température. De plus, chacun de ces paliers est caractérisé par une réaction chimique distincte.

Principe

Le principe de l'amplification in vitro repose sur la répétition d'un cycle constitué de trois étapes :

1/ la dénaturation des deux brins de la molécule d'ADN.

2/l'hybridation (annealing) des amorces oligonucléotidiques complémentaires d'une séquence de l'ADN simple brin cible.

3/la réaction d'élongation par une ADN polymérase thermostable (la Taq polymérase) (Tagu, 2018).

L'étape de dénaturation est réalisée à une température avoisinant les 95 °C et permet de séparer les deux brins de la molécule d'ADN et d'obtenir des molécules d'ADN simple brin. À la suite de la dénaturation, l'étape d'hybridation ou annealing des amorces oligonucléotidiques est réalisée à une température comprise entre 40 °C et 65°C ; cette température est calculée en fonction de la séquence de ces amorces afin de permettre une fixation spécifique et optimale des amorces sur la séquence d'ADN cible. Enfin, l'étape d'élongation par l'ADN polymérase à partir des amorces hybridées est réalisée à la température de 72 °C, optimale pour la Taq polymérase extraite des bactéries thermophiles (Tagu, 2018).

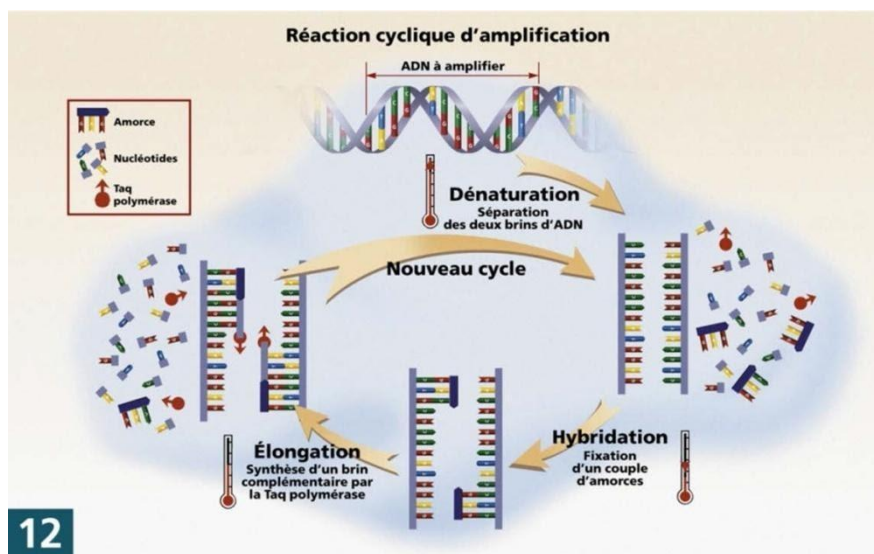


Figure II.19: Les différentes étapes de la PCR (Gnis, 2007)

La plupart des méthodes issues de la PCR peuvent s'appliquer à l'identification des espèces de poisson sur tissus crus, comme, la PCR-AFLP (polymorphisme de longueur de fragments amplifiés) et la PCR-RAPD (amplification aléatoire d'ADN polymorphe) (Han et Ely, (2002), Maldini et al., (2006), Partis et Wells, (1996)), la PCR-SSCP (polymorphisme de conformation du simple brin) est également appliquée à l'authentification des espèces, la PCR-RFLP (polymorphisme de longueur des fragments de restriction), la PCR-RFLP couplée avec un système de nested-PCR (PCR emboîtée, PCR nichée ou PCR en gigogne).

La nested-PCR permet de sélectionner spécifiquement une séquence cible en réalisant deux PCR successives et en diminuant les amplifications non spécifiques, avant la réalisation de la PCR-RFLP.

La technique PCR-FINS (forensically informative nucleotide sequencing) est la combinaison de la PCR et du séquençage, suivie d'analyses phylogénétiques.

La PCR-ELISA, la PCR multiplex, La PCR en temps réel, ainsi que Les méthodes de séquençage haut-débit NGS (Next Generation Sequencing) permettent l'analyse de millions de séquences simultanément en employant des micros et/ou des nanotechnologies (Shendure et Ji, (2008)) (Bojolly, 2017).

Application PCR pour l'identification des poissons

ANGERS et al. (2005) ont identifié les différents biotypes de *Phoxinus eos-neogaeus* qui peuvent être trouvés en sympatrie avec un ou les 2 espèces parentales en se basant sur la méthode de PCR.

La méthode proposée a été basée sur la différence de la composition génomique des membres du complexe *P. eos-neogaeus*.

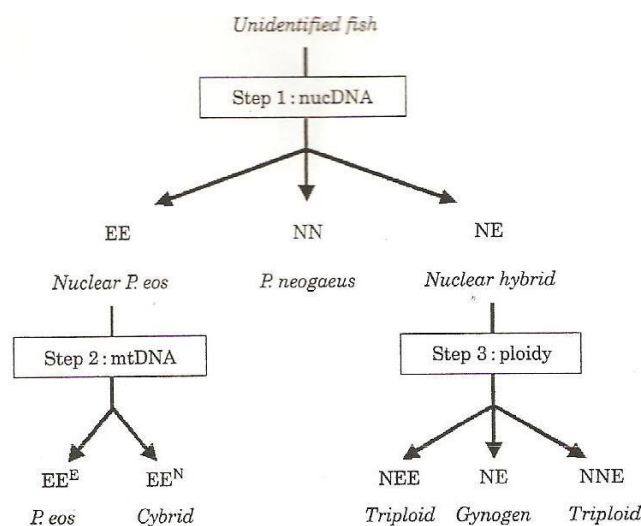


Figure II.20: Schéma représentant la méthode hiérarchique utilisée dans l'identification génétique de *Phoxinus* (ANGRES et al,2005)

Les marqueurs nucléaires ont été utilisés pour séparer entre *P. neogaeus*, *P. eos* (parentale ou cybride) et les hybrides. Tandis que pour séparer entre *P. eos* et cybrides les loci localisés dans l'ADNmt ont été utilisés, et pour la séparation entre les espèces diploïdes et les triploïdes, les marqueurs hypervariables ont été utilisés.

En utilisant les loci spécifiques:

-GH et PEG1/MEST pour le génome nucléaire

-COI pour le génome mitochondrial

La technique de PCR a été appliquée et les résultats obtenus sont dressés dans la figure 21

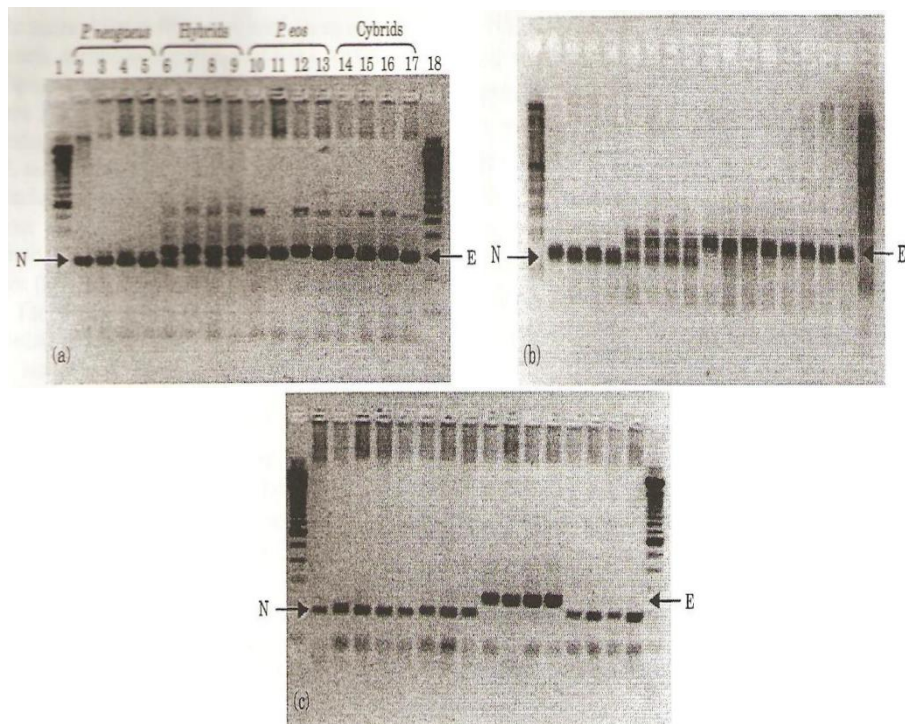


Figure II.21: Les résultats de PCR (ANGRES et al,2005)

Les figures II.21 a et b: Pour les locus GH et PEG1/MEST, respectivement, montrent que les hybrides ont les 2 bandes l'un de *P. eos* et l'autre de *P. neogaeus* et les cybrides ont une seule bande provenant de *P. eos*.

Figure II.21 c : Le locus COI du génome mitochondrial permet la discrimination entre *P. eos* et cybride.

PCR multiplex

Le terme de "PCR multiplexe" désigne une mise au point de la technique PCR autorisant l'amplification, en une seule réaction, de plusieurs segments d'ADN distincts (Khazaal, 2005)

Les couples d'amorces correspondant aux différents loci à analyser sont introduits dans le même tube réactionnel. Les conditions d'amplification étant fixées pour un même tube dans lequel ont lieu plusieurs réactions différentes (Khazaal, 2005).

Le premier avantage de cette adaptation technique est la réduction du coût et la diminution du temps de réalisation et, éventuellement, d'analyse des résultats (Khazaal, 2005).

A la fin de la réaction, les différents produits d'amplification sont effectivement mélangés dans le tube réactionnel. Il est possible de les séparer par électrophorèse. Mais il est vrai que pour un certain nombre de raisons, les segments coamplifiés ne peuvent que se situer dans une gamme restreinte de tailles et il est à craindre que, pour certains d'entre-eux, ces tailles soient très proches ou même, se chevauchent. Pour les distinguer facilement, les techniciens des laboratoires agréés utilisent en fait des amorces couplées à des fluorochromes de couleurs d'émission différentes. Les résultats sont alors présentés, non pas sous la forme bien connue de codes-barres, mais sous la forme d'une succession de "pics" de couleurs différentes (Khazaal, 2005).

Application PCR multiplex

ANGRES et al. (2005), ont utilisé la PCR multiplexe avec une amorce générique et des amorces spécifiques pour comparer le génome des 2 espèces *P. eos* et *P. neogaeus*.

Ses applications qualitatives sont nombreuses tel que la détection de souche virale, des mutations... etc.

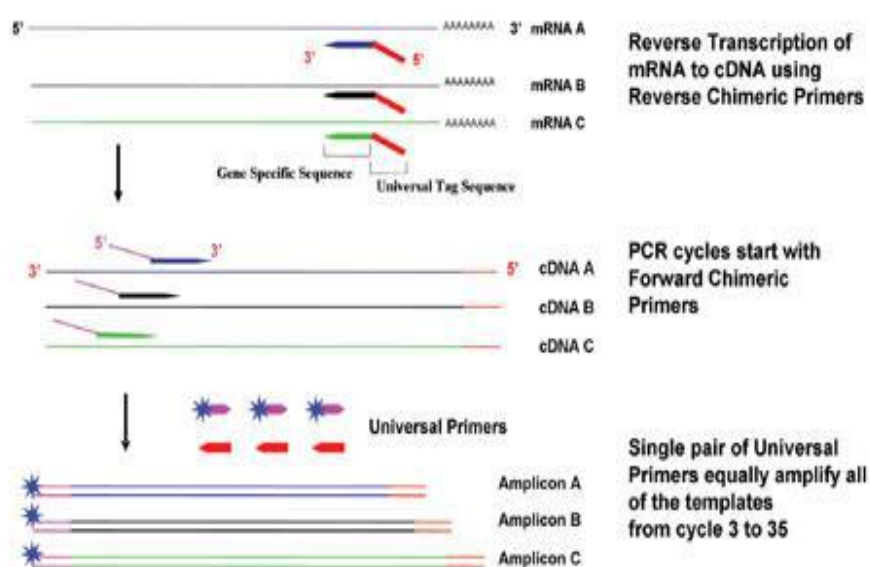


Figure II.22 : La technique de PCR multiplex (ANGRES et al,2005)

PCR-FINS

La technique PCR-FINS (forensically informative nucleotide sequencing) est la combinaison de la PCR et du séquençage, suivie d'analyses phylogénétiques. Cette approche rapide et reproductible de Bartlett et Davidson, (1992) a permis, à l'aide d'amorces universelles pour le gène du cytochrome b, d'identifier avec succès des échantillons de morue salée, de morue partiellement cuite, de hareng (*Clupea harengus*) mariné, de maquereau fumé, de saumon (*Salmo salar*) en conserve et de saumon fumé. Cette nouvelle méthode s'est progressivement imposée pour l'analyse de l'ADN des espèces de Scombridae issus d'aliments ayant subi des transformations industrielles (Espiñeira et al. (2009a), Quinteiro et al. (1998), Terol et al. (2002)) (Bojolly, 2017).

Application PCR-FINS

Dans le cadre de l'étude du développement d'une méthode pour l'identification du scombroid et des espèces communes de substitution dans les produits alimentaires marins par FINS, en Espagne en 2009.

Différentes espèces de scombroid ont été collectées de plusieurs et différentes régions du monde, dont une identification morphologique a été réalisée avant de passer à l'amplification par PCR, le séquençage d'ADN puis le développement de la technique FINS en utilisant le gène cytochrome b.

Les résultats obtenus des analyses génétiques sont conformes avec les bases de caractérisation morphologique.

À l'exception d'un échantillon de Thon et de deux échantillons de Balle et de Frigate Thon, l'étiquetage et les espèces identifiées par la technique proposée sont conformes.

Et dont on peut dire que la technique utilisée dans cette étude est utile dans l'autentification des espèces de scombroid dans les différents produits, frais et conservés, et même pour vérifier l'étiquetage.

PCR-ELISA

Comme son nom l'indique, PCR-ELISA combine une méthode immunologique (ELISA) pour détecter et quantifier des produits PCR spécifiques directement après l'immobilisation de l'ADN sur une plaque de microtitrage.

PCR-ELISA est également moins communément connu sous le nom de PCR-ELISA (polymerase chain reaction-enzyme-linked oligosorbent assay).

Cette technique a vu le jour dans les années 1980 et est le plus souvent utilisée aujourd'hui dans la détection d'agents pathogènes ainsi que l'identification des espèces de poissons (Bitsizebio, 2014).

Application PCR-ELISA

Dans le cadre de l'étude du développement d'une méthode de PCR-ELISA pour l'authentification des espèces de Thon et de *Katsuwonus pelamis* dans les produits alimentaires, 11 échantillons ont été analysés pour vérifier l'étiquetage des produits de Thon commercialisés (Santaclara, 2015).

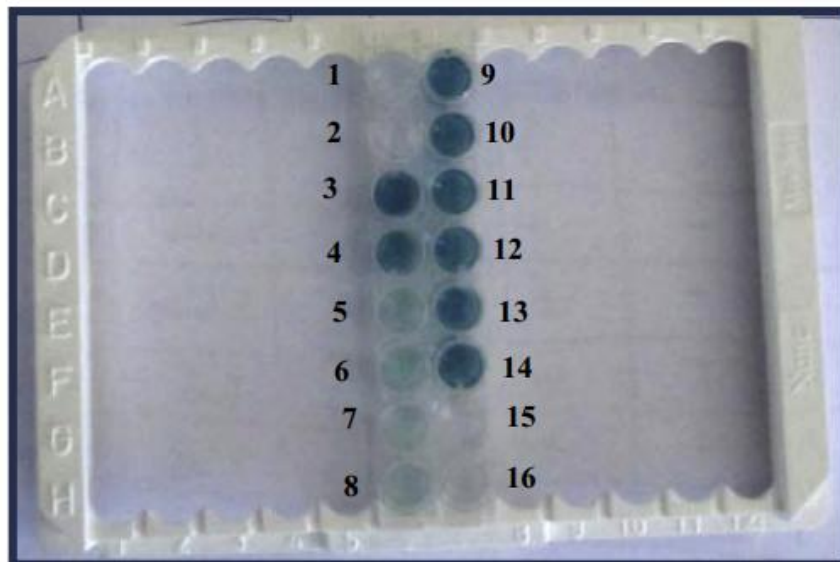


Figure II.23 : microplaque d'ELISA montrant les résultats obtenus des espèces de scombridae amplifiées par PCR, (1) *Scomber colias*; (2) *Scomber scombrus*; (3) *Thunnus obesus*; (4) *T. albacares*; (5) *Katsuwonus pelamis*; (6) *Auxis rochei*; (7) *Auxis thazard*; (8) *Sarda chiliensis*; (9) *T. alalunga*; (10) *T. tonggol*; (11) *T. orientalis*; (12) *T. thynnus*; (13) *T. maccoyii*; (14) *T. atlanticus*; (15) blanc PCR ; (16) blanc ELISA (Santaclara, 2015)

Tableau II.5 : tous les résultats obtenus de l'application de la méthodologie proposée, la couleur verte représente le résultat positif et la couleur rouge représente le résultat négatif du test de PCR-ELISA.

PCR-ELISA RESULTS					ASSAY RESULT*
THUN 1	THUN 2		THUN 3	THUN 4	
	KatPel	ThuAlb			
					<i>Thunnus spp</i>
					<i>T. albacares</i>
					<i>T. alalunga</i>
					<i>T. thynnus</i>
					<i>Katsuwonus pelamis</i>
					<i>T. albacares + T. alalunga</i>
					<i>T. albacares + T. thynnus</i>
					<i>T. alalunga + T. thynnus</i>
					<i>T. albacares + T. alalunga + T. thynnus</i>
					<i>K. pelamis + T. albacares</i>
					<i>K. pelamis + T. alalunga</i>
					<i>K. pelamis + T. thynnus</i>
					<i>K. pelamis + T. albacares + T. alalunga</i>
					<i>K. pelamis + T. albacares + T. thynnus</i>
					<i>K. pelamis + T. alalunga + T. thynnus</i>
					<i>K. pelamis + T. albacares + T. alalunga + T. thynnus</i>

Les résultats obtenus du test PCR-ELISA appliqué sur les échantillons industriels sont conforme avec les instructions initiales, et confirment l'efficacité de la méthode pour les échantillons complexes et ceux présents en petites quantité (<1%).

Tous les échantillons ont été identifiés, seulement 2 contiennent des espèces différents à ceux indiquées en étiquette ce qui indique une erreur de 18% en étiquetage.

PCR-SSCP

Elle permet de séparer les fragments d'ADN double brin en un ADN simple brin, ce dernier ayant une conformation particulière selon sa composition en nucléotides. Après migration électrophorétique, un profil spécifique est obtenu, permettant la discrimination de l'espèce. La PCR-SSCP permettant d'amplifier de courts fragments d'ADN, est particulièrement intéressante pour authentifier les espèces présentes dans les aliments traités thermiquement telles que les espèces de thon dans les produits appertisés (Mackie et al, (1999), Rehbein et al, (1998), Colombo et al, (2005)).

Cependant, cette technique présente des limites car elle est dépendante des conditions de l'électrophorèse (Bojolly, 2017).

Application PCR-SSCP

Dans le but d'identifier les espèces de Thon par une analyse de PCR-SSCP électrophorétique, les échantillons utilisés ont subi une extraction de l'ADN, une amplification par PCR puis une électrophorèse (Colombo, 2005).

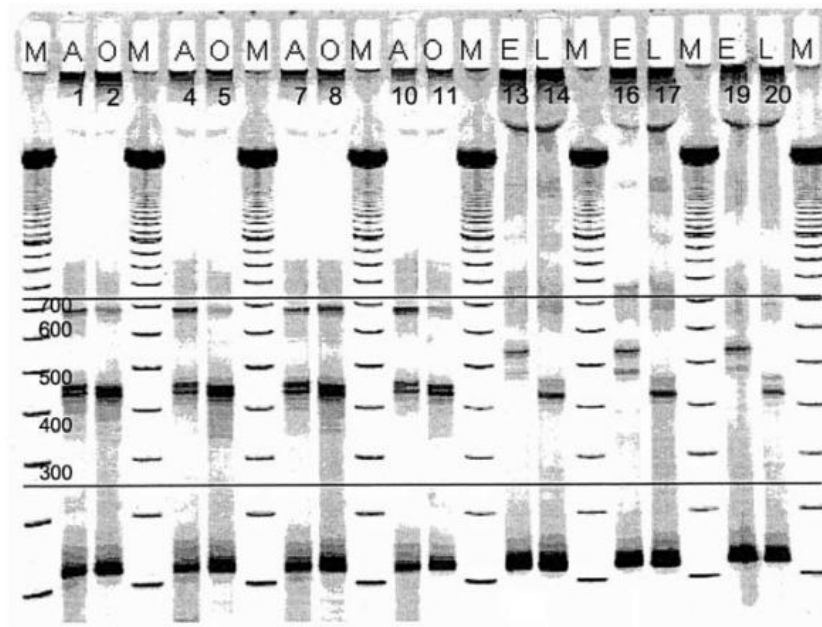


Figure II.24 : résultat de l'électrophorèse sur gel avec PCR-SSCP des espèces: albacares (lignes A 1, 4, 7, 10), *T. obesus* (lignes O 2, 5, 8, 11), *E. pelamis* (lignes E 13, 16, 19) and *T. alalunga* (lignes L 14, 17, 20), la zone significative est délimitée par deux lignes horizontale, M= Marqueur (Colombo, 2005)

Les espèces analysées ont été clairement différenciées et les lignes correspondantes aux mêmes espèces ont été regroupées correctement (Colombo, 2005).

La PCR-Séquençage

Une autre stratégie d'identification est l'association de la méthode de la PCR suivie d'une étape de séquençage. Le séquençage permet de déterminer l'ordre des nucléotides d'une séquence cible, cette séquence sera ensuite comparée à une base de données, tels que GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information) contenant des séquences de gènes référencées pour des espèces données.

Application PCR – Séquençage

Bartlett et Davidson, (1991) ont identifié le thon rouge (*T. thynnus*), le thon obèse (*T. albacares*), le thon albacore et le thon germon (*T. alalunga*) en 48 séquençant un fragment de 307 paires de bases du gène mitochondrial du cytochrome b. Bottero et al., (2007) ont développé une technique de mini séquençage d'un fragment de 132 pb du gène du cytochrome b pour différencier ces trois espèces de thon ainsi que l'espèce *K. pelamis* dans des produits appertisés et ont proposé une alternative à la technique de PCR-RFLP. Botti et Giuffra, (2010) ont montré la présence de substitution d'espèces et de mélanges d'espèces frauduleuses dans des conserves de thon et diverses préparations à base de thon en séquençant un fragment de 226 pb du gène du cytochrome b.

PCR en temps réel

La technologie de la PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice originale cible (template). Plusieurs instruments de PCR en temps réel sont présentement sur le marché. Ces appareils utilisent généralement un système en tubes fermés et la quantification ne requiert aucune manipulation post amplification, ce qui minimise ou élimine les problèmes de contamination par les amplicons suite à la réaction de PCR et réduit le temps d'analyse (Bustin, 2000). Le processus complet est donc automatisé du début à la fin rendant ainsi cette technologie intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle (high-throughput) (Martell et al, 1999) (Poitras et Houde, 2002).

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes (Poitras et Houde, 2002).

Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales : hydrolyse de sondes (Taqman assay), hybridation de 2 sondes (HybProbes), balises moléculaires (Molecular Beacons) et amorces scorpion (Scorpion primers) (Poitras et Houde, 2002).

1) Agents se liant à l'ADN double brin (Double-stranded DNA binding dyes: Lightcycler assay)

Les molécules qui se lient à l'ADN double brin peuvent être divisées en deux classes: les agents intercalants comme le bromure d'éthidium (Higuchi et al, 1992), le YO-PRO-1 (Ishiguro et al, 1995; Tseng et al, 1997), le SYBR Green I (Morrison et al, 1998) et les agents se fixant au sillon mineur (minor groove binders) comme le Hoeschst 33258 (Searle et Embrey, 1990; Nielsen, 1991). Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin. Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent rencontrer deux exigences : augmenter en fluorescence lorsque lié à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR (Poitras et Houde, 2002).

2) Les sondes fluorescentes

-Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)

Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (primer-dimers) (Poitras et Houde, 2002).

-Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)

Cette technologie est aussi connue sous le nom de HybProbes et repose sur l'utilisation de deux sondes linéaires complémentaires à une séquence cible pour maximiser la spécificité du signal (Wittwer et al, 1997). Cette technologie possède donc une grande spécificité et permet aussi une grande flexibilité dans le design des sondes. De plus, comme les sondes ne sont pas hydrolysées, elles sont réutilisées à chacun des cycles (Bustin, 2000) (Poitras et Houde, 2002).

-Balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux: Molecular Beacons)

Une balise moléculaire est une sonde d'hybridation d'ADN en forme d'épingle à cheveux

Le désavantage le plus important associé à l'utilisation des balises moléculaires est le design des sondes d'hybridation. Un design optimal du tronc des balises moléculaires est crucial (Poitras et Houde, 2002).

Plusieurs variantes de cette technologie comme les Sunrise primers (maintenant sous appellation commerciale Amplifluor™ hairpin primers) (Nazarenko et al, 1997; Myakishev et al, 2001), les cyclicons (Kandimalla et Agrawal, 2000) et les amorces scorpion (Mhlanga et Malmberg, 2001) ont été proposées pour la détection d'acides nucléiques spécifiques dans des solutions homogènes (Poitras et Houde, 2002).

-Amorces scorpion (Scorpion primer: self-fluorescing amplicon)

Al, 1999; Thelwell et al, 2000; Mackay et al, 2002). Thelwell et al (2000) rapportent que la technologie amorce/sonde scorpion est généralement plus efficace que les technologies Taqman et balises moléculaires, particulièrement dans un programme de PCR possédant des cycles très courts (Poitras et Houde, 2002).

-Cycle seuil (Threshold cycle)

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction (figure 9). Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Gibson et al, 1996). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs comme lors de la phase plateau ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif en le comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (Bustin, 2000) (Poitras et Houde, 2002).

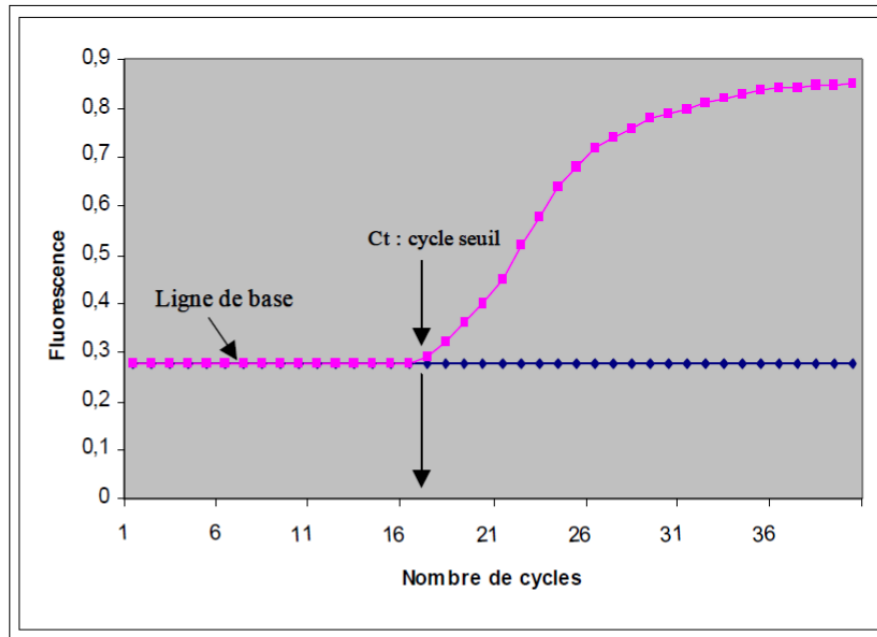


Figure II.25 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base (Poitras et Houde, 2002).

Selon la littérature, la technique la plus fréquemment utilisée jusqu'à maintenant est la technologie des sondes d'hydrolyse (Taqman assay) bien que sa popularité soit principalement due à sa maturité commerciale. Cette technologie s'est avérée plus efficace que celle des agents intercalants au niveau de la spécificité et du multiplex âge (Poitras et Houde, 2002).

Le développement des technologies de détection à base de balises moléculaires amène encore davantage de spécificité et de précision entre autre pour la détection des SNPs et des analyses de génotypage comparativement aux technologies basées sur les sondes linaires. La PCR en temps réel s'avère très intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle étant donné que le processus complet est automatisé du début à la fin (Poitras et Houde, 2002).

Application PCR en temps réel

La technique de PCR en temps réel a été utilisée pour l'identification des espèces de crevettes dans les produits de la mer transformés et conditionnés en Tunisie en 2015.

Une quantification efficace de l'ADN est effectuée grâce à la méthode par PCR en temps-réel (Juste et al.2008) qui est basée sur la détection et la quantification d'une molécule

fluorescente. Le signal fluorescent est directement proportionnel à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. La méthode de PCR en temps-réel a été effectuée en utilisant la technologie de fluorescence SYBR-Green I (BESBES et SADOK, 2015).

Le tableau présente un rendement élevé de l'ADN en termes de qualité et quantité pour tous les échantillons de crevette analysés à l'état frais et transformé. Afin de valider cette méthode de quantification, 15 échantillons de crevettes ont été quantifiés en utilisant la méthode de PCR en temps-réel. Tous les échantillons sont détectables (BESBES et SADOK, 2015).

Tableau II.6 : Résultats obtenus de rendement de l'ADN en termes de qualité et quantité pour tous les échantillons de crevette analysés.

Echantillons	Origine	Concentration ng/μl	A260/A280
<i>Penaeus kerathurus</i>	Tunisie	115.75	1.98
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Tunisie	113.63	1.85
<i>Metapenaeus monoceros</i>	Tunisie	114.85	1.65
<i>Plesiontka heterocarpus</i>	Tunisie	110.68	1.82
<i>Plesiontka edwardsii</i>	Tunisie	233.2	1.95
<i>Crevette royale surgelée</i>	Tunisie	286.55	2.10
<i>Chevrette surgelée</i>	Tunisie	122.81	1.88
<i>Crevette surgelée</i>	Tunisie	528.96	2.05
<i>Crevette décortiquée surgelée</i>	Tunisie	115.32	1.84
<i>Crevette culte</i>	Tunisie	143.79	1.79
<i>Crevette pané</i>	Tunisie	545.36	1.99
<i>Parapenaeus longirostris</i>	Sicile	123.2	1.97
<i>Crevette congelée</i>	Sicile	178.35	1.88
<i>Crevette décortiquée précuite et congelée</i>	Sicile	124.99	2.05
<i>Crevette décortiquée surgelée</i>	Sicile	254.32	2.07

Nous avons eu des amplifications PCR de crevette avec un Ct moyen de 33 (cycle seuil) et un Tm qui est de l'ordre de 72°C, un exemple de courbe d'amplification est donné dans la figure 1. L'analyse des résultats montre que les conditions d'amplification ont été optimisées pour ces deux couples d'amorces et nous avons ainsi réussi à amplifier les 15 espèces de crevettes (BESBES et SADOK, 2015).

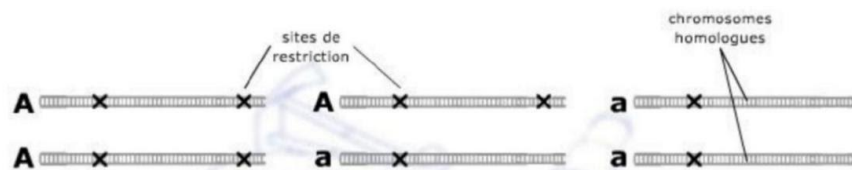
La PCR-RFLP

La technique PCR-RFLP est l'association entre les techniques d'amplification et d'observation de polymorphismes sur des fragments digérés par des enzymes de restriction. D'un point de vue technique, la méthode RFLP est utilisée pour refléter directement des variations dans la séquence primaire de l'ADN. Cette technique a permis d'observer de

nombreuses variations à différentes échelles taxonomiques de la population à l'espèce. Elle est facilitée par la possibilité d'obtenir un nombre considérable de copies d'une séquence cible d'ADN grâce à la technique de PCR.

Le produit PCR digéré par une (ou plusieurs) enzymes de restriction est simplement mis à migrer dans un gel d'agarose et le polymorphisme de la position et du nombre de bande est visualisé par une réaction colorée au Bromure d'ethyidium (Hubert, 2007).

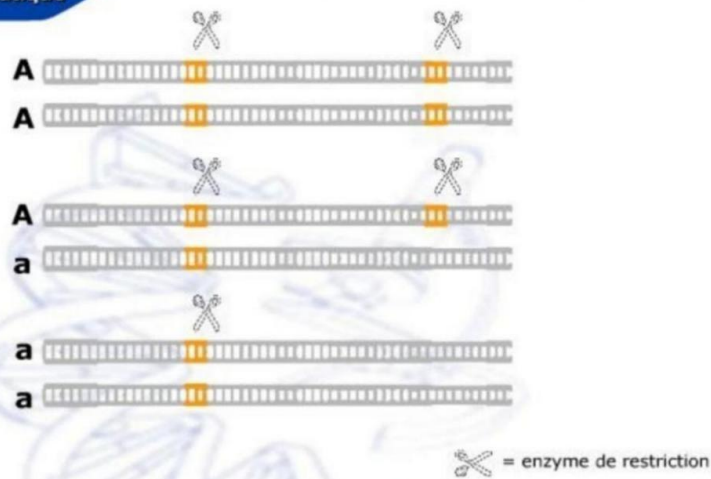
✓ **Principe de la technique PCR-RFLP**



RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
(Polymorphisme de longueur de fragment de restriction)

Après PCR, l'ADN amplifié est coupé par une ou plusieurs enzymes de restriction. Un polymorphisme de séquence au niveau des sites de coupure génère des fragments d'ADN différents en nombre et en taille, ce qui est révélé après électrophorèse.

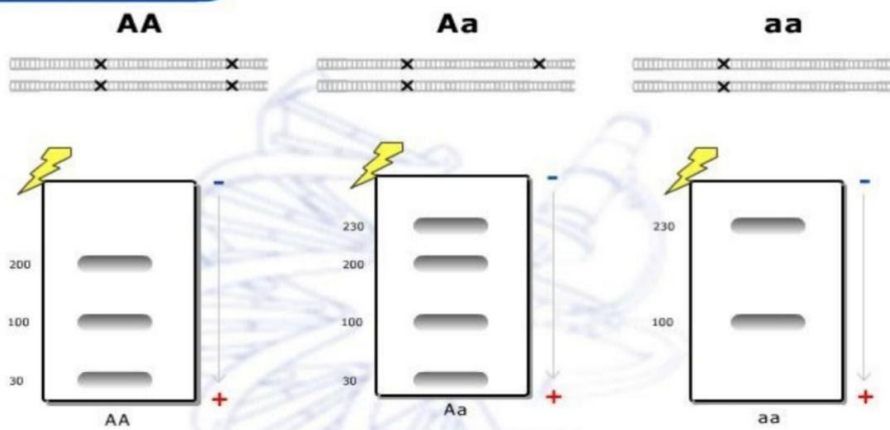
✓ **Principe de la technique PCR-RFLP**
Digestion enzymatique



✓ **Principe de la technique PCR-RFLP**
enzymatique



✓ **Principe de la technique PCR-RFLP**
Electrophorèse



✓ **Principe de la technique PCR-RFLP**
Electrophorèse

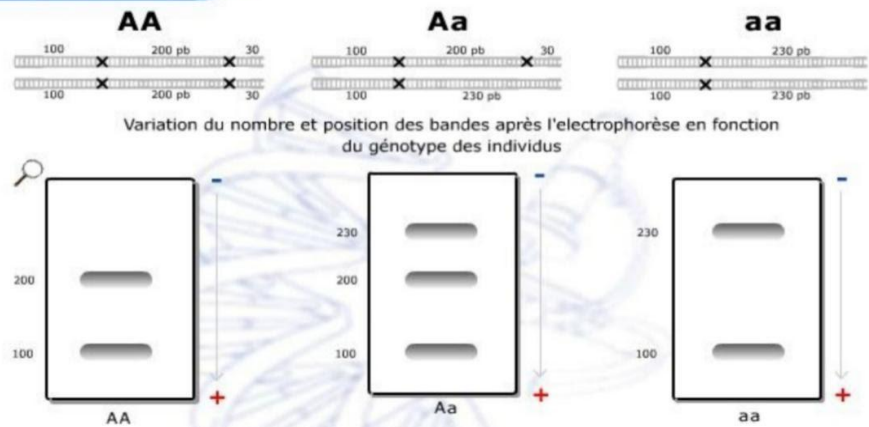


Figure II.26: Principe de technique PCR-RFLP
(<http://gen-net-pop.univ-lyon1.fr/cours/chap2/animation22.htm>)

Application de la PCR-RFLP

Le potentiel de cette technique a été mis en évidence pour l'identification des espèces de poisson en basant sur l'amplification d'une partie spécifique du génome mitochondrial (tRNAGlu/cytochrome b) Afin de distinguer entre diverses espèces, les longs fragments de 464 paires de bases obtenus par PCR sont coupés avec différentes endonucléases, ce qui donne des fragments de restriction spécifiques de l'espèce. Cette méthode est applicable pour distinguer, le saumon de l'Atlantique des diverses espèces de saumon du Pacifique (Wolf, et al., 2000).

Lin et Hwang ont utilisé cette technique pour identifier huit espèces de scombridés. Deux paires d'amorces ont été conçues pour amplifier 126 et 146 pb du gène du cytochrome b mitochondrial et cinq enzymes de restriction ont été déterminées pour analyser des fragments de courte longueur. La méthode a été appliquée avec succès à l'authentification des espèces dans 18 thons en conserve commerciale (Teletchea, 2009).

2.2.4. RFLP (Le polymorphisme de longueurs des fragments de restriction)

Le polymorphisme de longueur d'éclat de restriction (RFLP) est une technique inventée en 1984 par le scientifique anglais Alec Jeffreys pendant la recherche dans des maladies héréditaires. Il est employé pour l'analyse de seules configurations dans les fragments d'ADN afin de différencier génétiquement entre les organismes, ces configurations sont Variable Number appelé des séquences répétées en tandem (VNTRs) (Bakhti, 2011).

Cette technique a pour base l'utilisation des enzymes de restriction (endonucléase) sur des ADN en vue de détecter des séquences courtes spécifiques. Les fragments d'ADN obtenus sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et ensuite transférés sur une membrane selon la procédure de southern blot. La taille des fragments est déterminée par hybridation des membranes avec des sondes (fragment d'ADN) marquées. Les sondes peuvent être des séquences d'ADN courtes et simples, de faibles copies d'ADN génomique ou encore des clones d'ADN complémentaire (Bakhti, 2011).

Les mutations dans le génome entraînant la modification de certains sites de restriction d'où la génération de différents profils de restriction entre différents échantillon. Chaque fragment de taille différent engendré est considéré comme allèle et peut être utilisé en analyse génétique (Bakhti, 2011).

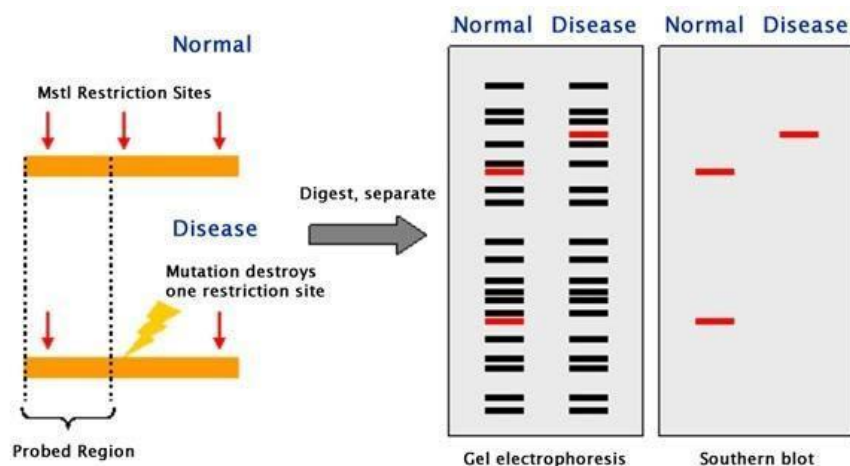


Figure II.27: Principe de la RELP (news- medical.net)

Application RFLP

Heist et al. (1996a) reprennent cette technique pour vérifier l'hypothèse selon laquelle les populations de juvéniles du Requin aiguille gussi (*Rhizoprionodon terraenova*) se divisent en deux zones de reproduction géographiquement voisines. L'analyse ne montre pas de différence génétique significative entre les individus, et renvoie à l'hypothèse nulle d'une unique population de juvéniles. Cette même équipe (Heist et al, 1996b), s'est ensuite penchée sur la structure génétique des populations de requins Mako (*Isurus Oxyrinchus*). En analysant les fragments obtenus à partir de cinq sites de capture répartis sur plusieurs océans, Heist et al. ont mis en évidence la présence d'un groupe génétiquement isolé en Atlantique Nord. Deux ans plus tard, Heist et Gold (1998) emploie à nouveau cette méthode comme outil de diagnose dans une problématique d'identification génétique des requins pêchés sur la côte Est américaine. Après avoir séquencé 400 paires de bases du Cytochrome b (ADN mitochondrial) de 11 espèces de Carcharhiniformes, ils ont isolé des sites de restriction spécifiques à chacune des espèces étudiées. Avec un pool de sept enzymes, il est alors possible d'identifier le requin à partir d'un simple fragment de tissu. Cependant l'article évoque des problèmes de variabilité intraspécifique des fragments de restriction pour le requin Tisserand (*Carcharhinus brevipinna*), on obtiendrait alors des résultats différents selon la localisation de la capture pour cette espèce. En outre, cette méthode ne s'applique qu'à 11 espèces, ce qui suggère une limite de ce test face à des espèces non étudiées mais pouvant être capturées.

2.2.5. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

L'amplification des ADN par des marqueurs RADP ou Random amplified polymorphism DNA (Williams et al, 1990 Welsh et Mac Clelland, 1991) constitue l'amplification de séquences sélectionnées au hasard dans le génome par l'utilisation d'amorces non spécifiques. Sa principale variante consiste à utiliser comme amorce un seul oligonucléotide d'une dizaine de bases qui permet d'amplifier par PCR un ou plusieurs segments d'ADN de l'échantillon. Chaque bande de l'amplifiât correspond à l'existence sur chacun des brins d'ADN d'un motif complémentaire à l'amorce.

Cette technique a l'avantage d'être rapide avec peu de mise au point et révèle un polymorphisme important mais ce marqueur est dominant et les conditions de PCR sont très sensibles (Hubert, 2007).

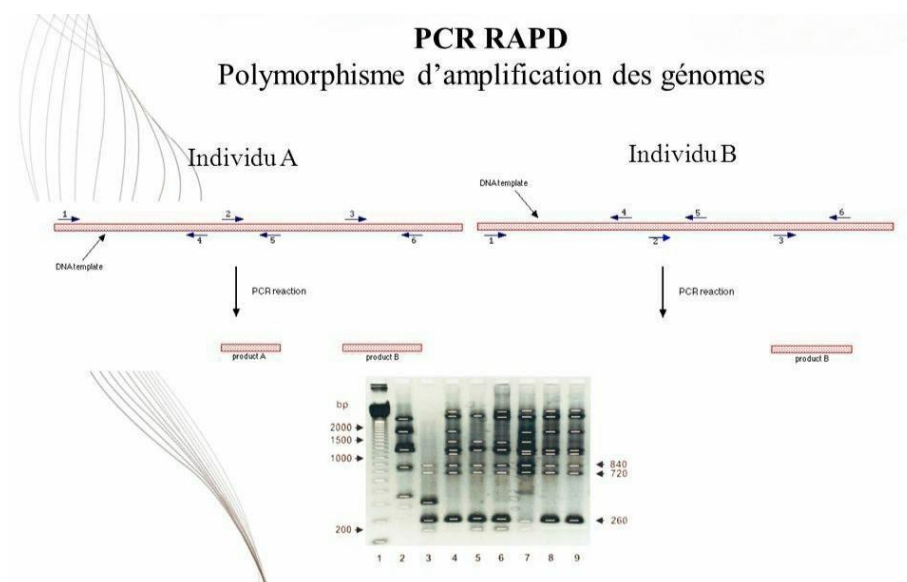


Figure II.28: Principe de la technique RAPD (Bertrand, 2009)

Application RAPD

L'analyse RAPD a fait l'objet d'une étude faite par (Chaoui, 2007) dans le cadre d'un projet de coopération franco-algérien (Accord-programme de coopération CMEP No 04 MDU 628), intitulé « Ichtyofaune côtière du golfe d'Annaba : diversité génétique et biologie halieutique » dont deux systèmes RAPD ont été utilisés pour comparer, des échantillons de daurades, marines et lagunaires, originaires du sud et du nord de la Méditerranée. Cette

démarche intégrée permet d'identifier les stocks au sens génétique pour une évaluation juste de la biomasse existante.

Deux amorces RAPD : A-01 (5_-AGGGGTCTTG-3_) et A-10 (5_GTGATCGCAG-3_), synthétisées par la société Operon Technologies Inc, ont été utilisées pour l'amplification.

La PCR est réalisée dans un volume réactionnel de 25 µl, contenant 5 µl d'extrait D'ADN, 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de chaque dNTP, 0,6 µM d'amorce, 0,15 mg/ml de bovin serum albumine (BSA), 0,1 U de Taq et 1X buffer (Promega Corp. Madison, WI). La PCR est réalisée dans un thermocycleur Gene Amp. ®PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Le programme d'amplification consiste en une dénaturation de 5 minutes à 94° C, puis en 44 cycles de dénaturation à 94° C (45 sec), une hybridation à 37° C (1 mn) et une polymérisation à 72° C (2 mn), suivis d'une phase d'élongation finale de 10 mn à 72° C.

Les produits d'amplification sont visualisés par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 2 %, coloré au bromure d'éthidium. La durée de migration est de 3 h à 100 V (Chaoui, 2007).

Les amorces RAPD utilisées ont produit des fragments ayant des tailles comprises entre 165 et 650 pb. Parmi les 29 bandes obtenues, 19 sont polymorphes, soient six pour l'amorce A-01 (A-01 380, A-01 460, A-01 550, A-01 600, A-01 630 et A-01 650) et treize pour l'amorce A-10 (A-10 165, A-10 180, A-10 220, A-10 280, A-10 340, A-10 380, A-10 435, A-10 480, A-10 490, A-10 530, A-10 560, A-10 580, A-10 600) (Chaoui, 2007).

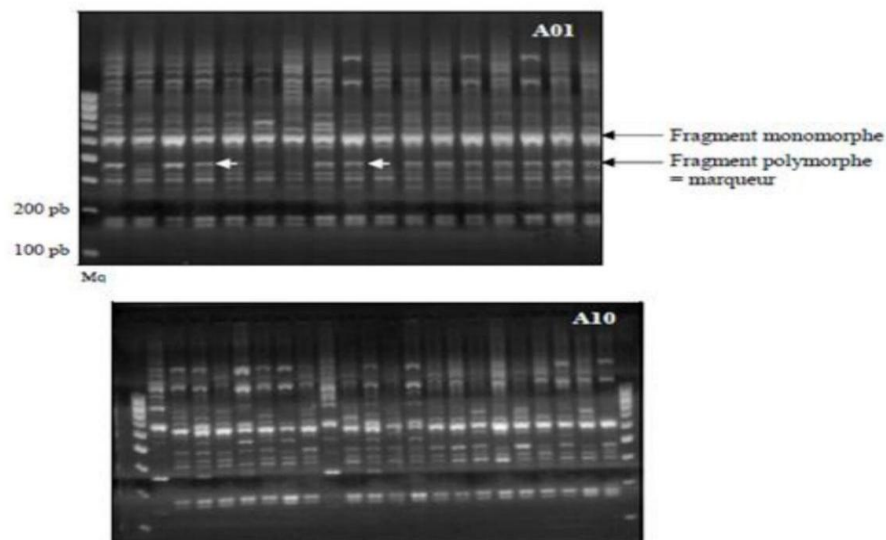


Figure II.29: Profils RAPD, après coloration au BET et électrophorèse sur gel d'agarose à 2 %, des produits d'amplification obtenus avec les amorces A01 et A10 (Mq: marqueur de taille, pb: paires de bases) (Chaoui, 2007).

En 2010 Lakraet *al*ont développé une Méthode de PCR RAPD pour détecter la variabilité génétique interspécifique et la parenté génétique entre cinq Sciaenidés Indiens.

Parmi les 50 amorces arbitraires testées, huit ont été sélectionnés sur la base de la reproductibilité et la résolution des profils de bandes dans les cinq espèces. Les huit amorces ont amplifié un total de 85 loci dans la gamme de taille de 40 à 4697 bp. Le nombre de bandes RAPD stables et claires générés par les amorces variait entre 9 et 12 (Teletchea, 2009).

2.2.6. AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism)

La technique AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) est une variante de la PCR développée par Vos et ses collaborateurs en 1995.

Cette technique est basée sur la détection par des amplifications sélectives de fragments d'ADN génomique digérés.

L'ADN est dans un premier temps digéré par deux enzymes de restriction coupant respectivement au niveau d'un site rare et d'un site fréquent. Puis des adaptateurs spécifiques des sites de restriction utilisés, sont fixés aux extrémités des fragments de restriction obtenus.

Les amplifications sont réalisées à l'aide d'amorce définies d'après la séquence des adaptateurs. Ces amorces portent sur leurs extrémités 3'-OH des extensions aléatoires de 1 à 3 bases permettant l'amplification sélective d'une partie seulement de la population des fragments de restriction. Une pré-amplification est réalisée en premier à l'aide d'amorces présentant une extension d'une base généralement (amorce+1). Le produit de cette pré-amplification sert de matrice pour l'amplification sélective à l'aide des amorces +3 (Tagu., et al. 2003).

Les produits d'amplification sélective sont ensuite séparés sur gel de polyacrylamide en condition dénaturantes. La détection des bandes d'AFLP est obtenue soit par coloration des gels à l'argent, soit par autoradiographie ou émission de fluorescence (Tagu., et al., 2003).

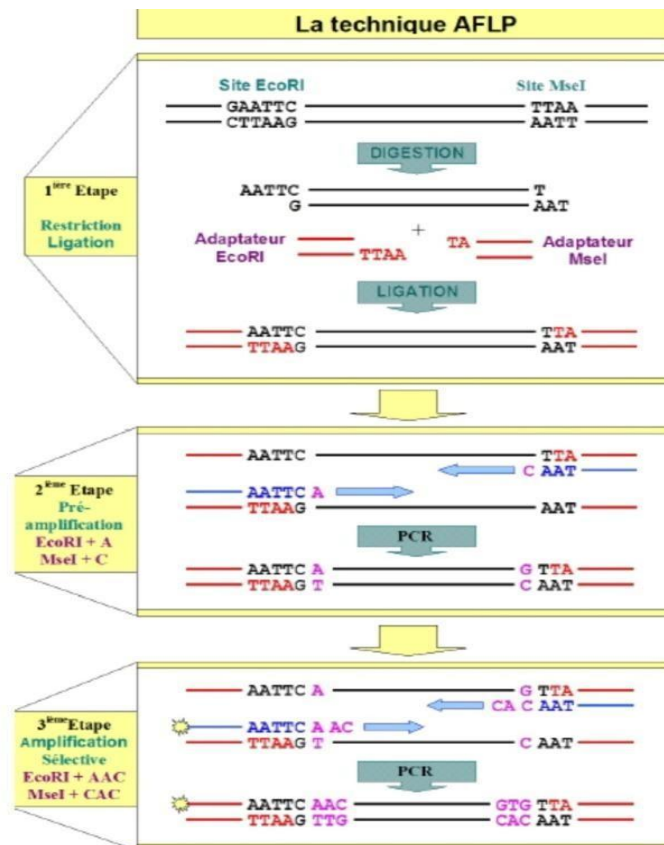


Figure II.30 : Les étapes de la technique AFLP (Arnaud, 2006).

Application AFLP

L'ADN est digéré par deux enzymes de restriction (étape 1) (fig.32) dont les sites de reconnaissance (gris foncé) sont respectivement rare (e.g, EcoRI) et fréquent (e.g, MseI). Des adaptateurs (gris clair) de séquence connue (en gras) et spécifiques de chacun des deux sites de restriction sont ensuite fixés aux extrémités cohésives des fragments de digestion par ligation (étape 2) (Ulrich G.Mueller L,LaReesa Wolfenbarger,1999).

L'utilisation d'un couple d'amorces (segments fléchés) complémentaires des adaptateurs et munies d'une base sélective en 3' permet l'amplification d'une première sous-population de fragments (étape 3) (Ulrich G.Mueller L,LaReesa Wolfenbarger,1999).

Le processus s'achève par une seconde étape d'amplification à l'aide d'amorces complétées en 3' par trois bases sélectives supplémentaires (étape4) (Ulrich G.Mueller L,LaReesa Wolfenbarger,1999).

La séparation des produits d'amplification en gel d'agarose ou le plus souvent en gel d'acrylamide génère enfin un profil multilocus, qui est spécifique pour chaque espèce (Ulrich G.Mueller L,LaReesa Wolfenbarger,1999).

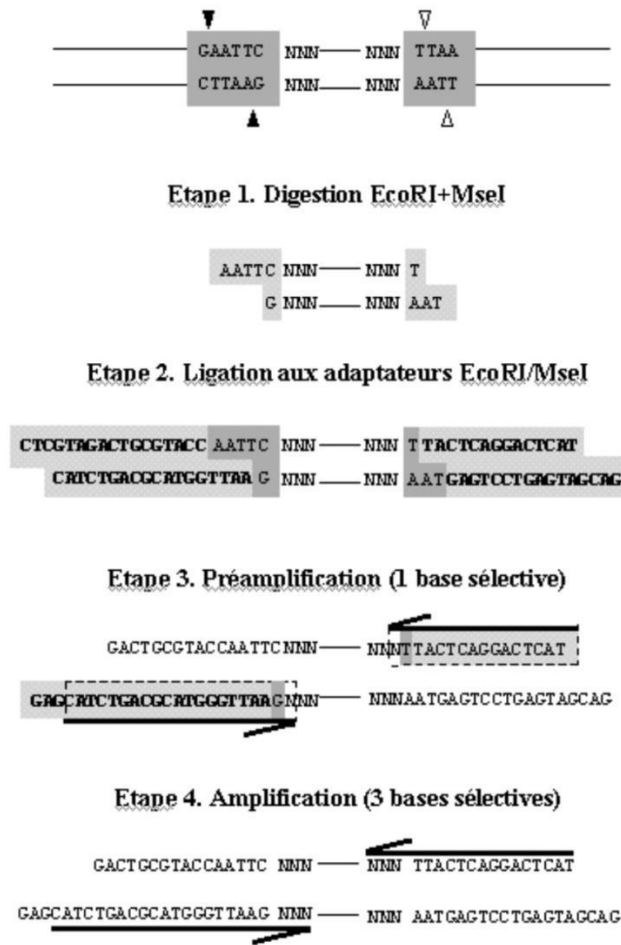


Figure II.31: Marqueurs AFLP. Principe de détection et source du polymorphisme (Ulrich G.Mueller L,LaReesa Wolfenbarger,1999).

2.2.7. Barcode moléculaire sur les espèces marines

En 2003 le professeur Paul Hebert et ses collaborateurs au service de l'Université de Guelph, Canada ont élaboré la technique de barcode.

Cette technique repose sur la notion de code-barres ADN (en anglais DNA-barcoding) : il s'agit d'obtenir des données génétiques standardisées à partir de spécimens référencés dans des collections et identifiés par des *taxonomistes*, pour identifier par la suite de façon fiable et rapide les espèces dont sont issus des individus prélevés dans leur environnement.

- Le choix du marqueur génétique

La principale difficulté d'un tel projet résidait dans le choix d'une séquence nucléotidique suffisamment conservée au niveau intra espèce, suffisamment divergente pour distinguer

deux espèces et suffisamment universelle pour 13 pouvoir être utilisée sur un large spectre d'organismes.

Le choix s'est porté sur un gène mitochondrial (aux dépens de l'ADN nucléaire) et plus particulièrement la partie 5' du gène mitochondrial codant pour la cytochrome oxydase I (COI) (658 paires de bases), a été choisie comme barcode moléculaire universel, qui fournit une forte résolution au niveau des espèces pour différents groupes notamment les poissons (Bhattacharjee, *et al.*, 2012) (Trivedi, *et al.*, 2014).

Cytochrome oxydase (COI), une protéine qui intervient dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie (cycle de Krebs). Elle est fortement conservée à travers les espèces qui emploient la phosphorylation oxydative dans leur métabolisme (Okassa, 2010).

Outre que la présence de ce gène chez toutes les espèces animales :

1. Le gène choisi est codant. Il n'y a donc pas d'introns. De plus, il y a peu de délétions et d'insertions. De ce fait, les problèmes d'alignements des séquences et les analogies sont limités.
2. Il existe plusieurs copies par cellule, ce qui facilite la phase d'amplification,
3. Le taux de mutation plus élevé de l'ADN mitochondrial comparativement à l'ADN nucléaire constitue un avantage à son utilisation comme marqueur moléculaire pour différencier des entités spécifiques (Brown, *et al* 1979).
4. Enfin, la transmission maternelle garantit l'absence de recombinaisons entre les chromosomes maternels et paternels, ce qui permet de retracer plus aisément l'histoire évolutive d'une lignée sans les «interférences» des recombinaisons.

- Principe

Le barcode se base sur une comparaison entre une séquence d'ADN avec d'autres séquences d'une base de données réalisé dans le cadre d'un projet internationale, le consortium pour le code-barre de la vie, (Okassa, 2010).

-Avantage

Le barcode est présenté comme une solution pour la délimitation : d'espèces cryptiques (organismes identiques morphologiquement mais présentant une divergence génétique importante (Bickford, *et al*, 2007) et pseudo-cryptiques (organismes avec une divergence génétique importante mais pouvant être distingués morphologiquement).

Ainsi, le barcode est devenu un outil de choix pour évaluer la biodiversité, permettant l'identification de spécimens en s'affranchissant des données morphologiques.

Cet outil permet ainsi l'identification d'individus quel que soit leur stade de développement (cycle de vie), ou leur état, qu'ils soient frais ou conservés avec une méthode de préservation ne dégradant pas complètement l'ADN.

Au delà de l'identification, cette technique peut être utilisée comme un outil d'authentification et d'évaluation des produits de la mer. Cette identification moléculaire peut même permettre de retracer l'origine de certains produits (Galimberti, *et al*, 2013).

-Méthode de détection de divergence entre les espèces

Beaucoup de technique sont utilisé pour quantifier les divergences entre plusieurs individus / populations / espèces on cite une des plus utilisé.

-La notion de seuil

La méthode la plus simple pour estimer une divergence génétique est de calculer le nombre de paires de bases différentes entre deux séquences.

Hebert et al en 2003 ont proposé de baser la délimitation des espèces sur les différences existant entre les distances génétiques intra et interspécifiques. Ils ont proposé un seuil de délimitation des espèces qui correspond à la distance génétique intraspécifique maximale (Hebert, *et al*, 2003).

En supposant que les patrons d'évolutions de l'ADN mitochondrial soient identiques dans tous les groupes taxonomiques (Grant, 1998).

Hebert et al ont proposé d'utiliser un seuil unique pour délimiter l'ensemble des espèces du vivant, la divergence génétique était beaucoup plus élevée entre des espèces différentes (distance interspécifique) qu'à l'intérieur d'une même espèce (distance intra-spécifique) (Moore, 1995) appelé aussi le « barcode gap » (figure 33).

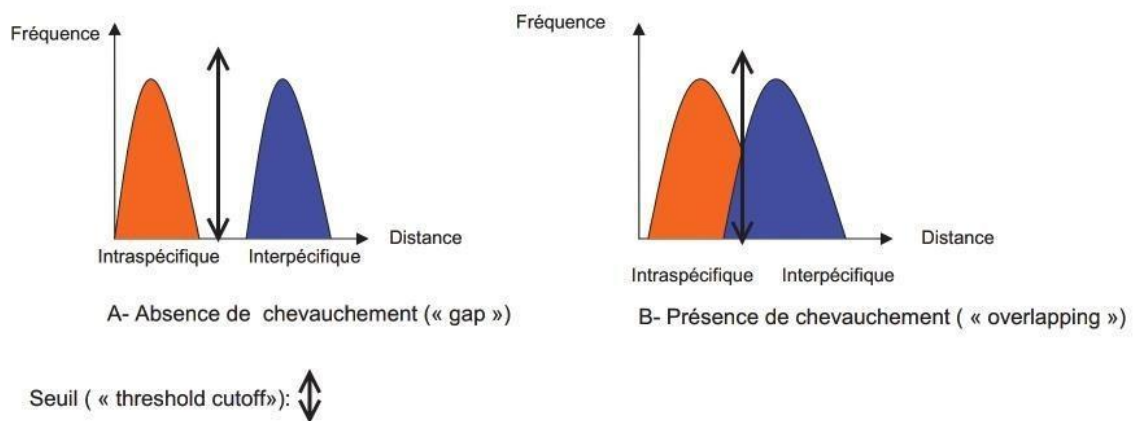


Figure II.32 : Schéma représentant les fréquences des distances génétiques à l'intérieur d'une espèce (intraspécifique) et entre des espèces (interspécifiques). Ces variations peuvent être chevauchantes (absence de « gap ») ou non chevauchantes (présence de « gap ») (Okassa, 2010).

Application de Barcode moléculaire pour l'identification des poissons

Une étude a été menée par Rasmussen en 2009, son but est d'examiner la capacité du codage à barres de l'ADN pour une identification fiable des espèces de saumon et de truite (genres *Oncorhynchus* et *Salmo*) commercialement importantes en Amérique du Nord.

L'ADN a été extrait d'échantillons tissulaires utilisant un protocole automatisé à base de silice, comme décrit dans (Ivanova, *et al*, 2006).

Après une amplification, les produits de la PCR ont été séparés sur gel d'agarose de 2%.

Les images ont été photographiées sous la lumière UV avec un AlphaImager 3400 imaging system, enfin les produits de la PCR ont été séquencés avec Big-DyeTerminator version 3.1.

Pour déterminer si les écarts de barcode (barcode gaps) sont présents entre les espèces de salmonidés examinées dans cette étude, les relations entre la divergence inter et intraspécifique ont été comparées pour chaque espèce.

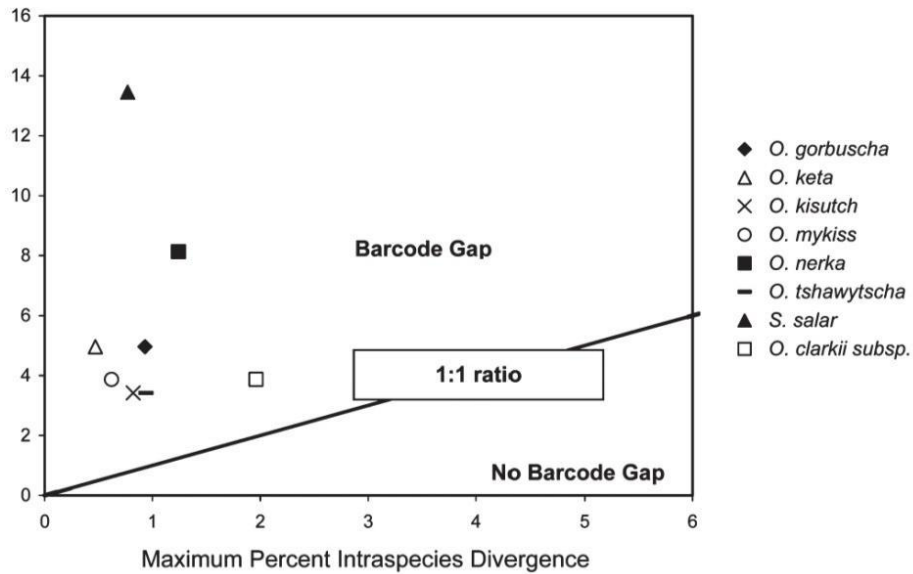


Figure II.33: Les écarts du barcoding les salmonidés.
(Rasmussen, 2009)

Une représentation graphique (figure 34) a été créée en traçant la divergence interspécifique minimale sur l'axe des ordonnées et le maximum intra-spécifique sur l'axe des abscisses. La ligne sur le graphique représente les cas d'un (1:1) ratio entre ces deux valeurs. Les points de données au-dessus de la ligne représentent l'espèce qui peut être différenciée par l'ADN barcoding, tandis que ceux qui sont au-dessous représentent l'espèce qui ne peut pas être différenciée par l'ADN barcoding moléculaire.

Comme indiqué dans la Figure, toutes les espèces de salmonidés examinés dans cette étude est tombée au-dessus de la ligne, indiquant qu'ils peuvent être différenciés utilisant des codes à barres d'ADN.

L'utilisation de séquences de code à barres plus courtes, "mini-barcodes", a été proposée comme un moyen qui permet une analyse d'ADN barcode des échantillons dégradés dans les produits fortement transformés (Hajibabaei, *et al*, 2006).

2.2.8. Séquençage de l'ADN

La description complète de génomes divers nous fournit non seulement une moisson considérable de gènes nouveaux, mais sans doute aussi le moyen d'approcher les séquences ou les motifs impliqués dans l'organisation à grande échelle des génomes sur lesquels nous ne savons encore pratiquement rien.

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer la séquence nucléotidique d'un gène ou d'un fragment de gène, ce procédé repose sur la synthèse d'un brin d'ADN par une ADN polymérase, il a été mis au point pour la première fois en 1977.

L'ADN à séquencer est appelé ADN matrice, il doit être obtenu sous forme purifiée et être homogène (il ne doit contenir que des molécules d'ADN ayant la même séquence). On utilise couramment comme matrice de l'ADN cloné ou produit par PCR. Cet ADN simple brin est obtenu par dénaturation de la matrice d'ADN double brin via un traitement thermique ou alcalin (WINTER P.C et al, 2000).

Pour le séquençage on utilise de nombreuses ADN polymérases: fragment de Klenow (une partie de l'ADN polymérase I d'*E. coli*), une ADN polymérase modifiée tirée du phage T appelée la séquenase et la Taq ADN polymérase qui est aussi utilisée en PCR.

Les étapes de séquençage

On prépare 4 milieux réactionnels différents. Tous contiennent: l'ADN matrice sous forme simple brin, de l'ADN polymérase, des amorces, les 4 désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP), souvent sont les briques nécessaires à la construction du nouvel ADN. Chacun contient un nucléotide modifié différent, appelé un didésoxyribonucléotide (ddNTP).

L'utilisation d'un ddNTP permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN de différentes tailles correspondant à l'emplacement d'un nucléotide donné.

Il y a 4 ddNTP qui correspondent aux 4 bases de l'ADN. Ils diffèrent des dNTP par l'absence de groupe hydroxyle sur le carbone 3' du sucre. Ils sont incorporés à l'ADN en croissance par la polymérase, mais cette absence de l'hydroxyle en 3' empêche de former un lien phosphodiester avec le nucléotide qui devrait être ajouté ensuite, ceci interdit de poursuivre l'élongation du polynucléotide d'ADN en cours de synthèse.

Les ddNTP jouent ainsi le rôle d'inhibiteurs de la synthèse de l'ADN.

Chacun des 4 milieux réactionnels préparés pour le séquençage contient un ddNTP différent. Suivant le ddNTP qui est présent, la synthèse se termine à l'endroit où ce nucléotide modifié est incorporé.

À tout moment, durant la synthèse d'ADN, la polymérase peut incorporer à la chaîne en élongation soit un dNTP soit un ddNTP.

Dans le premier cas, la synthèse continue tandis que dans le second, la synthèse s'achève en cette position.

L'effet global est que dans chacune des quatre préparations, est produite une série de molécules de l'ADN de différentes longueurs qui se terminent en une position où dans la matrice est présenté la base complémentaire de celle dont la forme dd est présentée dans le milieu réactionnel considéré.

Par exemple, dans la préparation contenant du ddATP, est produite une série de molécules d'ADN qui se terminent toutes par un A correspondant à un T dans la matrice.

A l'issue de la réaction de séquençage, les molécules d'ADN synthétisées sont séparées suivant leurs tailles par électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec les 4 préparations versées sur 4 lignes parallèles du gel. Si on ajoute des dNTP contenant du phosphore ou du soufre radioactif dans les préparations de séquençage, les ADN synthétisés deviennent radioactifs, ce qui permet de les détecter en plaçant le gel de polyacrylamide contre une feuille de film sensible aux rayons X. Ceci s'appelle de l'autoradiographie.

C'est plutôt dans le cas de southern blot Lorsque'on développe le film, on peut observer une série de bandes dans chacune des lignes de gel. La séquence de l'ADN matrice peut alors être déterminée en identifiant les plus petites bandes et les bandes de plus en plus grosses et en associant la ligne dans le gel à la base terminale.

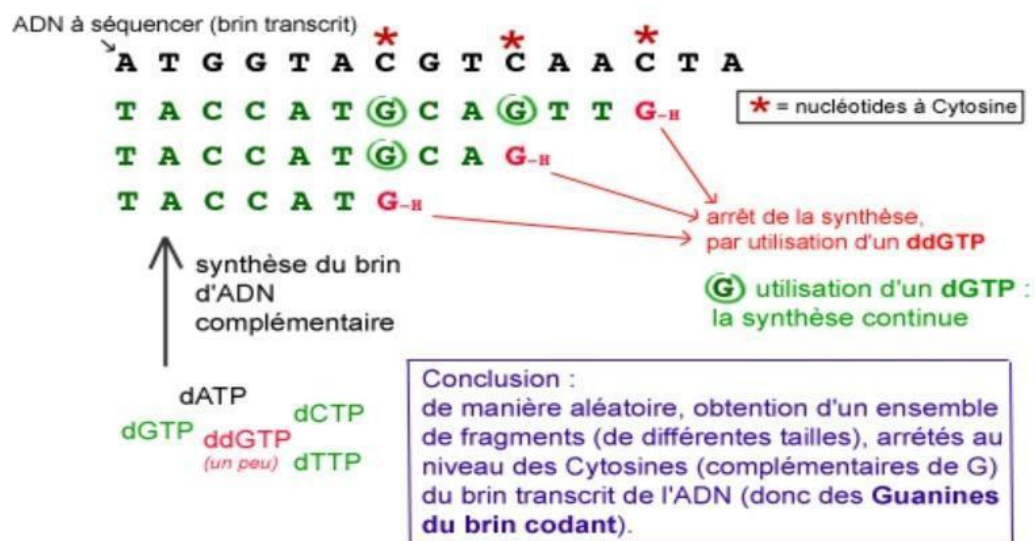


Figure II.34 : Séquençage de l'ADN (Gilles Furelaud 2014)

Il ne reste plus qu'à "lire" la séquence: on fait migrer tous ces fragments sur un gel afin de les séparer selon leur taille. Au niveau d'une "ligne" du gel correspond une taille (précise au nucléotide près) du fragment d'ADN. Afin de lire les quatre nucléotides de l'ADN, on fait migrer séparément les fragments issus des quatre mélanges réactionnels (à ddATP, à ddCTP, à ddGTP et à ddTTP) (figure 35).

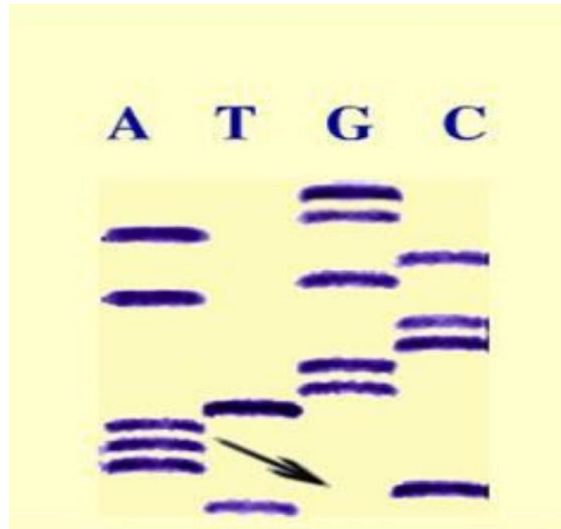


Figure II.35: Le gel de migration est composé de 4 pistes, chacune d'elles est attribuée à la lecture d'un nucléotide: A: adénine; T: thymine; G: guanine; C: cytosine. (Gilles Furelaud 2014)

La lecture s'effectue horizontalement de bas en haut en notant chacune des bandes

On commence la lecture depuis la bande la plus rapide (en bas) jusqu'à celle la plus retardée (en haut), on a obtenu la séquence (TCAAATGGCCAGCAGG), alors la séquence recherchée est celle qui en est complémentaire et lue dans le sens inverse donc c'est: (AGTTTACCGGTCGTCC) (Gilles Furelaud 2014).

Application de séquençage pour l'identification des poissons

L'application du séquençage peut montrer la différence des séquences de nucléotides entre les espèces de poissons, ou même peut montrer l'impact de mutations sur la variation génétique entre individus. (Figure 36) (Viricel et Pante, 2007)

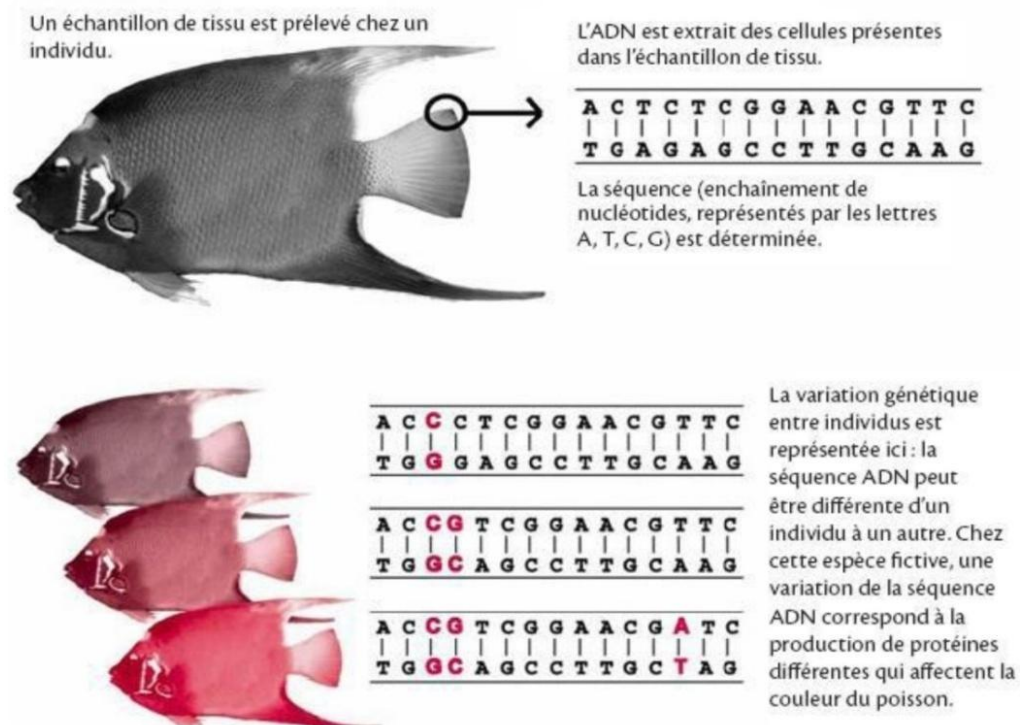


Figure II.36 : Exemple de la variation génétique d'un poisson à l'autre, obtenu par séquençage. (Viricel et Pante, 2007)

Discussion

Discussion

Une des voies les plus prometteuses pour l'identification des espèces de poissons consiste en la recherche d'association entre marqueurs génétiques et traits phénotypiques quantitatifs.

Il est à prévoir que de plus amples recherches dans ce domaine pourront mener au développement de marqueurs génétiques associés à des propriétés de production, ce qui serait d'un grand intérêt dans les programmes de sélection ou d'ensemencement. En fait, l'analyse de l'ADN par PCR et séquençage ouvre la voie à l'étude génétique de spécimens, populations extirpées ou espèces éteintes, préservés depuis des décennies. Dans le cas d'une détermination d'espèce, après l'extraction d'ADN, le gène d'intérêt va être amplifié par PCR, en général, à ce stade, une électrophorèse (séparation de fragments d'ADN selon la taille) ne nous permettra pas de différencier les espèces car la plupart d'entre elles possèdent une longueur identique de séquence du gène étudié. Par contre, il existe des variations dans l'agencement ou l'ordre des nucléotides. Ce sont ces différences qui permettent de distinguer les espèces. Pour cela d'autres techniques sont utilisées telles que: La RFLP nécessitant une grande quantité d'ADN de bonne qualité pour être utilisée. Elle a été supplantée par la méthode PCR mais l'inconvénient principal de cette méthode est que les tailles exactes des bandes sont inconnues et la comparaison à une échelle de poids moléculaire est purement qualitative. Quoique l'analyse de l'ADN mitochondrial par enzyme de restriction ait ouvert des nouvelles voies à l'étude génétique des populations, cette approche présente certaines limitations dans son utilisation reliée à la gestion des pêches. Notamment, elle ne permet pas de détecter le maximum de variation parce qu'un seul événement mutationnel entraînant la perte d'un site de restriction pourra être détecté alors que plusieurs sont possibles. De plus, l'analyse par enzyme de restriction donne une valeur moyenne de la variation sur l'ensemble du génome mitochondrial et ne permet donc pas de concentrer l'analyse sur certaines portions potentiellement plus variables de la molécule. D'un point de vue pratique, ce type d'analyse requiert une quantité relativement importante de tissu prélevée par individu, préservé dans d'excellentes conditions, soit à l'état frais pour un maximum de quelques jours, ou congelé à ultra-basse température.

L'AmFLP est plus rapide que l'analyse RFLP, elle a une bonne reproductibilité (due à l'utilisation de sites de restriction), une bonne discrimination, et elle ne nécessite pas de matériel particulier, mais c'est une technique chère et n'a pas de standardisation concernant l'interprétation des profils ;

Dans de nombreux cas, les organismes marins et en particulier leurs divers stades de développement sont difficiles à identifier par des caractères morphologiques. Les méthodes d'identification basées sur l'ADN offrent un ajout puissant d'un point de vue analytique, voire une alternative. Celles-ci varient dans leur gamme d'applications, leur complexité et leurs coûts.

L'utilisation de techniques basées sur la PCR a été étudiée car elles sont fiables, reproductibles et peu coûteuses et elles permettent la construction de banques de données mondiales.

Ce travail vise à fournir une vue d'ensemble mise à jour et complète sur les méthodes PCR, pour l'identification des espèces de poissons. Parmi les dix principales méthodes développées, trois amorces PCR-RFLP, PCR-FINS et PCR spécifiques ont été les plus utilisées. Deux autres méthodes émergentes, à savoir la PCR en temps réel et la technologie des puces à ADN, offrent respectivement un nouveau potentiel pour la quantification de l'ADN la détection simultanée de nombreuses espèces.

Des techniques telles que FINS (séquençage nucléotidique à caractère informatif), RFLP (polymorphisme de longueur de fragment de restriction), SSCP (polymorphisme conformationnel simple brin), RAPD (ADN polymorphe amplifié) et AFLP (polymorphisme de longueur de fragment amplifié) toutes peuvent contribuer à l'établissement de méthodes d'authentification.

La barcode moléculaire reste la plus simple technique pour identifier une espèce en utilisant seulement la séquence du fragment d'ADN correspondant et qui est spécifique pour chaque espèce.

Tableau 7: Tableau comparatif des techniques moléculaires appliqué dans l'identification des poissons.

Techniques	Avantages	Inconvénients
PCR	<ul style="list-style-type: none"> •Méthode simple •Permet l'analyse d'échantillons traités. •Des résultats reproductibles, sensibles et spécifiques. 	<ul style="list-style-type: none"> •Le coût élevé de la Taqpolymérase. • réaction pouvant être inhibée par des impuretés dans les extraits d'ADN.
PCR en temps réel	<ul style="list-style-type: none"> •Rapide plusieurs méthodes de détection disponible. •Produit des résultats quantitatifs. • Des résultats reproductibles, sensibles et spécifiques. 	<ul style="list-style-type: none"> • La sensibilité aux inhibiteurs • Détecte une seule espèce pré –spécifié. • Chère lors de l'examen de plusieurs espèces de poissons (Nécessite 1 analyse par espèce).
PCR multiplex	<ul style="list-style-type: none"> • Permet l'analyse de mélange. • La réduction du coût et la diminution du temps de réalisation et d'analyse des résultats. 	<ul style="list-style-type: none"> •Risque de compétitions entre les amorces. • Mise au point compliquée.
PCR-RFLP	<ul style="list-style-type: none"> •Permet l'analyse de mélange. • Permet l'analyse d'échantillons traités. •Des résultats reproductibles, sensibles et spécifiques. 	<ul style="list-style-type: none"> • Des mutations ponctuelles peuvent induire des faux positifs ou négatifs. • Sans l'automatisation, l'analyse prend du temps.

RAPD	<ul style="list-style-type: none"> • Ne requiert qu'une quantité infime d'ADN source • Ne nécessite pas de connaissances initial sur le génome sujet à l'analyse • Comporte un niveau d'expertise technique beaucoup moins complexe et, conséquemment, moins coûteux. 	<ul style="list-style-type: none"> • Conditions de PCR sont très sensibles.
AFL P	<ul style="list-style-type: none"> •reproductibilité, résolution et sensibilité élevée au niveau l'ensemble du génome. • Ne nécessite pas de connaissances initial sur le génome sujet à l'analyse. 	<ul style="list-style-type: none"> •Une technique chère et n'a pas de standardisation concernant l'interprétation des profils.
Séquençage	<ul style="list-style-type: none"> • approche exhaustive Aucune connaissance préalable requise • Fournit des informations de haute qualité. • Des résultats reproductibles et spécifiques. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ne permet pas l'analyse mélange. • Les coûts élevés d'analyse peu compatible avec l'analyse d'un grand nombre d'individus d'une population.
Barcode moléculaire	<ul style="list-style-type: none"> •Identification possible quelque soit le stade de développement. •Une séquence de gène unique est suffisante pour différencier la totalité des espèces. 	<ul style="list-style-type: none"> •Une faible résolution pour les espèces récemment divergés et les espèces hybrides. •La présence de pseudo gènes Utilisation inappropriée des seuils de distance fixés.

Conclusion et perspectives

Conclusion et Perspectives

l'utilisation de marqueurs génétiques a permis de découvrir de nouvelles espèces, de mieux comprendre les liens généalogiques entre organismes, de fournir des explications sur les mécanismes qui sont à la source de la diversification du vivant et de définir des stocks d'espèces menacées pour mieux les protéger.

La puissance et la robustesse des études basées sur des données génétiques ne rendent pas archaïque les outils plus traditionnels de la biologie, comme la physiologie, la taxonomie, l'écologie ou l'étude du comportement, au contraire, la génétique et la biologie moléculaire complètent les connaissances traditionnelles et nous apportent des notions précises sur l'évolution et le fonctionnement de la nature.

Le développement des techniques de biologie moléculaire améliore de plus en plus l'étude de variation génétique chez les espèces de poissons, sur de différents plans : les relations interspécifiques, les différences individuelles, l'identification et la caractérisation des populations dans le cadre de la préservation à long terme ou l'utilisation optimale de la ressource.

D'une part, une technique utilisée pour identifier un poisson est choisit en fonction de l'origine du matériel sur lequel on travaille, de l'objectif à atteindre et de l'échelle du programme à mener.

D'autre part, une meilleure méthode doit être facile, fiable, et couvre les besoins de nombreux domaines qui exigent l'identification rapide et peu couteuse d'espèces, notamment les pêches, l'aquaculture.

Les techniques elles-mêmes évoluent très vite, et certaines de celles qui ont été présentées dans ce travail ne seront sans doute plus utilisées que de manière ponctuelle dans quelques années.

En conclusion, les énormes progrès de la biologie moléculaire au cours des 10 dernières années ont rendu possible l'étude de l'ADN à partir de pratiquement tous les substrats, offrant de nouvelles perspectives pour le développement de diverses applications, qui continueront probablement à augmenter à l'avenir.

Références Bibliographiques

Références Bibliographique

ALEXIA O., CAROLINE T., et CHRISTIAN R., 2013. Miniaturisation pour l'analyse, la synthèse et la protéomique (MSAP), *USR CNRS 3290, Université de Lille I Sciences et technologies, Villeneuve d'Ascq.*

ALLAIN G., 2009. Identification d'oeufs de poissons (motelles) de la Manche et du sud de la Mer du Nord par biologie moléculaire.

AMRANI A., 2019. Cours électrophorèse. [En ligne]. Adresse URL : <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/BA/2019/electrophorese.pdf>.

AOUF A., 2015. Cours de biologie moléculaire et génie génétique. *Université Ferhat Abbas Sétif I. Algérie.*

AUDREY R., 2017. Caractérisation d'aptamères par électrophorèse capillaire couplée au séquençage haut débit Illumina. Chimie organique. *Université Paul Sabatier - Toulouse III.*

BOUDJEBIEUR A., 2018. Mise au point d'une technique de dosage de l'activité des enzymes du stress oxydatif chez la moule *Perna perna* (Linnaeus 1758). *Mémoire de Magister, Enssmal., Daley Brahim., Algérie.*

BAKHTI A., 2011. Recherche d'un polymorphisme de marqueurs microsatellites chez différentes espèces de plantes : cas des espèces annuelles de mebigu. *Thèse de magister. Sciences de la nature et de la vie. Oran: Université d'Oran, p. 23-29.*

BARTLETT S. E., et DAVIDSON W. S., 1992. FINS (forensically informative nucleotide sequencing): a procedure for identifying the animal origin of biological specimens. *BioTechniques 12, 3, pp 408-11.*

BEGG, G.A. et WALDMAN, J.R., 1999. An holistic approach to fish stock identification. *Fisheries research. Vol. 43, n° 1, p. 35-44.*

BELARBI-AMAR N., 2019. Introduction à l'étude de la génétique. *Université Oran I Ahmed Benbella, Faculté de Médecine, Département de médecine, Service d'Histologie-Embryologie. Algérie.*

BENDADECHE F., 2012. Empreinte protéique et génétique d'espèce de poissons de consommation: approche analytique. *Thèse de magister. Biotechnologie. Oran : Université d'Oran, p. 33-35.*

BERNATCHEZ L., 1994. Technique de biologie moléculaire comme outil de gestion des pêches : bilan et perspectives. *Bull. Fr. Pêchepiscic. Vol. 332, p. 4-7.*

BHATTACHARJEE et al ., 2012. Identification and re-evaluation of freshwater catfishes through DNA barcoding. *Plos one. Vol. 7, n° 11, p. 1-5.*

BICKFORD, D., LOHMAN, D.J., MEIER, R., et al ., 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*. Vol. 22, p. 148-155.

BOOKE, H.E., 1999. The stock concept revisited: perspectives on its history in fisheries. *Fish. Res.* Vol. 43, p. 9-11.

BOUHADAD, R. (1998). Génétique des populations de barbeau (Genre Barbus ; poissons Cyprinidae) des oueds algériens. *Thèse de doctorat. Eco-éthologie génétique des populations*. Alger : USTHB, p. 158.

BODY A., et MASSE H., 1979. Quelques paramètres permettant de suivre la production organique d'un Mollusque Bivalve au cours d'un cycle saisonnier. *Publ. Sci. Tech. CNEXO, Actes Coll. 7*, pp. 753-766.

BROWN, W.M., GEORGE, M.Jr., et WILSON, A.C., 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA: proceedings of the national. *Academy of science of USA*. Vol. 76, n^o 4, p. 1967-1971.

CARVALHO, G.R., et HAUSER, L., 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* Vol. 4, n^o 3, p. 326-350.

CHAOUI, L., 2007. L'ichtyofaune de la lagune du MELLAH. Biologie, génétique et exploitation de la daurade Sparusaurata(L., 1758). *Thèse de doctorat. Biologie et génétique des populations*. Annaba : Université d'AnnabaBadji Mokhtar, p. 75-92.

CHAKOUR S., et DJADJA M., 2015. Contribution à la différenciation morphométrique et génétique et carassins communs (carassius carassius). *Mémoire de Magistar. ENSSMAL. Daley Brahim, Algérie*.

CHIKHI, L., 1995. Différenciation génétique chez sardinellaaurita st S madernsis : alloenzymes et ADN mitochondrial. *Thèse de doctorat. Génétique*. Paris : Université de Pierre et Marie Curie, p. 8-10.

CHLAIDA, M., 2009.Variabilite allozymique associee au flux migratoire des populations de sardine, (sardina pilchardus), le long de la cotenord ouest africaine. *Thèse de doctorat. Biologie*. Rabat : Université Mohammed v – Agdal faculté des sciences, p. 14-26.

CHARLES G., et BENEDICT C., 2003. Spéciation des requins : Approches moléculaires et application à la traçabilité du commerce des ailerons. *Thèse de Magister. Science vétérinaire. Université Paul-Sabatier de Toulouse, juin 2003*.

CROW, J.F., et KIMURA, M., 1970. An introduction to population genetics theory. *New York: Harper and Row*. p. 591.

CPRNETTE F., et LAPEGUE S., 2014. Des marqueurs génétiques pour caractériser les populations sauvages ou d'élevage de mollusques ou de poissons. *Rencontres Scientifiques du Département RBE, 9-10 décembre 2014, Nantes, France*.

DALINE B., 2017. Développement d'une méthodologie de PCR en temps réel pour l'identification et la quantification de trois espèces de thon (Thunnus obesus, Thunnus albacares Et Katsuwonus pelamis) dans les produits appertisés. *Sciences et techniques des pêches. Université du Littoral Côte d'Opale.*

DESROCHES, J.-F., 2010. Clé d'identification pratique des poissons d'eau douce du Québec. Cégep de Sherbrooke, 80 pages.

DE WOODY, J.A., et AVISE, J.C., 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J fish biol.* Vol. 56, n° 3, p. 461-473.

DIDIERLAURENT Sylvie, MÜLLER Yves in : DORIS, 12/02/2021 : Mytilus galloprovincialis Lamarck, 1819. [En ligne]. Adresse URL : <https://doris.ffesm.fr/ref/specie/2527>

EHRICH, D., et STENSETH, N.C., 2001. Genetic structure of Siberian lemmings (Lemmus sibiricus) in a continuous habitat: large patches rather than isolation by distance. *Heredity.* Vol. 86, n° 6, p. 716-730.

ELYSE P., et ALAIN H., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology By The Moroccan Society of Biology in Canada.* Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11.

ELIAS, M., et CONDAMINE, F.L., 2014. Découverte et analyse de la biodiversité : les moyens actuels. *Mémoires de la SEF.* n° 9, p. 23.

GALIMBERTI, A., MATTIA, De. F., et LOSA, A., 2013. DNA barcoding as a new tool for food trace ability. *Food res. Int.* Vol. 50, n° 1, p. 55-63.

GILLE F. (Article publié le 1 Mai 2014). Le séquençage d'ADN. [En ligne]. Adresse URL : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/manipulations-en-laboratoire/le-sequençage-d-un-adn>.

GOURENE, G., et TEUGELS, G.G., 1993. Différenciation morphologique de souches des tilapias *Oreochromis niloticus* et *O. aureus* (teleostei: cichlidae) utilisées en pisciculture. *Cybium.* Vol. 17, n° 4, p. 334-355.

GRANT, W.S., et BOWEN, B.W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of heredity.* Vol. 89, n° 5, p. 415-427.

GUILLAUME B., 2007. Détection et identification des électroprotéines par électrophorèse sur gel associée aux spectrométries de masse atomique et moléculaire. Chimie analytique. *Université de Pau et des Pays de l'Adour.*

HAJIBABAEI, M., SMITH, M.A., JANZEN, D.H., et al ., 2006. Minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecolnotes* . Vol. 6, n° 4, p. 959–964.

HARTMUT R., 1999.Species identification of cooked fish by urea isoelectric focusing and sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis.*Food Chemistry* 67: a collaborative study.

HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., et al., 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the royal society of London biologicala sciences*. Vol. 270, n° 1512, p. 313-321.

HOUSSET, C., et RAISONNIER, A., 2009. biologie moléculaire. *Faculté de médecine Université Pierre et Marie Curie. Paris*. p. 2-6.

HUBERT, V.F., 2007. Diversité génétique et adaptation des espèces aquatiques en milieu anthropisé. *Nantes : Ifremer*. p. 14-22.

INNIS, M.A., MYAMBO, K.B., GELFAND, D.H., et al. (1988). DNA sequencing with Thermusaquaticus DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the national academy of science US*. Vol. 85, n° 24, p. 9436-9440.

JIN, L., et CHAKRABORTY, R., 1995. Population structure, stepwise mutations, heterozygote deficiency and their implications in DNA forensics. *Heredity*. Vol.74, n° 3, p. 274-285.

KAPLAN, J.C., et DELPECH, M., 1993. Biologie moléculaire et médecine. 2° éd. *Paris : Médecine sciences, Flammarion*. 600 p.

KHAZAAL, G., NOUN, N., SOLAH, H., et al., 2005.Contribution à la caractérisation systématique et génétique des poissons. Thèse de master. Biologie animale. *Liban : Université libanaise, faculté des sciences, département de biologie*. p. 6-35.

Kochzius, M., Nölte, M., Weber, H. et al., 2008. Puces à ADN pour l'identification des poissons. *Mar Biotechnol* 10,207-217.

LAKRA, W.S., VERMA, W.S., GOSWAMI, M., 2010. DNA barcoding Indian marine fishes. *Mol ecolresour*. Vol. 11, n° 1, p. 60–71.

LEMAIRE, C., ALLEGRUCCI, G., NACIRI, M., et al., 2000. Do discrepancies between microsatellite and allozyme variation reveal differential selection between sea and lagoon in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Molecular ecology*. Vol. 9, p. 457-467.

LELIEVRE S., 2010. Identification and characterisation of winter spawning ground in the English Channel and Southern North Sea. [En ligne]. *PhD Thesis, Université de Nantes*. Adresse URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00043/15398/>.

LELIEVRE S., VAZ S., et MARTIN Cs., 2008. ISADO - Identification des frayères du Déroit du Pas-De-Calais et des zones marines adjacentes. [En ligne]. Adresse URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/3831/>.

MACKIE, I. M., PRYDE, S. E., GONZALES-SOTELO, C., et al 1999. Challenges in the identification of species of canned fish. *Trends Food Sci. Technol.* 10, 1, pp 9-14.

MOHAMME N., 2010. Etude comparative de l'électrophorèse sur gel et l'électrophorèse sur l'automate capillars. *Mémoire de Magister Ecole supérieur des sciences et techniques de la santé de Monastir. Tunisie.*

Morel M., 1974. Identification des espèces de poissons par électrophorèse des protéines du muscle. [En ligne]. *Science et Pêche*, 234, 1-16. Address URL: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/7099/>.

MOORE, W.S., 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. *Evolution.* Vol. 49, p. 718 726.

NADIA B., STEFANO R., SALOUA S., 2015. PCR-REAL TIME POUR IDENTIFIER LES ESPECES DE CREVETTES DANS LESPRODUITS TRANSFORMES. *Laboratoire de Biodiversité et Biotechnologie marines, INSTM, centre La Goulette, Port de Pêche 2060, Institut Zooprofilattico sperimentale de la sicile (IZSSi). Tunis, TUNISIE.*

NIKOLIC, N., 2009. Diversité génétique et taille efficace chez les populations de poissons sauvages : le cas du saumon atlantique un poisson migrateur amphihaline menacé. *Thèse de doctorat. Génétique des populations. Toulouse : université Toulouse III -Paul Sabatier, p. 47.*

OKASSA, M., 2010. Congruence entre différenciation morphologique et moléculaire (Barcode moléculaire) pour sept espèces de la famille des phytoseiidae (acari : mesostigmata). *Thèse de doctorat. Evolution, ecologie, ressources génétiques, paléontologie. Montpellier : Sup agro. p. 50- 56.*

BOSSIER P., 1999. Authentification des produits de la mer par motifs ADN. *Journal of food science.* Vol64 n^o2, mars 1999. P189-193.

PELLERIN – MASSICOTE J.B., VINCENT Y et PELLETIER E., 1989. Evaluation de la qualité d'estuaire du saint - laurent. *Etudes spatiales. Rapport remis au ministère de l'environnement de Québec, 130 pp.*

PICHOT P., et PICHOT Y., 1980. Le Polymorphisme Electrophoretique : Un Moyen d'Etude des Populations. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 44(3), 201-210. [En ligne]. Adresse URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1909/>.

POLLARD D-A., et PICHOT P., 1972. Identification des espèces du genre *Spicara* par électrophorèse des protéines du cristallin. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 36(1), 5-14. [En ligne]. Adresse URL : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2066/>.

POMPANON F., et SHEHZAD W., 2019. Code-barres ADN pour caractériser la biodiversité. *L'Encyclopédie de l'environnement. Université Grenoble Alpes*.

PROTZ, D., 1983. Les méthodes de détermination des espèces animales à partir de la viande ou des produits à base de viande. *Rev sci tech off intepiz. Vol. 2, p. 82*.

RASMUSSEN, R.S., MORRISSEY, et M.T., HEBERT, P.D.N., 2009. DNA barcoding of commercially important salmon and trout species (*Oncorhynchus* and *Salmo*) from north America. *J agri food chem. Vol. 57, p. 8379–8385*.

ROBYN E. JONES., ROSS A. GRIFFIN., et RICHARD KF UNSWORTH., 2020. Adaptive Resolution Imaging Sonar (ARIS) as a tool for marine fish identification. *Elsevier BV*.

ROUBAL, W.T., 1963. Tuna fatty acids. *J amer oil chemist soc. Vol. 40, p. 215-217*.

SEMMAME O., 2020. Techniques électrophorétiques. Génétique moléculaire. [En ligne]. Adresse URL : <https://fac.umc.edu.dz/snv/faculte/BA/2020/3Techniques%20%C3%A9lectrophor%C3%A9tiques.pdf>

SOPHIE G. (Aticle publié le 16 Mai 2011). La dérive génétique. [En ligne]. Adresse URL : <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/evolution/mecanismes-theories-et-concepts-de-l-evolution/la-derive-genetique>

SUSHA CH. Technique de polymorphisme de longueur d'éclat (RFLP) de restriction. [En ligne]. Adresse URL : [https://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-\(RFLP\)-Technique-\(French\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Restriction-Fragment-Length-Polymorphism-(RFLP)-Technique-(French).aspx)

SWAIN, D.P., et FOOTE, C.J., 1999. Stocks and chameleons the use of phenotypic variation in stock identification. *Fish res. Vol. 43,p. 113-128*.

SWYNGHEDAUW, B., et SILVESTRE, J.S., 2008. Biologie et génétiques moléculaire. (*aide-mémoire*). 3^oéd. Paris :Dunod. p. 3.

TAGU, D., 1999. Principes des techniques de biologie moléculaire. Paris : INRA. p. 41-45.

TAGU, D., et OUSSARD, M., 2003.Principes des techniques de biologie moléculaire.2^o éd. Paris : INRA. p. 159.

TAUTZ, D., et RENZ, M., 1984.Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucaryotic genomes. *Nucleic acids res. Vol. 12, p. 4127-4138*.

TELETCHEA F., 2009. Méthodes d'identification moléculaire des espèces de poissons: réévaluation et applications possibles. *Rev Fish Biol Fisheries* 19, 265.

TELETCHEA F., 2009. Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in fish biology and fisheries*. Vol. 9, p.265–293.

TRIVEDI, S., AFFAN, R., ALESSA, A.H.A., et al., 2014. DNA barcoding of red sea fishes from Saudi Arabia – the first approach. *DNA Barcodes*. Vol. 2, p. 17–20.

TRIVEDI, S., ALOUFI, A.A., et ANSARI, A.A., 2016. Role of DNA barcoding in marine biodiversity assessment and conservation : *An update*. *Saudi journal of biological sciences*. Vol. 23, p. 161-171.

TSENG, M.C., JEN- SHIAO, C., HUNG, Y.H., 2011. Genetic identification of *Thunnus orientalis*, *T. thynnus*, and *T. maccoyii* by a cytochrome b gene analysis. *Environmental Biology of Fishes*. Vol. 91, n° 1, p. 103-115.

Ulrich G. Mueller L. et LaReesa W., 1999. Génotypage AFLP et empreinte digitales. *Volume 14, Numéro 10, 1 octobre 1999, page 389-394.*

VIRICEL A. et PANTE E., 2007. «Département de Biologie, Université des Acadiens à Lafayette (Louisiane, USA)», *Le Courrier de la Nature* n° 235 - Septembre-Octobre 2007.

WARD, R.D., ZEMLAK, T.S., HEBERT, P.D.N., et al., 2005. Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol. 360. p. 1847–1857.

WAPLES, R.S., 1998. Separating the wheat from the chaff : patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J hered.* Vol. 89. p. 438-450.

WIRGIN, I.I., et WALDMAN, J.R., 1994. What DNA can do for you. *Fisheries*. Vol. 19, p. 16-27.

WOLF, C., BURGNER, M., HUBNER, P., et al., 2000. Analyse de l'ADN mitochondrial par PCR-RFLP : différenciation des espèces de poisson. *LebensmittelWissenschaft and Technologie*. Vol. 33, p. 144-150.

WRIGHT S., 1969. The theory of gene frequencies. *University of Chicago. Press evolution and genetics of populations*. Vol. 2, p. 511.

Musiani M, Venturoli S, Gallinella G et Zerbin M. (page consultée le 27 aout 2021). Polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay (PCR-ELISA). [En ligne]. Adresse URL: <https://bitesizebio.com/20445/polymerase-chain-reaction-enzyme-linked-immunosorbent-assay-pcr-elisa/>

Djamila. (page consultée le 8 octobre 2021). Méthodes d'identification à l'échelle moléculaire. [En ligne]. Adress URL: <https://www.ofscienc.com/2020/12/methodes-didentification-lechelle.html>

Annexes

Station 1 : Cap Tizirine (Lot 1)

Nombre d'individu	Langueur Totale (mm)	Largeur (mm)	épaisseur Maximal (mm)	Poids Total (gr)	Poids de la chair (gr)	Poids Coquille (gr)	IC	Sexe
1	82.04	41.93	32.61	23	6,52	14,92	28,3478261	F
2	79.08	38.06	31.93	19,44	2,25	12,24	11,5740741	F
3	72.85	39.09	31.50	16,74	5,83	10,04	34,8267622	F
4	67.70	35.47	28.16	14,6	5,19	8,65	35,5479452	M
5	77.60	38.87	34.61	18,01	4,77	12,54	26,485286	M
6	65.15	31.52	28.85	10,1	2,68	6,85	26,5346535	M
7	61.16	36.53	26.15	13,68	3,79	9,4	27,7046784	F
8	78.41	40.58	26.09	13,16	3,33	9,39	25,3039514	M
9	76.28	35.03	29.33	13,1	3,42	9,15	26,1068702	M
10	65.40	31.21	27.75	10,38	2,92	6,93	28,1310212	F
11	77.55	38.04	28.93	23,19	9,16	12,77	39,4997844	M
12	66.71	31.44	24.23	10,25	2,28	7,42	22,2439024	M
13	83.26	43.86	34.19	28,75	9,85	17,96	34,2608696	M
14	82.58	46.41	32.42	22,2	5,12	15,89	23,0630631	M
15	71.16	37.41	29.07	15,44	3,94	10,76	25,5181347	F
16	78.49	37.83	32.91	19,84	4,77	14,5	24,0423387	M
17	74.76	38.40	31.65	18,81	4,87	13,21	25,8904838	M
18	63.43	30.35	22.94	8,85	2,35	6,13	26,5536723	M
19	69.56	36.33	25.65	14,28	4,45	9,06	31,162465	M
20	76.03	33.33	28.15	18,61	6,25	10,78	33,5840946	M
21	69.44	35.74	30.26	14,77	3,92	10,21	26,5402844	M
22	70.55	38.35	26.59	14,9	4,72	9,65	31,6778523	F
23	59.74	31.52	26.17	17,41	5,82	10,75	33,4290638	F
24	25.95	17.90	11.40	1,39	0,3	8,89	21,5827338	F
25	65.11	33.70	26.48	17,14	6,68	10,35	38,9731622	M
26	72.46	36.97	28.71	14,36	4,04	9,84	28,1337047	F
27	71.23	35.39	25.07	13,12	4,81	7,82	36,6615854	M
28	66.20	35.24	25.16	11,23	3,16	7,58	28,1389136	M
29	63.53	35.24	24.23	9,58	2,47	6,72	25,782881	M
30	77.70	38.98	27.43	18,1	6	11,34	33,1491713	M
31	75.63	39.98	28.19	17,3	5,48	11,25	31,6763006	M
32	85.09	38.68	34.47	23,93	9,86	13,04	41,2035102	M
33	57.17	31.52	25.67	8,96	2,26	6,36	25,2232143	M
34	56.49	29.48	22.76	8,03	2,72	4,97	33,8729763	M
35	21.48	19.97	8.80	0,81	0,14	0,56	17,2839506	M
36	17.80	7.67	6.64	0,45	0,05	0,34	11,1111111	M

Station 2: Rochet Blanc (Lot 2)

Nombre d'individu	Langueur (mm)	Largeur (mm)	épaisseur (mm)	Poids Total (gr)	Poids de la chair (gr)	Poids Coquille (gr)	IC	Sexe
1	86,04	40,55	34,4	18,67	5,31	12,2	28,4413498	F
2	73,25	35,67	29,1	16,46	4,8	10,72	29,1616039	M
3	77,75	37,78	33,75	19,1	5,08	12,73	26,5968586	M
4	83,79	41,44	30,86	23,72	9,21	13,17	38,8279933	M
5	81,96	39,55	34,04	19,97	5,77	13,54	28,89334	M
6	70,17	35,74	27,69	13,2	3,97	8,59	30,0757576	F
7	80,66	43,87	29,37	17,01	3,94	12,19	23,1628454	M
8	70,59	35,45	26,77	13,52	3,23	9,23	23,8905325	M
9	74,7	37,12	28,39	16,07	4,62	10,29	28,7492222	M
10	68,07	41,05	28,98	17,09	3,55	12,52	20,7723815	F
11	70,25	36,4	26,88	15,46	4,09	10,28	26,4553687	F
12	18,87	10,88	7,23	0,41	0,05	0,3	12,195122	F
13	78,29	38,58	31,18	23,52	8,28	14,22	35,2040816	M
14	66,67	35,72	28,01	14,31	3,93	9,63	27,4633124	F
15	87,03	37,12	31,49	18,9	4,65	13,51	24,6031746	M
16	62,17	33,57	31,95	13,61	2,88	9,96	21,1609111	M
17	75,95	41,14	28,13	14,22	3,72	10,32	26,1603376	F
18	66,28	33,43	25,49	10,31	2,6	7,16	25,2182347	M
19	69,9	31,47	30,55	15,26	4,06	10,58	26,6055046	F
20	75,42	35,07	33,16	19,86	6,18	12,92	31,1178248	F
21	75,18	39,51	33	18,13	4,43	12,65	24,4346387	M
22	82,44	40,68	33,94	21,82	8,02	12,21	36,7552704	M
23	70,56	35,37	31,87	14,61	4,59	8,99	31,4168378	M
24	23,91	13,22	9,84	0,87	0,07	0,55	8,04597701	F
25	66,73	32,13	26,7	10,59	2,82	7,21	26,6288952	M
26	76,81	40,28	29,84	18,11	5,79	11,28	31,9712866	F
27	79,95	34,18	33,13	17,52	6,01	10,5	34,303653	F
28	69,13	34,88	26,53	11,07	2,44	7,88	22,0415537	F
29	71,28	37,5	27,57	15,6	4,96	9,78	31,7948718	M
30	69,7	35,2	26,93	13,67	3,76	9,34	27,5054865	M
31	78,8	37,62	30,83	17,06	3,55	12,62	20,8089097	F
32	61,67	28,94	27,8	9,93	2,64	6,62	26,5861027	M
33	60,67	29,51	24,09	8,08	2,17	5,24	26,8564356	M
34	68,18	33,09	23,43	12,43	4,07	7,67	32,7433628	F
35	64,54	30,89	27,13	18,87	3,25	6,7	17,2231055	F
36	22,19	14,26	10,21	0,89	0,1	0,7	11,2359551	F